



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química

“Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura
sobre calidad y fisiología postcosecha de frutillas
(*Fragaria x ananassa* Duch.)”

Trabajo de tesis doctoral

Autor: Ing. Agr. Ariel R Vicente

Directora: Dr. Alicia Raquel Chaves

Co-director: Dr. Pedro Marcos Civello

Lugar de Trabajo:

CIDCA

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de
Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP-CONICET.

Calle 47 y 116 s/n°

La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina.

Tel/Fax: (0221) 424-9287 / 425-4853

E-mail: arielvicente@quimica.unlp.edu.ar

Agosto de 2004

El presente trabajo de Tesis Doctoral, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. Alicia R Chaves y Co-dirección del Dr. Pedro M Civello.

La Plata, Agosto de 2004

A mis padres por el infinito apoyo brindado y al Profesor Raúl Pérez Duprat una de las personas por las que trato de hacer mi trabajo con esfuerzo y dedicación.

Agradecimientos

-A mi Directora Alicia Chaves y a mi Co-director Pedro Marcos Civello por su comprensión tanto en el aspecto laboral como humano y por permitirme trabajar con total libertad pero con un apoyo constante.

-Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científico Tecnológica, por las becas que me permitieron concretar mi trabajo de tesis.

-A la Universidad Pública por permitirme al igual que a muchos realizar mi formación de grado y post-grado.

-A Lorenza Costa por las horas de discusión y trabajo compartidas y por los aportes a este trabajo, pero principalmente por su amistad.

-A Gustavo Martínez por los aportes realizados en el análisis y discusión de los resultados y por el apoyo brindado.

-A Analía Concellón y Mercedes López Osornio por su amistad y compañerismo y por hacer ameno el trabajo de cada día.

-A Sonia Viña por las horas compartidas de estudio y por su humildad y compañerismo.

-A Alicia Mudridge por su apoyo y cariño.

-A Jerónimo Pan por compartir horas de frutillología y a Laura Lemoine, por incorporarse al grupo y compartir horas juntos en un clima de amistad.

-A las chicas de proteínas por compartir largas horas de laboratorio en un clima de amistad.

-A Néstor y Mario por hacer agradable el clima en el laboratorio, por compartir charlas y risas cotidianas y por permitirme el acceso al "Club de Hombres".

-A Sergio Giner por la ayuda en los perfiles térmicos y de humedad pero sobre todo por su apoyo constante.

-A Rodolfo Mascheroni por sus comentarios amenos y charlas nocturnas en el CIDCA y por su preocupación y dedicación por el Instituto.

-A Hilda Castagnasso y Elisa Miceli por su apoyo incondicional en todo momento.

-A mis compañeros de Cátedra Exequiel Pereyra, Silvina del Castello, Constantino Gómez, Vanessa Herlax, Laura Terminiello, Mariana Garbi, Marta Andrada, Martín Veloso, Nadia Rolny, Laura Faustino, Cristian Raimundo por su amistad, apoyo y compañerismo.

-A Teresita Jourdán de quién tengo el mejor de los recuerdos como docente y como persona.

-A Fernando Chirido, Martín Rumbo y "Anita" por las largas horas compartidas en el laboratorio y por generar un clima de trabajo responsable pero distendido.

-A Aldo Campana, Luis Roche, el Ruso Denisenia, Pablo Mulán, Vicente Valenti, José Luis Alonso, Luis Caffarena por el apoyo técnico brindado y por la buena onda constante.

-A Diana, Natalia, Ana Laura, Sara y Estrella por hacer más fácil el trabajo de todos.

-A TODOS mis compañeros del CIDCA por permitirme trabajar en un clima favorable y distendido.

- ◆ *A mi ahijado Matías a quién adoro.*
- ◆ *A mis hermanos Mariángeles, Hernán, y Evangelina personas muy importantes para mí, quienes siempre me apoyaron.*
- ◆ *A mi abuela Juana quien aunque ya no pueda leer esto seguro estará contenta.*
- ◆ *A Victoria a quién conocí en los pasillos del Instituto por este tiempo compartido juntos.*

ABREVIATURAS

AC	Atmósferas controladas
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADNc	Ácido desoxi-ribonucleico complementario
AM	Atmósferas modificadas
ANA	Ácido naftalen-acético
APX	Ascorbato peroxidasa
AS	Ácido salicílico
β -xil	β -xilosidasa
β -gal	β -galactosidasa
CAT	Catalasa
Clasa	Clorofilasa
CIPX	Clorofila peroxidasa
Cls	Clorofilas
CMC	Carboxi-metil-celulosa
DNS	Ácido di-nitro-salicílico
DPPH*	Difenil-picril-hidrazil
EGasa	Endo-1,4- β -D-glucanasa
ERO	Especies reactivas del oxígeno
GalA	Ácido galacturónico
GlcA	Ácido glucurónico
GAX	Glucouron-arabinosilano
Hem	Hemicelulosa
HGA	Homogalacturonano
HR	Humedad relativa
HSP	Proteínas de shock térmico
1-MCP	1-metil-ciclopropano
MDS	Mg-dequelatasa
PAL	Fenilalanina amonio-liasa
PDC	Piruvato decarboxilasa
PG	Poligalacturonasa
PL	Pectato liasa

PME	Pectin metil-esterasa
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
POD	Peroxidasa
PPO	Polifenol oxidasa
PS _{EDTA}	Pectinas solubles en EDTA
PS _{H₂O}	Pectinas solubles en agua
PS _{HCl}	Pectinas solubles en HCl
Ps	Presión de vapor de saturación
PVC	Policloruro de vinilo
PVPP	Polivinil polipirrolidona
RG I	Ramnogalacturonano I
RG II	Ramnogalacturonano II
RIA	Residuo insoluble en alcohol
SDH	Succinato deshidrogenasa
Ta	Temperatura de bulbo seco
TAT	Tratamientos térmicos de alta temperatura
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCD	Detector de conductividad térmica
Tr	Temperatura de rocío
XET	Xiloglucano endotransglicosilasa
XiG	Xiloglucano

INDICE

<u>1. RESUMEN</u>	14
<u>2. ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO</u>	17
<u>3. OBJETIVOS</u>	19
<u>4. INTRODUCCIÓN: ASPECTOS GENERALES DE PRODUCCIÓN, MORFOLOGÍA Y MADURACIÓN DE FRUTILLAS</u>	21
4.1. Importancia del cultivo de frutillas.	22
4.1.1. La frutilla en el mundo.	22
4.1.2. El mercado internacional.	23
4.1.3. La frutilla en la Argentina.	24
4.1.4. Exportación de frutilla.	24
4.2. Origen y morfología.	25
4.2.1. Principales especies del género <i>Fragaria</i> .	25
4.2.2. La frutilla cultivada.	26
4.2.3. Principales variedades cultivadas.	27
4.2.4. Morfología.	28
4.3. Maduración de frutillas.	32
4.3.1. Crecimiento.	32
4.3.2. Desarrollo y maduración.	32
4.4. Generalidades de calidad y postcosecha de frutillas.	37

CAPÍTULO I: “EFECTO DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE ALTA TEMPERATURA SOBRE CALIDAD Y VIDA POSTCOSECHA DE FRUTILLAS”

<u>1. Introducción</u>	39
<u>2. Materiales y métodos</u>	46
2.1. Material vegetal y selección de tratamientos.	46
2.1.1. Tratamientos con aire caliente.	46
2.1.2. Tratamientos con agua caliente.	46
2.2. Caracterización del tratamiento térmico con aire caliente.	46
2.2.1. Perfil térmico.	46
2.2.2. Perfil de humedad.	47
2.2.3. Pérdida de peso durante el tratamiento.	47
2.2.4. Actividad respiratoria.	47
2.3. Efecto de tratamientos térmicos en combinación con el almacenamiento refrigerado sobre calidad y vida postcosecha de frutillas.	48
2.3.1. Pérdida de peso.	48
2.3.2. Color.	48
2.3.3. Antocianinas.	48
2.3.4. Firmeza.	48
2.3.5. Acidez y pH.	49
2.3.6. Azúcares totales y reductores.	49
2.3.7. Ataque de patógenos.	49
2.4. Análisis estadístico.	49
<u>3. Resultados y discusión</u>	50
3.1. Selección de tratamientos.	50
3.2. Caracterización del tratamiento con aire caliente.	51
3.2.1. Perfil térmico y perfil de humedad durante el tratamiento.	51
3.2.2. Pérdida de peso durante el tratamiento térmico.	51
3.2.3. Actividad respiratoria durante el tratamiento.	53
3.3. Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura en combinación con el almacenamiento refrigerado sobre calidad y vida postcosecha de frutillas.	54
3.3.1. Pérdida de peso.	54
3.3.2. Color superficial y antocianinas.	55
3.3.3. Firmeza.	58
3.3.4. pH y acidez titulable.	59
3.3.5. Azúcares totales y reductores.	60
3.3.6. Ataque de patógenos.	61
<u>4. Conclusiones</u>	63

CAPÍTULO II: “EFECTO DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE ALTA TEMPERATURA SOBRE LA DEGRADACIÓN DE PARED CELULAR Y ABLANDAMIENTO DE FRUTILLAS”

<u>1. Introducción</u>	65
<u>2. Materiales y métodos</u>	78
2.1. Material vegetal.	78
2.2. Disección de los frutos.	78
2.3. Firmeza.	78
2.4. Actividad de enzimas que participan en la degradación de pared celular.	78
2.4.1. Endo- β -1,4-D-glucanasa.	78
2.4.2. β -xilosidasa.	79
2.4.3. Poligalacturonasa.	79
2.4.4. β -galactosidasa.	80
2.4.5. Pectin metilesterasa.	80
2.5. Análisis de la composición de pared celular.	81
2.5.1. Aislamiento de polisacáridos de pared celular.	81
2.5.2. Extracción y cuantificación de pectinas	81
2.5.3. Extracción y cuantificación de hemicelulosas.	82
2.6. Análisis estadístico.	82
<u>3. Resultados y discusión</u>	83
3.1. Firmeza.	83
3.2. Actividad de enzimas que participan en la degradación de pared celular.	85
3.2.1. Endo- β -1,4-D-glucanasa.	85
3.2.2. β -xilosidasa.	86
3.2.3. Poligalacturonasa.	87
3.2.4. β -galactosidasa.	88
3.2.5. Pectin metilesterasa.	90
3.3. Análisis de la composición de pared celular.	91
3.3.1. Hemicelulosas.	91
3.3.2. Pectinas totales.	92
3.3.3. Pectinas solubles en agua, pectinas solubles en EDTA y pectinas solubles en ácido clorhídrico.	93
<u>4. Conclusiones</u>	96

CAPÍTULO III: “EFECTO DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE ALTA TEMPERATURA SOBRE EL DETERIORO Y ATAQUE DE PATÓGENOS EN FRUTILLAS”

<u>1. Introducción</u>	98
<u>2. Materiales y métodos</u>	110
2.1. Efecto directo de los tratamientos.	110
2.1.1. Viabilidad de bacterias y hongos.	110
2.1.2. Velocidad de germinación de conidios.	110
2.2. Efecto de tratamientos térmicos sobre el metabolismo fenólico.	111
2.2.1. Fenoles totales.	111
2.2.2. Actividades enzimáticas.	111
2.2.2.1. Actividad fenilalanina amonioliasa.	112
2.2.2.2. Actividad peroxidasa.	112
2.2.2.3. Actividad polifenol oxidasa.	112
2.2.3. Contenido de ácido salicílico.	113
2.3. Efecto de tratamientos térmicos sobre el deterioro y aspectos vinculados al metabolismo oxidativo.	113
2.3.1. Material Vegetal.	113
2.3.2. Tratamiento térmico y almacenamiento.	113
2.3.3. Actividad respiratoria.	114
2.3.4. Pérdida de electrolitos y pérdida de potasio.	114
2.3.5. Actividad pirogalol peroxidasa.	114
2.3.6. Peróxido de hidrógeno.	115
2.3.7. Poder antioxidante.	115
2.3.8. Ácido ascórbico.	115
2.3.9. Actividad superóxido dismutasa.	116
2.3.10. Actividad ascorbato peroxidasa.	116
2.4. Análisis estadístico.	117
<u>3. Resultados y discusión</u>	118
3.1. Efecto directo de los tratamientos.	118
3.1.1. Viabilidad de bacterias y hongos.	118
3.1.2. Velocidad de germinación de conidios.	120
3.2. Efecto de tratamientos térmicos sobre el metabolismo fenólico.	121
3.2.1. Fenoles totales.	121
3.2.2. Actividades enzimáticas.	123
3.2.2.1. Actividad fenilalanina amonioliasa.	123
3.2.2.2. Actividad pirogalol peroxidasa.	124
3.2.2.3. Actividad polifenol oxidasa.	125
3.2.3. Contenido de ácido salicílico.	126
3.3. Efecto de tratamientos térmicos sobre el deterioro y aspectos vinculados al metabolismo oxidativo.	128
3.3.1. Pérdida de electrolitos y pérdida de potasio.	128
3.3.2. Actividad respiratoria.	130
3.3.3. Actividad pirogalol peroxidasa.	131
3.3.4. Peróxido de hidrógeno.	132
3.3.5. Poder antioxidante.	133
3.3.6. Ácido ascórbico.	133
3.3.7. Actividad superóxido dismutasa.	134
3.3.8. Actividad ascorbato peroxidasa.	135
<u>4. Conclusiones</u>	137

CAPÍTULO IV: “UTILIZACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE ALTA TEMPERATURA EN COMBINACIÓN CON PELÍCULAS DE PERMEABILIDAD SELECTIVA A LOS GASES”

<u>1. Introducción</u>	140
<u>2. Materiales y métodos</u>	147
2.1. Ensayo con fruta 75 % roja.	147
2.2. Ensayos con fruta 100 % roja.	147
2.3. Determinaciones analíticas.	148
2.3.1. Mediciones de de CO ₂ y O ₂ .	148
2.3.2. Ataque de patógenos.	148
2.3.3. Pérdida de peso.	136
2.3.4. Color superficial.	148
2.3.5. Antocianinas.	148
2.3.6. Firmeza.	149
2.3.7. pH y acidez titulable.	149
2.3.8. Azúcares.	149
2.3.9. Fenoles totales.	149
2.4. Análisis estadístico.	150
<u>3. Resultados y discusión</u>	151
3.1. Ensayos con fruta 75 % roja.	151
3.1.1. Composición de la atmósfera de almacenaje.	151
3.1.2. Ataque de patógenos.	153
3.1.3. Pérdida de peso.	155
3.1.4. Color superficial y antocianinas.	156
3.1.5. Firmeza.	159
3.1.6. pH y acidez titulable.	160
3.1.7. Azúcares.	161
3.1.8. Fenoles totales.	162
3.2. Ensayos con fruta 100 % roja.	163
<u>4. Conclusiones</u>	167

CAPÍTULO V: “EXTENSIÓN DE LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS A OTROS BERRIES”

<u>1. Introducción</u>	169
<u>2. Materiales y métodos</u>	176
2.1. Material vegetal.	176
2.2. Análisis de cambios durante el desarrollo y maduración de boysenberries.	176
2.3. Utilización de tratamientos térmicos de alta temperatura en postcosecha de boysenberries.	176
2.3.1. Selección de tratamientos apropiados para boysenberry.	176
2.3.2. Combinación de tratamientos térmicos y almacenamiento a 0 y 20°C.	176
2.4. Determinaciones analíticas.	177
2.4.1. Peso de los frutos.	177
2.4.2. Daño de los frutos.	177
2.4.3. Pérdida de antocianinas.	177
2.4.4. Firmeza.	177
2.4.5. Azúcares totales y reductores.	177
2.4.6. pH y acidez titulable.	178
2.4.7. Fenoles totales.	178
2.4.8. Antioxidantes.	178
2.4.9. Color superficial.	179
2.4.10. Antocianinas .	179
2.4.11. Extracción y dosaje de clorofilas.	179
2.4.12. Extracción de clorofilasa, Mg-dequelatasa y clorofila peroxidasa.	179
2.4.13. Clorofilasa.	180
2.4.14. Mg-dequelatasa.	180
2.4.15. Clorofila peroxidasa.	180
2.4.16. Endo-β-1,4-D-glucanasa.	180
2.4.17. β-galactosidasa.	181
2.4.18. Poligalacturonasa.	181
2.4.19. Pectin metilesterasa.	182
2.5. Análisis estadístico.	182
<u>3. Resultados y discusión</u>	183
3.1. Cambios durante el desarrollo y maduración de boysenberries.	183
3.1.1. Peso de los frutos y firmeza.	183
3.1.2. Azúcares, pH, acidez, antioxidantes y fenoles totales.	184
3.1.3. Color superficial, antocianinas, clorofilas y enzimas asociadas a su degradación.	187
3.1.4. Enzimas asociadas a la degradación de pared celular.	190
3.2. Efecto de TAT sobre calidad y vida postcosecha de boysenberries.	192
3.2.1. Selección de tratamientos.	192
3.2.2. Combinación de TAT y almacenamiento a 0 y 20°C.	194
3.2.2.1. Daño de los frutos.	194
3.2.2.2. Firmeza.	196
3.2.2.3. Azúcares, pH y acidez titulable.	197
3.2.2.4. Color superficial y antocianinas.	198
3.2.2.5. Antioxidantes.	198
3.2.2.6. Pérdida de peso.	199
<u>4. Conclusiones</u>	200
5. CONCLUSIONES FINALES	201
6. REFERENCIAS	204

1. Resumen

Se evaluó el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura (TAT) sobre la calidad y vida postcosecha de frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv Selva. Los tratamientos térmicos con agua caliente no resultaron beneficiosos ya que incrementaron la incidencia de patógenos y el deterioro de los frutos. Sin embargo, cuando los frutos se trataron con aire caliente (45°C, 3 h), se observó una significativa disminución de las pérdidas postcosecha. Los principales efectos hallados por la aplicación de los TAT fueron un retraso general en la velocidad de maduración, una disminución del ataque de patógenos y una reducción en el ablandamiento. Los beneficios de la aplicación de TAT en los trabajos realizados hasta la fecha han sido asociados con el efecto del calor sobre los patógenos y/o los frutos. No obstante, durante el tratamiento térmico el incremento en la actividad respiratoria de los frutos provoca una elevada producción de CO₂ que podría aportar un beneficio extra desde el punto de vista de la postcosecha. Por lo tanto se realizaron tratamientos térmicos de alta temperatura en presencia de películas plásticas de manera de retener el CO₂ producido por los frutos durante el tratamiento. Los frutos tratados mostraron un retraso en la evolución del color y ablandamiento y una disminución en el ataque de patógenos, pero en este caso los efectos se observaron aún luego de 14 d de almacenamiento. Los resultados hallados resultan favorables y muestran como una innovación tecnológica la posibilidad de considerar este tipo de tratamiento como una estrategia para la modificación de atmósferas en forma rápida (debido a la elevada tasa respiratoria de los frutos durante el tratamiento), sencilla (no resulta necesaria la utilización de equipos de inyección de gases) y económica (el fruto como fuente de CO₂).

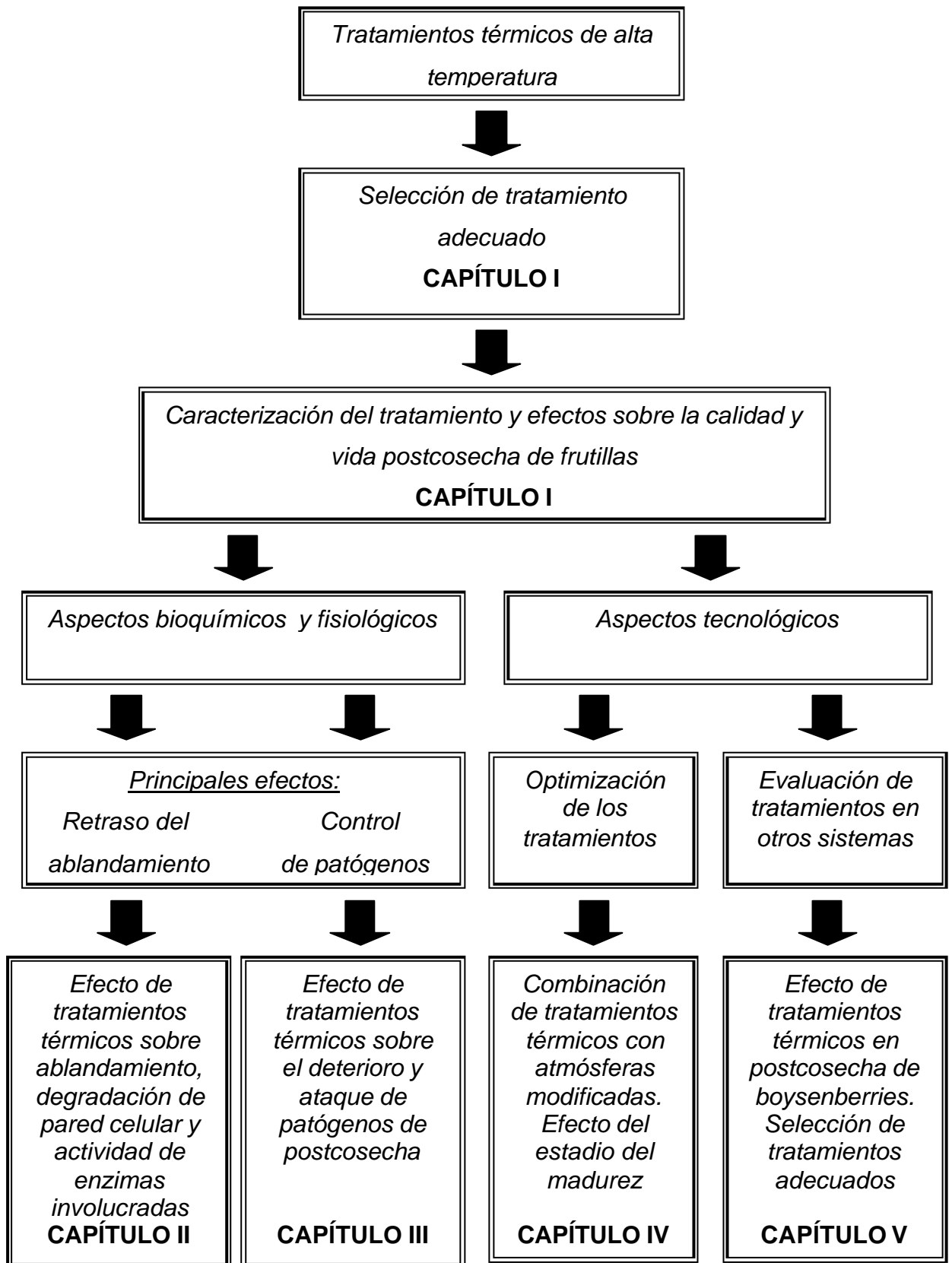
Los TAT retrasaron el ablandamiento tanto en la zona interna como externa del receptáculo y provocaron una reducción en la actividad endo-1,4-β-D-glucanasa y β-xilosidasa y disminuyeron la degradación de hemicelulosas. Las actividades de poligalacturonasa y β-galactosidasa también fueron reducidas por los tratamientos mientras que pectin metil-esterasa fue incrementada. Esto provocó una disminución en la tasa de degradación de pectinas unidas covalentemente (PS_{HCl}) y en el incremento de pectinas lábilmemente unidas (PS_{H₂O}), lo que podría estar asociado con una reducción en el clivaje de compuestos pécticos por enzimas hidrolíticas. Por otra parte, los frutos tratados térmicamente presentaron un mayor contenido de pectinas unidas iónicamente (PS_{EDTA}) lo que podría asociarse con un incremento en la actividad PME. Los resultados hallados sugieren que el retraso de ablandamiento observado en los frutos tratados estaría asociado con cambios provocados en la degradación de las

paredes celulares. La reducción en la actividad EGasa y β -xil reduciría la degradación de compuestos de naturaleza hemicelulósica mientras que el incremento en la actividad PME, al generar un mayor número de sitios putativos para la formación de puentes de calcio, y la reducción en la actividad PG podrían contribuir a retrasar el desensamblaje de los compuestos pécticos.

El efecto de los TAT sobre la incidencia de enfermedades de postcosecha resultaría de la coexistencia de diferentes factores conducentes a la reducción del ataque de patógenos. Los TAT afectan directamente a los hongos al reducir la velocidad de germinación de conidios de *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*. Se observan además efectos indirectos mediados por cambios en la fisiología de los frutos como consecuencia de los tratamientos: aumento en la actividad PPO, retraso en la degradación de las paredes celulares que podría dificultar el proceso de penetración y colonización de los tejidos, e incremento en la protección enzimática y no enzimática contra especies reactivas del oxígeno, las cuales es conocido que se acumulan durante la senescencia y ataque de patógenos. Resulta además de interés mencionar que durante el TAT se produce un marcado incremento en los niveles de ácido salicílico cuya participación en la señalización de respuestas de defensa en plantas es aceptada. Finalmente, a fin de estudiar la posibilidad de extensión de la utilización de TAT, se evaluó el efecto de su aplicación en boysenberries, frutos aún más perecederos que frutilla. Los resultados sugieren que la combinación de tratamientos térmicos (45°C, 1h) y almacenamiento refrigerado podría ser también una estrategia de utilidad en boysenberries.

La realización de este trabajo permitió seleccionar TAT adecuados para frutillas, optimizarlos y estudiar la posibilidad de aplicación en otros sistemas. Por otra parte se analizó en detalle el efecto de los TAT sobre el ablandamiento y la disminución en el ataque de patógenos, aspectos de relevancia en tecnología de postcosecha. Los datos presentados sugieren que la aplicación de estos métodos alternativos a la aplicación de productos químicos podría ser de utilidad para complementar la refrigeración a fin de extender la vida postcosecha y mantener la calidad de frutillas y boysenberries, lo cual resulta de interés ante la creciente demanda de los consumidores por productos inocuos y de calidad.

2. Esquema general del trabajo



3. Objetivos

OBJETIVO GENERAL:

Analizar el efecto de los tratamientos térmicos de alta temperatura sobre la calidad y fisiología postcosecha de frutillas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Seleccionar un tratamiento térmico postcosecha adecuado para su aplicación en frutillas y evaluar el efecto de dicho tratamiento sobre la calidad y vida postcosecha de los frutos.
2. Analizar el efecto de los tratamientos térmicos de alta temperatura sobre el ablandamiento en frutillas (degradación de pared celular y actividad de enzimas asociadas al proceso).
3. Estudiar el efecto de los tratamientos térmicos de alta temperatura sobre el ataque de patógenos de postcosecha en frutilla.
4. Evaluar el efecto de tratamientos físicos combinados (tratamientos térmicos, atmósfera modificada y refrigeración) sobre la calidad y conservación de frutillas y analizar la influencia del estado de madurez sobre la respuesta a la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura en frutilla.
5. Caracterizar el proceso de maduración y desarrollo de un fruto altamente perecedero como boysenberry y analizar el efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura sobre su calidad y vida postcosecha.

**4. Aspectos generales de
producción, morfología y
maduración de frutillas**

4.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE FRUTILLAS

4.1.1. La frutilla en el mundo

La frutilla posee las más variadas y complejas posibilidades de manejo ya que puede madurar durante casi todo el año. La naturaleza de su morfología y fisiología, que permiten manejarla en condiciones de ambiente controlado y el desarrollo científico y tecnológico en la producción de esta fruta le han permitido un desarrollo inusitado en las áreas productivas alcanzando un mayor desarrollo que el resto de los frutos pequeños con los que tradicionalmente se asocia (frambuesa, zarzamora). Se ha convertido en un cultivo muy importante a nivel mundial por la atracción que ofrecen sus características de forma, color, sabor y aroma, tanto para consumo directo como para la elaboración de salsas, conservas, congelados, yogures, bebidas y helados (Branzanti, 1989).

Según los datos estadísticos presentados por FAO, (FAOSTAT, 2004) la producción mundial de frutilla en el año 2003 fue de 3.165.314 Tn. Si se analiza la evolución de la producción mundial en los últimos 40 años, se observa que la misma se ha incrementado en forma continua (Figura 1). Su cultivo se ha extendido a casi toda Europa, principalmente en el Reino Unido, Francia, Alemania, ex-Yugoslavia, Países Bajos, Polonia y España. En América, Estados Unidos y México constituyen los principales productores (Tabla 1).

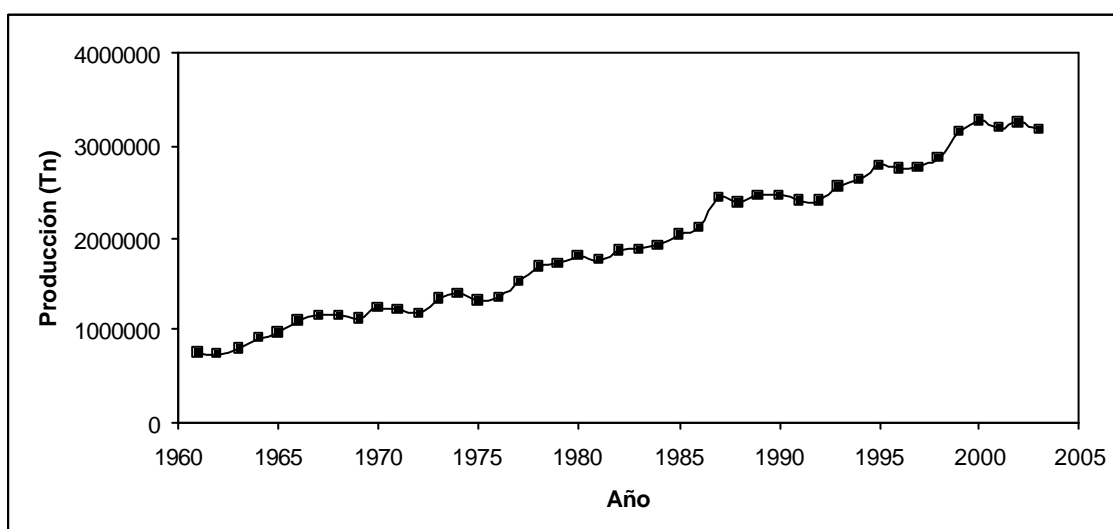


Figura 1: Evolución de la producción mundial de frutillas. Fuente: FAOSTAT, 2004.

Hay opiniones que sostienen que la frutilla es uno de los productos con creciente posibilidad de expansión de consumo, incluso a mercados alejados que pueden ser abastecidos gracias al transporte aéreo. En este contexto el manejo postcosecha toma un rol fundamental, ya que resulta imprescindible un correcto tratamiento de los frutos para poder acceder a mercados distantes con fruta de calidad y sin presentar elevadas pérdidas.

Tabla 1: Principales productores mundiales de frutilla. Fuente: FAOSTAT, 2004.

País	Producción (Tn)
Estados Unidos	835.300
España	262.500
Japón	208.000
Corea	209.938
Polonia	160.000
Italia	158.774
México	150.261
Rusia	145.000
Turquía	120.000
Marruecos	90.000
Egipto	68.000

4.1.2. El mercado internacional

Según estadísticas del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, España es el primer exportador mundial (300.000 Tn) de frutilla fresca si bien hubo una caída notable de la producción en el 2002. Luego le siguen en importancia EE.UU., México, Bélgica, Italia, y Polonia, de los cuales los dos primeros pronostican incrementar levemente la producción, mientras que en los demás casos se espera que se mantenga o se reduzca. Alemania, Francia, EE.UU, Canadá, Reino Unido y Japón son los seis mayores importadores de frutilla fresca y congelada (SAGPYA, 2004).

4.1.3. La frutilla en la Argentina

En Argentina se cultivan 1.100 hectáreas de frutilla, de las cuales 290 se encuentran en la Provincia de Tucumán. La zona tradicional de producción de frutillas en esta provincia es Lules, con 230 hectáreas, la cual posee características agroclimáticas óptimas para la producción de fruta en el invierno. La otra región productora es Tafí del Valle, donde existen 60 hectáreas en los valles de altura. En la provincia de Santa Fe la principal zona productora se encuentra en Coronda. La superficie cultivada es de aproximadamente 450 hectáreas con una producción anual de 10.000 toneladas, lo que significa casi el 50% del volumen nacional. El resto de la producción se distribuye en Salta, Jujuy, Misiones, Corrientes y la Provincia de Buenos Aires, que posee ventajas debido a la cercanía a los principales mercados consumidores. Esta amplia distribución en la producción hace que exista fruta disponible durante todo el año (Tabla 2).

Tabla 2: Época de cosecha de frutilla. Fuente: Kirschbaum y Hancock, 2000.

Región	Provincia	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Norte	Tucumán												
	Salta-Jujuy												
	Corrientes-Misiones												
Centro	Coronda (Santa Fe)												
	Norte/Buenos Aires												
Sur	Sur/Buenos Aires												
	Río Negro-Neuquén												

4.1.4. Exportación de frutilla

La premisa es llegar a cualquier mercado con la misma calidad y frescura de un fruto recién cosechado. Nuestro país no tiene tradición exportadora de frutas y hortalizas frescas, y la escasa utilización de tecnologías de postcosecha para mantener la calidad de los productos dificulta el acceso a mercados externos donde pueden obtenerse mejores precios. Si bien la mayor parte de las exportaciones son de fruta congelada (menos exigente en calidad que la fruta fresca), las nuevas reglas del mercado podrían dinamizar la salida de fruta fresca. Las exportaciones del 2002 compensaron la marcada caída del consumo interno. La exportación permitió comercializar una buena parte de la producción (Tabla 3).

La frutilla fue durante los primeros nueve meses de 2003 el principal fruto blando exportado sumando un total de 1.280 toneladas por un valor de 1.158.000 dólares (Kirschbaum, 2003). Los países compradores de frutillas argentinas en forma sostenida son EE.UU. y Brasil. Japón no compra frutillas frescas argentinas porque nuestro país tiene mosca de los frutos y la frutilla está citada como hospedero de esa plaga. En realidad, estudios realizados en la Argentina jamás detectaron mosca de los frutos en frutilla y esto debería servir de base para iniciar negociaciones para levantar las restricciones (Kirschbaum, 2003).

Tabla 3: Exportaciones argentinas de frutilla (Tn). (Fuente: SAGPYA, 2004).

Destino	2001	2002
Estados Unidos	166	933
Brasil	497	507
China	0	291
Canadá	3	203
Gran Bretaña	0	107
TOTAL	828	2291

4.2. ORIGEN Y MORFOLOGÍA

4.2.1. Principales especies del género *Fragaria*

La frutilla pertenece a la Familia Rosáceas, Subfamilia Rosoideas, Tribu Potentillea y género *Fragaria*. Su nombre deriva del latín “Fragans” lo cual está relacionado con el aroma característico que presentan sus frutos. Las especies del género *Fragaria* (más de 150) se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo siendo las principales:

-*F vesca* L.: Diploide. Llamada frutilla de los bosques y caracterizada por frutos pequeños, semi-esféricos, con numerosos aquenios, de pulpa clara y muy aromática.

-*Fragaria viridis* Duch.: Diploide. Espontánea en Europa y el Cáucaso. Fruto verdoso, firme, aromático y con aquenios hundidos.

-*Fragaria moschata* Duch.: Hexaploide. Característica del Norte de Europa y Rusia. Frutos globosos, de color variable, con aquenios salientes.

-*Fragaria chiloensis* Duch.: Octoploide. Originaria de Chile y Argentina. Frutos de tamaño medio con pocos aquenios y poco aromáticos.

-*Fragaria ovalis* Rhydb: Octoploide. Originaria de Norteamérica. Fruto de tamaño medio, rosado, blando y con presencia de aquenios hundidos.

-*Fragaria virginiana* Duch: Octoploide. Originaria de Norteamérica. Frutos de buen tamaño, pero menores que los de *F. chiloensis*. Aquenios hundidos y color rosa a rojo oscuro, con pulpa blanca y aromáticos.

4.2.2. La frutilla cultivada

Frutos de *F. chiloensis* fueron llevados desde Chile hacia Europa por un Capitán de navío. No obstante, debido a que sólo se llevaron plantas femeninas estas no fructificaban. Sólo cuando se pusieron en contacto con otros individuos de flores hermafroditas de *F. Virginiana*, comenzaron a fructificar obteniéndose híbridos de *F. virginiana* como polinizadora de *F. chiloensis*. La frutilla cultivada actualmente se reconoce como un híbrido entre las dos especies mencionadas anteriormente y se designa como *Fragaria x ananassa* Duch., (Branzanti, 1989). El complejo origen de la especie, junto con la facilidad con la que ocurren los cruzamientos, ha dado lugar a un elevado número de cultivares con características diferenciales desde el punto de vista productivo y de calidad de fruto. La diseminación del cultivo de frutilla por casi todo el mundo se debe al desarrollo de variedades con distinto grado de adaptación ecológica y a los modernos sistemas de manejo de cultivo (Figura 2), lo cual hace posible su producción desde las regiones frías hasta las regiones tropicales y subtropicales.



Figura 2: Cultivo de frutillas.

4.2.3. Principales variedades cultivadas

Pájaro: El fruto se destaca por su calidad. De buen sabor, de forma tronco cónica regular, ligeramente alargado, color superficial rojo brillante e interior también coloreado. Es una de las variedades de mayor aceptación en el mercado internacional.

Chandler: Tiene buen tamaño, es firme, cuneiforme, buen sabor y color rojo por dentro, no tan regular como Pájaro. En determinadas condiciones climáticas se presenta una maduración incompleta, quedando el ápice de la fruta de color verde o blanco.

Camarosa: Variedad de día corto similar a 'Chandler' pero con mayor productividad total, frutos más grandes, más firmes. Presenta un fruto grande, muy precoz, de color rojo brillante externamente, coloreado interiormente y de buen sabor y firmeza.

Oso Grande: Su inconveniente es la tendencia del fruto al rajado. No obstante presenta buena resistencia al transporte. De color rojo anaranjado, forma de cuña achatada, calibre grueso y buen sabor.

Selva: Variedad de día neutro introducida en 1983 por la Universidad de California. Cuneiforme, color rojo anaranjado y no se oscurece. Buen tamaño y muy firme, no tiene muy buen sabor, es poco jugosa y muy dura al final de la temporada.

Douglas: El fruto es cuneiforme, corto, regular. Posee aquenios amarillos muy visibles, buen calibre. Es firme y se adapta bien al transporte. Se desprende con bastante facilidad del cáliz.

Fern: Fruto cónico, alargado y muy irregular. Es rojo brillante pero con tendencia al oscurecimiento. De tamaño medio y no muy firme, pero con buen sabor.

Seascape: Universidad de California, 1991. Variedad de día neutro similar a Selva. Se destacan su sabor, alto rendimiento, gran tamaño de frutos, firmeza, apariencia atractiva.

Sweet Charlie: Variedad de día corto, fruta de tamaño medio, roja y de excelente sabor. Presenta la ventaja sobre las demás variedades de ser resistente a antracnosis.

Milsei: Frutos grandes, cilíndricos, alargados, aquenios semi-hundidos, color rojo brillante, aromáticos, buena aptitud para el transporte, dureza similar a Chandler.

Rosa Linda: Frutas cónicas tamaño medio. Color rojo brillante, color interno rojo, más firme que Sweet Charlie, buen sabor y aromática.

Diamante: Produce frutos firmes de sabor y aroma no muy marcado. Poseen buen color interno y muy buen comportamiento de postcosecha. Al igual que Selva, produce durante toda la estación de crecimiento.

4.2.4. Morfología

La planta de frutilla puede vivir varios años, sin embargo dura uno o dos años en producción económica, ya que en cultivos de mayor edad las plantas se muestran manifiestamente más débiles, con bajo rendimiento y frutas de menor calidad debido a una mayor incidencia de plagas y enfermedades (PROEXANT, 2004).

Raíces: Son de aspecto fibroso, se originan en la corona, se dividen en primarias que son responsables del soporte y nacen en la base de las hojas, y secundarias que son más delgadas y de color marfil. Las raíces pueden penetrar en el suelo hasta 0,80 m, pero generalmente se encuentran en los primeros 0,40 m. Las raíces secundarias forman la masa radicular cuya función principal es la absorción de los nutrientes (Olías y col., 1998). Sólo se puede obtener una buena producción con un sistema radicular abundante y sano.

Tallo: La frutilla es una planta perenne manejada como anual, presenta un tallo de tamaño reducido denominado corona, lleva las yemas tanto vegetativas como florales y de ella nacen: las hojas, los estolones y las inflorescencias (Branzanti, 1989). En una corona sana, al hacer un corte vertical o transversal, se deben observar su centro de color claro, sin manchas o coloraciones rojizas, que serán índice de alguna enfermedad fúngica.

Hojas: Se hallan insertas en pecíolos de longitud variable, son pinadas o palmeadas, subdivididas en tres folíolos, pero es común que en algunas variedades existan 4 ó 5 (Figura 3). Tienen estípulas en su base y son de color verde intenso. Tienen un alto número de estomas, lo que permite su transpiración y a la vez las hace muy susceptibles a la falta de humedad.

Estolón: Es un brote delgado, largo, rastrero, que se forma a partir de las yemas axilares de las hojas situadas en la base de la corona. Se desarrollan en gran cantidad en épocas de alta temperatura y fotoperíodos prolongados. En el extremo del estolón se forma una roseta de hojas que en contacto con el suelo emite raíces, lo que origina una nueva planta con idénticos caracteres que la planta madre (Figura 3). Si todos los estolones se desarrollan libremente en forma radial, se obtienen hijas que después de su primer desarrollo emiten raíces. Sin embargo, en una plantación comercial no es aconsejable dejar crecer estos estolones ya que debilitan las plantas, bajando la producción de fruta. Los estolones constituyen el método más fácil de propagación (PROEXANT, 2004).



Figura 3: Morfología de la planta de frutilla.

Flores: La flor de la frutilla es de simetría actinomorfa (radial), pedunculada, con un grueso receptáculo que se hipertrofia después de la fecundación para convertirse en la parte carnosa y comestible. Las flores pueden ser perfectas (hermafroditas), con órganos masculinos y femeninos (estambres y pistilos), o imperfectas con un solo órgano masculino o femenino (unisexuales). Cada flor perfecta está constituida por un cáliz, compuesto normalmente por 5 sépalos, o más frecuentemente por un número variable, una corola compuesta generalmente por 5 pétalos que a menudo pueden ser

más de 12, generalmente blancos de forma variable, desde elípticos a redondeados u ovalados (Figura 4). Posee numerosos órganos masculinos (estambres), compuestos cada uno por filamentos de longitud variable, que sostienen las anteras. Las mismas están dispuestas en tres verticilos, fundamentalmente en número múltiplo de 5, desde 5 hasta 40, insertos en la periferia de un órgano que tiene la forma de copa invertida (receptáculo). Las flores son de color blanco-rosado, se ubican en inflorescencias largas y son polinizadas por insectos, en especial por abejas y por el viento (Branzanti, 1989). Si la polinización no es completa y quedan pistilos sin polinizar, el fruto resulta deformado. Por esta razón, es recomendable el uso de colmenas en un frutillar. Las flores insertas en el eje central de la inflorescencia se abren primero y dan frutos más grandes, mientras que las insertas en los ejes secundarios y terciarios y sucesivos tienen un número menor de pistilos y dan frutos de menor dimensión. Es frecuente que las flores más tardías no den fruto sino que aborten.



Figura 4: Flores de frutilla.

Inflorescencia: Las flores están agrupadas en inflorescencias. Poseen tallos modificados, en las que una bráctea sustituye en cada nudo a una hoja, mientras que la yema axilar de ésta se desarrolla en una rama secundaria o eje de la inflorescencia (Olías y col., 1998). Las inflorescencias son del tipo cimoso que pueden tener un raquis con ramificación alta o ramificación basal. En el primer caso dan una mayor facilidad para la recolección.

Fruto: Es un fruto múltiple denominado botánicamente "eterio", cuyo receptáculo constituye la parte comestible (Figura 5). Los aquenios, llamados vulgarmente semillas, son frutos secos indehiscentes, uniseminados, de aproximadamente 1 mm de largo, que se encuentran insertados en la superficie del receptáculo o en pequeñas depresiones más o menos profundas denominadas criptas. El color de los aquenios puede ser amarillo, rojo, verde o marrón. Un fruto mediano suele tener de 150 a 200 aquenios, pudiendo llegar hasta 400 en los frutos de gran tamaño. Después de la fecundación, los óvulos al convertirse en aquenios estimulan el engrosamiento del receptáculo que finamente constituirá la parte comestible. El receptáculo maduro tiene hasta 5 cm de diámetro de forma achatada, globosa, cónica, reniforme, redondeada, alargada, etc (Branzanti, 1989). Su color puede ser rosado, carmín, rojo o púrpura. El receptáculo presenta una gran variedad de sabores, aromas y una textura que caracteriza a cada variedad. En la base del fruto se encuentra el cáliz con sépalos adherentes, libres o reflexos y de color verde, aunque en ciertos casos pueden presentar tintes rojizos.

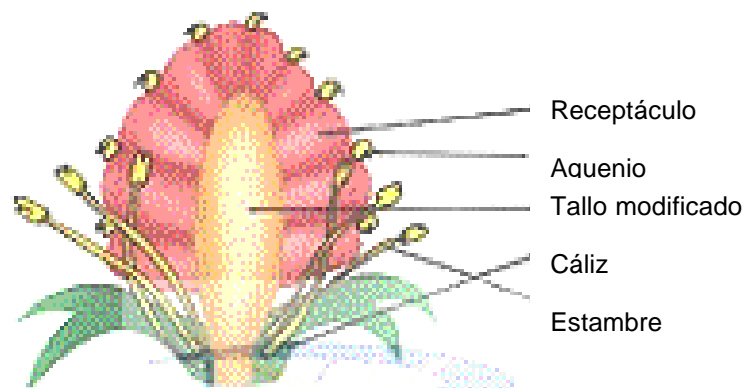


Figura 5: Estructura del fruto.

4.3. MADURACION DE FRUTILLAS

4.3.1. Crecimiento

Los frutos muestran un crecimiento rápido logrando el máximo tamaño 30 días luego de la antesis dependiendo de las condiciones ambientales. La cinética de crecimiento muestra patrones diferentes según el cultivar estudiado. En algunos casos se observan curvas sigmoideas simples (Forney y Breen, 1985; Stutte y Darnell, 1987) mientras que en otros se han descrito curvas doble sigmoideas (Archbold y Dennis, 1984; Perkins-Veazie y Huber, 1987). El tamaño de los frutos está influenciado por la posición en la inflorescencia. Los frutos primarios presentan mayor tamaño que los secundarios y estos a su vez son más grandes que los terciarios (Moore y col., 1970). Las tasas de crecimiento de los frutos primarios y secundarios son similares, pero los últimos presentan una mayor fase de retardo para iniciar el crecimiento activo lo que determina un menor tamaño final. La remoción de los frutos primarios provoca un incremento en el tamaño de los frutos secundarios, indicando un proceso de competencia entre los frutos de la misma inflorescencia. El tamaño final de los frutos se encuentra además correlacionado positivamente con el tamaño y número de aquenios formados.

4.3.2. Desarrollo y maduración

El tiempo necesario para que los frutos se desarrollen totalmente depende de la temperatura (Perkins-Veazie y Huber, 1987) y puede variar entre 20 y 60 días. El proceso de maduración ocurre rápidamente y las condiciones de calidad del fruto se mantienen por un corto tiempo. Este proceso involucra cambios en el color (Figura 6), sabor y textura (Manning, 1993).



Figura 6: Estadios de desarrollo de frutillas.

Composición del fruto

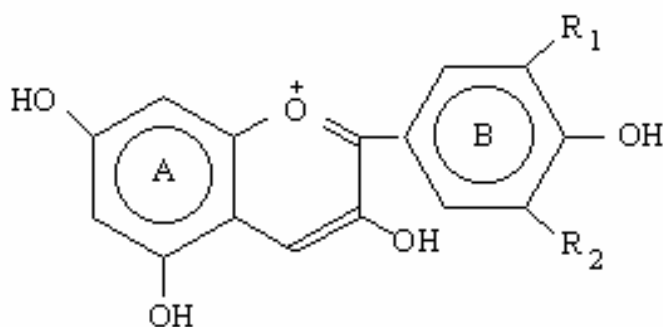
Agua: Es el componente más abundante de los frutos, encontrándose en niveles comprendidos entre 89 y 94% (Tabla 4). Los frutos son altamente sensibles a la deshidratación, lo que determina que sea recomendable realizar el almacenamiento postcosecha a 90-95% de humedad relativa y evitar cualquier tipo de daños ya que facilitarían la deshidratación (Oliás y col., 1998).

Azúcares: Los azúcares son uno de los principales componentes de frutillas (Tabla 4). La sacarosa, glucosa y fructosa representan más del 99% del total en los frutos maduros, encontrándose xilitol, sorbitol y xilosa en pequeñas proporciones (Makinen y Soderling, 1980). La glucosa y fructosa se encuentran en proporciones similares en frutos maduros y constituyen un 83% del total de los azúcares (Wrolstad y Shallenberger, 1981). Si bien el contenido de azúcares es variable según el cultivar, época del año y ubicación geográfica, la relación entre glucosa y fructosa se mantiene relativamente constante. Con respecto a los cambios durante el desarrollo y maduración, el contenido de sacarosa es muy bajo en los primeros días post-antesis, pero luego aumenta hasta el viraje de los frutos para mostrar un nuevo descenso en los últimos estadios. En el caso de la glucosa y fructosa, luego de los 10 días post-antesis se observa un incremento hasta el final de la maduración de los frutos (Woodward, 1972).

Ácidos: Después de los azúcares, los ácidos constituyen los componentes más abundantes de los sólidos solubles. Los ácidos orgánicos poseen importancia desde el punto de vista de la calidad organoléptica (Hulme, 1971). Por otra parte pueden regular el pH a nivel vacuolar y con ello afectar la coloración de los frutos. La acidez se incrementa hasta el estadio verde y luego se observa un descenso en la medida que progresa el proceso de maduración. El ácido más abundante en frutilla es el ácido cítrico aunque también se encuentran cantidades considerables de ácido málico y en menor medida, ácido ascórbico, isocítrico, succínico, oxalacético, glicérico y glicólico. Los niveles de acidez son variables, pudiéndose encontrar valores de 0,5 a 1,5% (Mitchell y col., 1996). Durante la maduración la acidez disminuye, siendo las variaciones en los ácidos málico y cítrico las responsables de las diferencias de acidez entre frutos maduros y sobremaduros.

Vitamina C: El ácido ascórbico no se aisló hasta 1932. Se trata de un componente esencial para la dieta, cuya deficiencia puede ocasionar escorbuto. Las frutas y hortalizas son en general una fuente importante de vitamina C. No obstante, los niveles encontrados en los diferentes productos son muy variables. El contenido de ácido ascórbico en frutos blandos y particularmente en frutilla es elevado (500 mg kg^{-1}) aunque los niveles oscilan dependiendo de la variedad, estado de madurez y condiciones de cultivo. El ácido ascórbico es una de las vitaminas más lábiles, por lo que el adecuado manejo de postcosecha es fundamental para evitar caídas abruptas en sus niveles (Olías y col., 1998).

Pigmentos: Las antocianinas se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas y son las responsables del color rojo, rosado, púrpura y azul de muchas flores y frutos. Son derivados de los flavonoides solubles en agua, los cuales pueden encontrarse acetilados y glicosilados. El aglicón se conoce como antocianidina. Existen 6 antocianidinas comunes (Figura 7).



R_1	R_2	Antocianidina
H	H	Pelargonidina
OH	H	Cianidina
OH	OH	Delfinidina
OCH_3	H	Peonidina
OCH_3	OH	Petunidina
OCH_3	OCH_3	Malvidina

Figura 7: Estructura de las principales antocianidinas presentes en plantas.

Las antocianidinas raramente se encuentran en forma libre, ya que forman glicósidos denominados antocianinas. Los azúcares presentes pueden incluir a la glucosa, ramnosa, galactosa y arabinosa. A su vez los azúcares generan nuevos sitios de modificación ya que pueden estar acetilados con ácidos como el p-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, acético, malónico o p-hidroxibenzoico. Debido a la diversidad en la glicosilación y acetilación existen por lo menos 300 antocianinas diferentes. Las antocianinas son los pigmentos responsables del color de la frutilla siendo el principal compuesto presente el pelargonidín-glicósido (Manning, 1993). Finalmente resulta de interés que estos compuestos poseen capacidad antioxidante lo que determina su relevancia no sólo desde el punto de vista estético sino también desde el punto de vista nutricional.

Tabla 4: Composición química y nutricional de frutillas.

Componente	Valor para 100 g de fruto
Agua	89-94 g
Hidratos de Carbono	5-10 g
Proteínas	0,5-0,9 g
Grasa	0,1-0,4 g
Cenizas	1-3 g
Calorías	37 kcal
Vitamina A	60 UI
Vitamina C	20-70 mg
Tiamina	0,03 mg
Riboflavina	0,07 mg
Niacina	0,6 mg
Hierro	1 mg
Sodio	1 mg
Potasio	164 mg
Calcio	21 mg
Fósforo	21 mg

Generalidades de fisiología de frutillas

La frutilla, al igual que otros frutos, requiere de un aporte continuo de energía para poder llevar adelante los procesos metabólicos. Esta energía es obtenida mediante el proceso de respiración. La diferencia de los frutos cosechados con respecto a los unidos a la planta madre es que en el momento de la recolección los frutos son privados de la fuente de agua y compuestos orgánicos. De este modo, consumen durante la postcosecha sus reservas a fin de poder conservar la homeostasis. En el caso particular de frutilla, la tasa respiratoria es elevada (50-100 ml CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ a 20°C) por lo que resulta fundamental el control de este proceso mediante tecnologías adecuadas a fin de evitar el deterioro del fruto (Mitchell y col., 2000).

Regulación del proceso de maduración

La frutilla es considerada un fruto no-climatérico debido a la ausencia de un pico respiratorio durante el proceso de maduración (Olías y col., 1998). No obstante, el etileno muestra algunos efectos sobre el proceso de maduración de frutillas acelerando el desarrollo de color. A pesar de esto se considera que el etileno no es una de las hormonas fundamentales desde el punto de vista de la regulación del proceso de maduración. Los estudios iniciales mostraron que el crecimiento del receptáculo es regulado por los aquenios, que la aplicación de auxinas sintéticas permite restablecer el crecimiento en receptáculos en los que los aquenios han sido removidos y que lo mismos son una fuente de ácido indol-3-acético. Con respecto a la influencia de las auxinas en la maduración, la hipótesis de que resultan fundamentales en dicho proceso comenzó a apoyarse a partir de fines de 1980. En un estudio Given y col. (1988c) mostraron que la remoción de los aquenios de la mitad de un fruto verde acelera el proceso de maduración, mientras que la aplicación exógena de ANA previene el avance de la maduración. La hipótesis propuesta por los autores sostiene que la producción de auxinas en los aquenios inhibe la maduración en frutos verdes, y que a medida que el fruto se desarrolla disminuye el contenido de auxinas en los aquenios, modulando la maduración. Trabajos más recientes utilizando técnicas de genómica, muestran que un gran número de genes cuya expresión se incrementa durante la maduración son reprimidos por auxinas, apoyando la teoría mencionada anteriormente (Aharoni y col., 2002). No obstante, esto no se cumple para todos los genes inducidos durante el proceso normal de maduración de frutillas (Aharoni y col., 2002; Civello y col., 1999), por lo que deberían existir otros reguladores del proceso de maduración.

4.4. GENERALIDADES DE CALIDAD Y POSTCOSECHA DE FRUTILLAS

Cosecha: Las frutillas deben cosecharse como mínimo cuando presentan más de un 50% de su superficie color rojo (SAGPYA, 1998). No obstante los azúcares continúan acumulándose hasta el final de la maduración, por lo que la cosecha temprana disminuye la calidad organoléptica. Las frutillas deben ser cosechadas con el mayor cuidado para poder llegar al mercado en buenas condiciones. En los meses calurosos, es deseable cosechar en las horas más frescas del día. Usualmente la cosecha tiene lugar cada dos días durante el período que corresponde al pico de producción, pero muchas veces se hace necesario efectuar una recolección diaria. Los frutos cosechados deben colocarse delicadamente en el recipiente de recolección, separando aquellos defectuosos o fuera de tipo.

Parámetros de calidad: Los parámetros a tener en cuenta incluyen la apariencia (color, forma, tamaño, ausencia de defectos), firmeza, sabor (sólidos solubles, acidez, aroma), y valor nutricional (vitamina C). Se recomiendan niveles de sólidos solubles de 7% y de acidez de 0,8%. El cáliz debe presentarse verde y turgente (Mitchell y col., 1996).

Recomendaciones generales de manejo postcosecha: La frutilla presenta una elevada tasa respiratoria (Tabla 5). Por este motivo se recomienda su almacenamiento a 0-1°C y un 90-95% de humedad relativa (Mitcham, 1996). Bajo estas condiciones su vida de postcosecha es de 7-10 días.

Tabla 5: Actividad respiratoria de frutillas. Fuente: Mitchell y Mitcham, 1996.

	0°C	10°C	20°C
Actividad respiratoria (ml CO₂ kg⁻¹h⁻¹)	6-10	25-50	50-100

Con respecto al etileno la producción es muy baja (< 0.1 µl C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹ a 20°C) y la respuesta de los frutos a esta hormona no es muy marcada (Kader, 1992). No obstante la remoción del etileno de la atmósfera de almacenamiento reduce la incidencia de enfermedades. Las enfermedades y el ablandamiento excesivo son las principales causas de deterioro en frutillas por lo que debe prestarse especial atención a estos aspectos a fin de extender su vida postcosecha (Salunkhe y Desai, 1984).

Capítulo I

***“Efecto de tratamientos térmicos
de alta temperatura sobre calidad
y vida postcosecha
de frutillas”***

1. INTRODUCCIÓN

Existe una elevada preocupación de los consumidores respecto a la inocuidad de los productos así como un incremento en las exigencias de calidad de los mismos (Klein y Lurie, 1991). Esto ha aumentado la necesidad de encontrar métodos alternativos en el manejo de productos frutihortícolas (Lurie, 1998). Los métodos térmicos resultan de interés como alternativas o complemento de los tratamientos químicos tradicionales durante el almacenamiento de postcosecha y han sido utilizados por más de un siglo para controlar patógenos (Grondeau y Samson, 1994). Más recientemente se ha descrito que pueden modificar numerosos aspectos vinculados con la fisiología de los frutos. Esto ha determinado que se encuentren actualmente estudiando con detenimiento las potencialidades de su aplicación y su adaptación a escala comercial (Fallik, 2004).

1.1. Métodos de aplicación

La aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura en frutos puede realizarse utilizando agua caliente, vapor o aire caliente (Lurie, 1998).

a. Tratamientos con agua caliente

El agua caliente fue utilizada en un principio para el control de hongos pero su uso luego se extendió para el control de insectos. Estos tratamientos resultan útiles en muchos casos para el control de hongos ya que las esporas de los mismos se encuentran en forma latente a nivel superficial o entre las primeras capas de células por debajo de la piel de los frutos. Los tratamientos por lo común se aplican durante pocos minutos, ya que el agua es un medio de transferencia de calor más eficiente que el aire (Shellie y Mangan, 1994). Muchos productos pueden tolerar la exposición a temperaturas entre 50-60°C por 10 min, pero el control de hongos se puede realizar en condiciones menos drásticas (Barkai-Golan y Phillips, 1991). También se han realizado tratamientos térmicos con agua mediante ducha (Fallik, 2004). Para ello se utilizan máquinas que pueden asperjar agua caliente sobre los productos y que pueden adicionarse a las líneas tradicionales de clasificación y acondicionamiento (Fallik y col., 1996a). En ellas los productos son transportados por una serie de rodillos rotatorios y mediante picos aspersores son sometidos a una ducha con agua caliente. Este tipo de tratamiento resulta de utilidad tanto para controlar patógenos como para eliminar suciedad de las superficie de los productos (Prusky y col., 1999; Fallik y col., 1996b,c).

Los tratamientos con agua caliente también se han utilizado para el control de insectos (Couey, 1989; Paull, 1994). En estos casos, los tiempos de inmersión son más prolongados a temperaturas inferiores a 50°C, a diferencia del control de muchos hongos que suele realizarse por unos pocos minutos a temperaturas entre 45 y 60°C.

b. Tratamientos con vapor

Estos tratamientos consisten en colocar los frutos en contacto con aire saturado con vapor a temperaturas entre 40 y 50°C, a fin de matar huevos y larvas de insectos y se emplean como tratamientos cuarentenarios en forma previa a los embarques (APHIS, 1998). La transferencia de calor se produce por la condensación del vapor de agua en las superficies frías. Este procedimiento fue utilizado en un principio para el control de la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wiedemann) y de la mosca Mexicana (*Anastrepha ludens* Loew) (Baker, 1952). No obstante, cuando el dibromuro de etilo y el bromuro de metilo comenzaron a utilizarse como fumigantes a un bajo costo, los tratamientos con vapor fueron abandonados. Con la prohibición del uso del dibromuro de etilo en 1984 y la inminente prohibición del bromuro de metilo en el 2010, es muy probable que los tratamientos con vapor comiencen a expandir su uso nuevamente (Klein y Lurie, 1991).

c. Tratamientos con aire caliente

El aire caliente puede aplicarse colocando los frutos en cámaras de calentamiento con o sin aire forzado. El proceso de calentamiento con aire es más lento que en el caso de los tratamientos con agua o vapor, lo que determina en general la realización de tratamientos más prolongados. Los tratamientos térmicos con aire caliente resultan de especial interés para estudiar los efectos fisiológicos sobre los frutos (Klein y Lurie, 1991; 1992). Por otra parte, resultan la única estrategia posible en el caso de frutos que puedan ser afectados por elevada humedad o mojado superficial. En el caso de los tratamientos para el control de insectos, la utilización de tratamientos con aire caliente resulta beneficiosa en algunos productos que puedan ser sensibles al calentamiento a velocidades elevadas. Se han desarrollado tratamientos con aire caliente para el control de mosca del Mediterráneo, mosca del melón y mosca oriental en papayas (Armstrong y col., 1995). La exposición a altas temperaturas con aire caliente forzado también puede reducir el ataque de *Botrytis cinerea* (Klein y col., 1997; Fallik y col., 1993) y de *Penicillium expansum* en manzanas (Fallik y col., 1996c; Klein y col., 1997).

1.2. Objetivos buscados mediante la realización de tratamientos térmicos de alta temperatura

Los efectos beneficiosos de los tratamientos térmicos de alta temperatura se encuentran bien documentados (Lurie, 1998; Klein y Lurie, 1991). Su utilización puede orientarse a la búsqueda de uno o más de los siguiente objetivos:

a. Control de insectos

La utilización de tratamientos térmicos para el control de insectos comenzó a realizarse a comienzos del siglo XX (Baker, 1952). Este autor encontró que huevos y larvas de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* morían luego de 8 h a 43°C. El principal método utilizado con este fin es el tratamiento con vapor. Cada producto posee diferentes requerimientos con respecto a la tasa de calentamiento y el tiempo que puede mantenerse a 43-46°C sin sufrir daño. Se han utilizado para cítricos (Hawkins, 1932), papaya (Seo y col., 1974), pimiento verde (Sugimoto y col., 1983), berenjena (Furusawa y col., 1984), mango (Merino y col., 1985) y otros productos.

En el caso de tratamientos con agua caliente, el pre-acondicionamiento de pepinos a 32°C por 24 h permitió que los frutos fueran luego mantenidos a 45°C por 1 h a fin de controlar la mosca del melón, sin sufrir daño alguno (Chan y Linse, 1989).

b. Reducción del ataque de patógenos

Otro posible objetivo buscado mediante la aplicación de tratamientos térmicos es la reducción de la incidencia de enfermedades de postcosecha. Los tratamientos para control de patógenos pueden realizarse por cualquiera de los tres métodos mencionados anteriormente (agua, aire o vapor). La utilidad de tratamientos con agua a 45-55°C por 10-20 min para el control de *Colletotrichum gloeosporoides* y *Phytophthora palmivora* en papaya y *Monilia fruticola* y *Rhizopus stolonifer* en duraznos ha sido descrita (Smith, 1971; Couey y col., 1984).

c. Disminución de la incidencia de alteraciones fisiológicas

Estudios con diferentes organismos han demostrado que la exposición a temperaturas elevadas subletales induce termotolerancia, lo cual los protege de una segunda exposición a temperaturas normalmente letales. La síntesis de proteínas de shock térmico (HSP) es parte de la respuesta de todos los organismos al estrés por altas temperaturas (Lindquist, 1986). La correlación entre HSP y termotolerancia ha sido establecida en diferentes organismos.

En los últimos años, ha sido hallado que el estrés ocasionado por altas temperaturas puede acondicionar a los vegetales a las bajas temperaturas. Salveit (1991) encontró que la aplicación de TAT redujo la sensibilidad al frío en pepino. En el caso de tomates la aplicación de TAT por 2-3 d a 30°C, permitió que los frutos puedan almacenarse hasta 2 meses a 2°C sin sufrir daño por frío (Lurie y Klein, 1991; Lurie y Sabehat, 1997). Esta respuesta ha sido encontrada en numerosos productos incluyendo palta (Woolf, 1995), cítricos (Rodov y col., 1995), pepino (McCollum y col., 1995), mango (McCollum y col., 1993), pimiento (Mencarelli y col., 1993), caqui (Burmeister y col., 1997; Lay-Yee y col., 1997) zuchini (Wang, 1994) y otros. No obstante, las respuestas suelen depender del cultivar analizado. El daño por frío ha sido asociado con alteraciones a nivel de las membranas celulares (Lyons, 1973), y los tratamientos térmicos de alta temperatura suelen provocar modificaciones en las mismas. Tratamientos a 35-40°C reducen la pérdida de electrolitos (indicador de daño en membranas) cuando los frutos se almacenan a temperaturas en las cuales sufren daño por frío (Saltveit, 1991). Cuando se analizó la composición de membranas en frutos tratados térmicamente a 38°C por 4 d se observó un incremento en la insaturación y en el contenido de fosfolípidos respecto a los frutos no tratados (Lurie y col., 1995). Whitaker y col. (1997), analizando el contenido lipídico de membranas, también encontraron una mayor insaturación en frutos sometidos a tratamientos térmicos de alta temperatura (TAT). Estas modificaciones podrían provocar una mayor fluidez de las membranas a bajas temperaturas, y evitar así el daño.

Otras alteraciones fisiológicas han sido reducidas mediante la aplicación de TAT. En el caso de manzanas la escaldadura superficial es un problema que ocasiona manchas en los frutos desmereciendo su valor comercial, y que ha sido correlacionado con la oxidación del α -farneseno, un componente presente en las ceras de los frutos (Huelin y Coggiola, 1970a,b). La aplicación de TAT permitió inhibir la incidencia de escaldadura superficial en manzana. Asimismo otra alteración como el pardeamiento enzimático también fue reducida mediante la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura en peras (Maxie y col., 1974) y lechuga (Saltveit, 2000).

d. Retraso del proceso de maduración

La maduración de frutos se caracteriza por cambios en el color, ablandamiento de la pulpa, e incrementos en la relación entre azúcares y ácidos. La exposición de frutos a altas temperaturas atenúa algunos procesos mientras que acentúa otros. Esta situación anómala resulta en frutos que pueden mantener su calidad por más tiempo respecto a los frutos no tratados (Shellie y Mangan, 1994). La exposición a temperaturas superiores a 35°C ocasiona la inhibición del proceso de maduración en diferentes frutos (Paull, 1990; Lurie, 1998). El calentamiento de tomates verdes por 2 ó 3 d a 30°C inhibió reversiblemente la maduración y disminuyó las pérdidas durante el almacenamiento (Lurie y Sabehat, 1997). Considerando que el proceso de maduración requiere la ejecución de un programa finamente controlado a nivel genético, un aspecto central a estudiar es el efecto del estrés de alta temperatura sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

d.1. Metabolismo de proteínas

La exposición de peras a temperaturas de 40°C provoca la interrupción en la síntesis de proteínas al provocar una alteración en los polisomas. Esta respuesta es reversible y existe una buena correlación entre la síntesis de proteínas y el progreso del proceso de maduración. El retraso en el ablandamiento de papaya por la aplicación de tratamientos térmicos correlaciona con la disminución en los niveles normales de poligalacturonasa (Chan y col., 1981; Paull y Chen, 2000). No obstante no sólo se observa una disminución en la síntesis de proteínas sino un redireccionamiento del proceso (Lurie y Klein, 1991). La síntesis de proteínas de shock térmico se incrementa en células de pera expuestas a temperaturas de 40°C por 8 h (Ferguson y col., 1994). En manzanas mantenidas a 38°C por 4 d se observó una reducción en la síntesis total de proteínas y la aparición de nuevos polipéptidos de 14-22 kD, 68 y 92 kD correspondiendo con los pesos moleculares de las HSP (Klein y Lurie, 1991). Las HSPs poseen un rol fundamental en la función celular durante el estrés a las altas temperaturas (Vierling, 1991). La función de algunas HSPs estaría vinculada con la prevención de la agregación y del plegamiento inadecuado de proteínas (Vierling, 1997). Resulta de interés remarcar que si bien el estrés térmico de alta temperatura provoca un incremento en la síntesis de proteínas de shock térmico, muchas de las cuales cumplen la función de chaperonas, el aumento en la síntesis de proteínas vinculadas a otras funciones metabólicas también ha sido descrito.

Así, Lurie (1997) encontró que la aplicación de TAT induce la síntesis de una peroxidasa aniónica que podría participar en respuestas de defensa contra *Botrytis cinerea*. Se ha descrito también que la ascorbato peroxidasa, enzima participante en el control de los niveles de peróxido de hidrógeno a nivel celular, puede inducirse en respuesta a tratamientos térmicos. Storozhenko y col. (1998) y Panchuk y col. (2002) encontraron que la región del promotor de APX presenta regiones de respuesta a shock térmico. Otros cambios observados como consecuencia de los TAT involucran además cambios como la desaturación de las membranas plasmáticas lo cual juega un rol en el proceso de aclimatación (Lurie y col., 1995). Por otra parte, han sido descritos incrementos en compuestos de naturaleza no proteica como consecuencia de la aplicación de TAT. Ben Yehoshua y col. (1995) encontraron un incremento de escoparona (un compuesto con capacidad antimicrobiana) en naranjas tratadas térmicamente. Por lo tanto, las respuestas de los frutos a los tratamientos térmicos de alta temperatura no involucrarían sólo una disminución en la síntesis de proteínas y metabolitos relacionadas con la maduración y un aumento de la síntesis de proteínas de shock térmico, sino también la síntesis de nuevos compuestos y proteínas que modulan una respuesta compleja de los frutos a una nueva situación.

d.2. Metabolismo de ácidos nucleicos

La síntesis de mRNAs específicos es requerida durante el proceso de maduración (Picton y Grierson, 1988). Las temperaturas elevadas pueden provocar una reducción en la expresión de mRNAs vinculados a este proceso (Picton y Grierson, 1988). Esto puede ocurrir debido a modificaciones tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Biggs y col., 1988). Las células sometidas a estrés térmico reprograman su maquinaria transcripcional (Nover, 1991). La traducción de mRNAs no vinculados con la respuesta al estrés es suprimida temporariamente aunque los mensajes no traducidos no son degradados (Nover y col., 1989).

1.3. Aplicación de tratamientos térmicos en frutillas

Como se mencionó anteriormente, la frutilla es un producto altamente perecedero, con una vida postcosecha muy corta principalmente debido a su alta tasa de ablandamiento y a su elevada susceptibilidad al ataque de patógenos. Pocos estudios se han realizado analizando el efecto de la aplicación de tratamiento térmicos de alta temperatura en frutos blandos.

García y col. (1995a) describieron que el tratamiento con agua caliente en frutillas cv Tudla redujo el ataque de patógenos, incrementó el contenido de sólidos solubles y redujo la acidez mejorando las características organolépticas de los frutos. La aplicación de tratamientos térmicos (42 o 48°C por 3 h) también redujo el ataque de hongos en frutillas cv. Selva y disminuyó la síntesis de proteínas (Civello y col., 1997). Desde el punto de vista práctico, resulta poco probable la utilización de TAT sin el complemento de la refrigeración. Por lo tanto resulta de interés analizar si la combinación de tratamiento térmicos de alta temperatura con almacenamiento refrigerado permite extender los beneficios de la refrigeración en forma aislada.

En el presente capítulo se realiza la selección de tratamientos térmicos adecuados para frutillas cv. Selva. También se caracteriza el tratamiento seleccionado y se examina el efecto de su aplicación en combinación con el almacenamiento refrigerado sobre la calidad y vida postcosecha de frutillas, así como su evolución una vez que los frutos se transfieren a 20°C a fin de simular un proceso tradicional de distribución.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y selección de tratamientos

Se utilizaron frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Selva. Los frutos se obtuvieron de productores de la zona de La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Se cosecharon frutos con 75% de color superficial rojo y se trasladaron inmediatamente al laboratorio. Los frutos con presencia de defectos se eliminaron.

2.1.1. Tratamientos con aire caliente

Se colocaron ciento ochenta frutos en bandejas plásticas (10 frutos por bandeja) y se cubrieron con PVC (15 μm de espesor); luego se trataron a 42, 45 y 48°C por 1 y 3 horas. Finalizado el tratamiento, las bandejas se abrieron y los frutos se almacenaron a 20°C por 4 d. Los controles sin tratamiento térmico se almacenaron directamente a 20°C. Al finalizar el almacenamiento se determinó el porcentaje de frutos con ataque de patógenos.

2.1.2. Tratamientos con agua caliente

Se sumergieron ciento ochenta frutos en agua a 42, 45 y 48°C por 1 y 5 min. Finalizado el tratamiento los frutos se colocaron en bandejas plásticas (10 frutos por bandeja) y se almacenaron a 20°C por 4 d. Los controles sin tratamiento térmico se almacenaron directamente a 20°C. Al finalizar el almacenamiento se determinó el porcentaje de frutos con ataque de patógenos.

2.2. Caracterización del tratamiento térmico con aire caliente

2.2.1. Perfil térmico

Los cambios en la temperatura del aire y de los frutos durante el tratamiento térmico se midieron insertando una termocupla de cobre-constantan (1 mm de diámetro), 10 mm de profundidad en la zona ecuatorial de 4 frutos. Adicionalmente, dos termocuplas se utilizaron para medir la temperatura del aire. Los datos se adquirieron cada 10 s utilizando una tarjeta de adquisición (Keithley Instruments Inc., Modelo DAS-TC, Tautow, MA, USA). El experimento se repitió en tres oportunidades.

2.2.2. Perfil de humedad

El cambio en la humedad relativa (HR) en la atmósfera alrededor de los frutos se siguió durante las 3 h del tratamiento térmico. Para esto se utilizó un detector de punto de rocío de espejo refrigerado (Modelo M4/1111H-SR, General Eastern Instruments, Woburn, MA, USA), conectado a un monitor Hygro M1. El sensor se colocó en el interior de una bandeja conteniendo los frutos y cubierta con PVC. Los datos se adquirieron cada 5 min durante el tratamiento térmico. Los valores de HR se calcularon como $ps (Tr) / ps (Ta)$, siendo Tr la temperatura de punto de rocío y Ta la temperatura de bulbo seco, medidas ambas en el interior de la bandeja, mientras que ps es la presión de vapor de saturación correspondiente a estas temperaturas.

2.2.3. Pérdida de peso durante el tratamiento

A fin de determinar la pérdida de peso producida durante el tratamiento, se pesaron 10 frutos, se colocaron en una bandeja plástica, se cubrieron con PVC y se trataron térmicamente a 45°C por 3 h. Una vez finalizado el tratamiento, los frutos se pesaron nuevamente. Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso. El experimento se repitió tres veces.

2.2.4. Actividad respiratoria

La actividad respiratoria durante el tratamiento se midió colocando 100 g de frutos (aproximadamente 15 frutos) en jarras de 1000 ml. Las jarras se cerraron herméticamente y se colocaron a 45°C por 3 h. Durante este período se tomaron muestras de 500 μ l de la atmósfera dentro del recipiente con una jeringa. El análisis de gases se realizó utilizando un cromatógrafo gaseoso Varian CX 3400 equipado con una columna CTR I (Alltech, San José, CA, USA) y un detector de conductividad térmica (TCD). Las temperaturas en el inyector, columna y detector fueron de 120, 30 y 120°C respectivamente. Se utilizó helio como fase móvil y el flujo fue de 20 ml min^{-1} . Se calculó la actividad respiratoria y los resultados se expresaron como ml de CO_2 kg^{-1} h^{-1} . Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3. Efecto de tratamientos térmicos en combinación con el almacenamiento refrigerado sobre calidad y vida postcosecha de frutillas

Doscientos frutos se colocaron en bandejas plásticas, se cubrieron con PVC y se mantuvieron por 3 h en una estufa sin circulación de aire a 45°C. Finalizado el tratamiento, las bandejas se colocaron a 0°C por 0, 7 y 14 d y luego se transfirieron a 20°C por 5 d. Los controles sin tratamiento térmico se almacenaron directamente a 0°C o 20°C. Las muestras se tomaron a los tiempos de almacenamiento indicados anteriormente y se utilizaron inmediatamente o se congelaron los frutos en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.3.1. Pérdida de peso

Sesenta frutos se pesaron al comienzo del experimento, durante el almacenamiento a 0°C y luego de la incubación a 20°C. Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso.

2.3.2. Color

El color superficial se evaluó con un colorímetro (Minolta, Modelo CR-300, Osaka, Japón) midiendo el parámetro L* y el ángulo hue en 6 zonas de cada fruto. Se analizaron treinta frutos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

2.3.3. Antocianinas

Los frutos se procesaron en un molinillo refrigerado (Tekmar, modelo A-10, Cole-Parmer, Chicago, IL, USA) y 1 g del polvo resultante se colocó en 10 ml de metanol-HCl (1% v/v) y se mantuvo a 0°C por 10 min. Luego se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4°C, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 515 nm. Los resultados se expresaron como micromoles de pelargonidín-3-glucósido por kilogramo de fruto, utilizando $E_{\text{molar}} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Woodward, 1972). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.4. Firmeza

La firmeza de los frutos se analizó utilizando una prensa Instron (Modelo 1011, Instron Corp., MA, USA) equipada con una sonda plana (8 mm). Se realizó un ensayo de penetración y se registró la fuerza máxima en N durante el mismo. Cada fruto se midió 2 veces en la zona central y se realizaron 60 mediciones para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

2.3.5. Acidez y pH

Frutos congelados se procesaron en un molinillo refrigerado y 10 g del polvo resultante se suspendieron en 100 ml de agua. El pH de la muestra se determinó con un pH-metro y las titulaciones se realizaron con NaOH 0,1 M hasta pH 8,1 (AOAC, 1980). La acidez titulable se expresó como miliequivalentes de H⁺ por kg de fruto fresco. Dos muestras independientes se analizaron para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento, y cada muestra se tituló por duplicado.

2.3.6. Azúcares totales y reductores

Frutos congelados se trituraron en un molinillo y 1 g del polvo resultante se extrajo por 30 min con 10 ml de etanol a 25°C. La mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 10 min y 1 ml del sobrenadante se llevó a 50 ml con H₂O. El contenido de azúcares reductores se determinó espectrofotométricamente a 520 nm utilizando una modificación del método de Somogyi-Nelson (Southgate, 1976). Para la determinación de azúcares totales las muestras se hidrolizaron previamente en un baño a 100°C con HCl 0,1 M por 10 min y luego se procesaron como se describió anteriormente. Los resultados se expresaron como g de glucosa por kg de fruto fresco. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.7. Ataque de patógenos

Se utilizaron treinta frutos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado. Para prevenir la contaminación entre frutos, cada frutilla se colocó en una bandeja individual y se cubrió con PVC. Se evaluó la presencia de hongos. Los resultados se expresaron como porcentaje de frutos atacados.

2.4. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial. Los resultados se analizaron por medio de un ANOVA y las medias se compararon con un test LSD a un nivel de significancia de 0,05.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Selección de tratamientos

A fin de seleccionar un tratamiento adecuado, los frutos se trataron con agua caliente a 42, 45 y 48°C por 1 y 5 min y con aire caliente a 42, 45 y 48°C por 1 y 3 h. Los frutos tratados con aire a 42°C por 1 h no mostraron diferencias en el porcentaje de frutos dañados respecto a los controles (Figura I.1). Los tratamientos a 48°C por 1 h tampoco mostraron diferencias respecto a los controles mientras que en el caso de los tratamientos a 48°C por 3 h se observó un mayor daño como consecuencia de un tratamiento excesivo. Los tratamientos a 42°C por 3 h y a 45°C por 1 y 3 h mostraron una reducción en el porcentaje de frutos dañados con respecto a los controles, siendo los resultados más evidentes en el caso de los tratamientos a 45°C por 3 h.

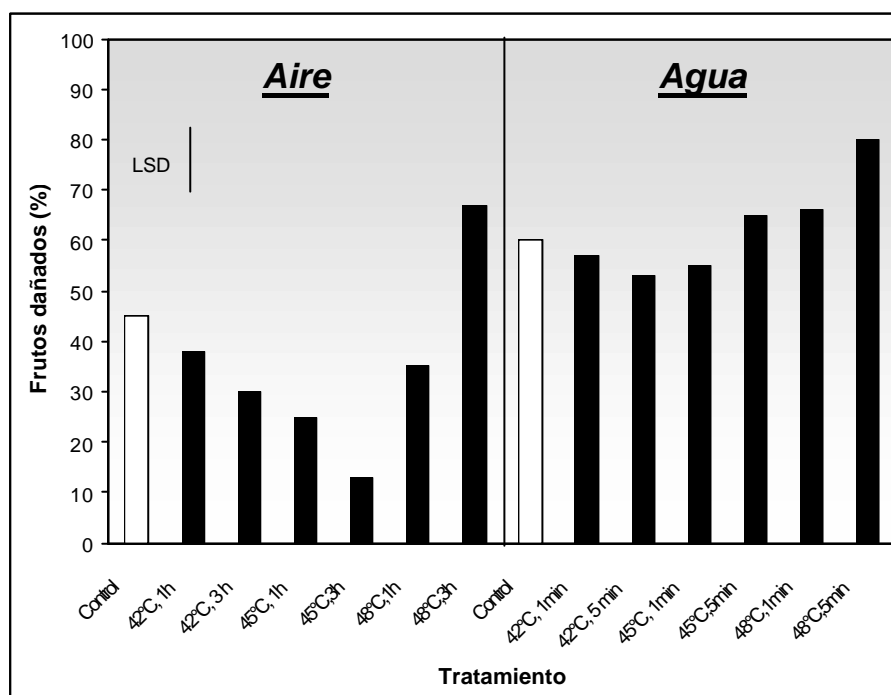


Figura I.1: Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura con agua y aire caliente sobre el ataque de patógenos en frutillas. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

La realización de TAT con agua resultó desfavorable, ya que los frutos sumergidos a 20°C (control tratamiento con agua) presentaron un mayor daño que los frutos no sumergidos en agua (control tratamiento con aire). El agua libre remanente entre los aquenios luego de los tratamientos podría favorecer la germinación de conidios y el ataque de patógenos. Con relación a los tratamientos con agua caliente (42, 45 y 48°C) no se observaron efectos beneficiosos respecto a los controles.

Estos resultados difieren de los hallados por García y col., (1995a) quienes encontraron que tratamientos con agua a 45°C serían de utilidad para reducir el ataque de patógenos en frutillas.

3.2. Caracterización del tratamiento con aire caliente

3.2.1. Perfil térmico y perfil de humedad durante el tratamiento

La temperatura en el interior de los frutos se incrementó desde valores iniciales de 23°C hasta 40°C en la primera hora. Luego continuó incrementándose lentamente para llegar a valores de 42°C al final del tratamiento (Figura I.2). Con relación a la humedad relativa en el interior de las bandejas se observó un incremento desde 32 hasta 60% durante la primera hora, llegando a valores de 80% al final del tratamiento (Figura I.2). Una vez terminado el tratamiento se inspeccionaron los frutos no observándose síntomas de deshidratación.

3.2.2. Pérdida de peso durante el tratamiento térmico

Finalizado el tratamiento se observó una pérdida de peso promedio igual al 2% (Figura I.3). A pesar de esto no se observaron síntomas visibles de deshidratación. La pérdida de peso ocasionada por los tratamientos provocaría una disminución en la cantidad de fruta vendible, no obstante la disminución en pérdidas postcosecha ocasionadas por el ataque de patógenos como consecuencia de la utilización de los TAT fue sustancialmente mayor (Figura I.1)

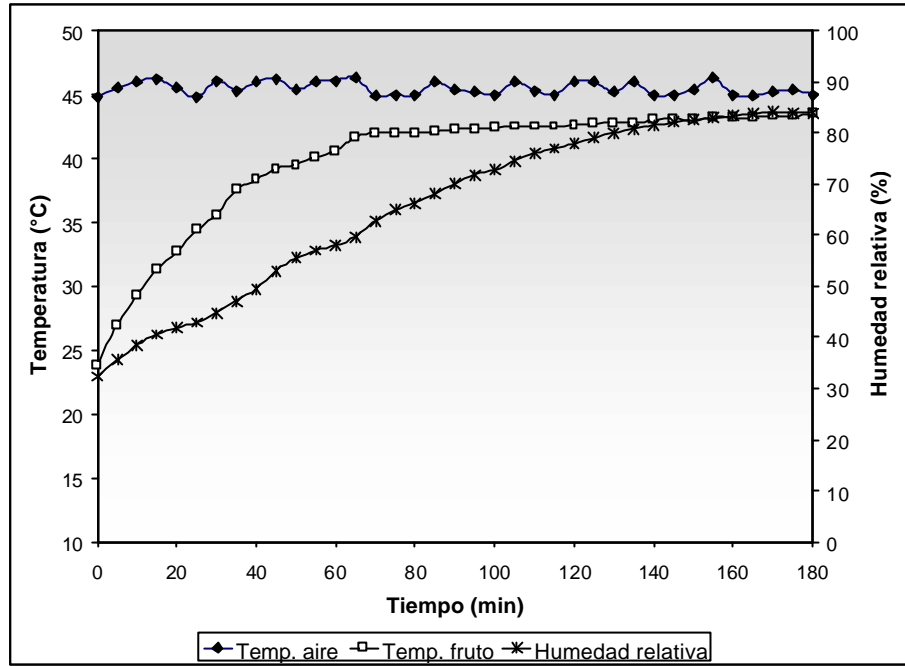


Figura I.2: Perfil térmico y perfil de humedad durante el tratamiento térmico con aire (45°C, 3 h).

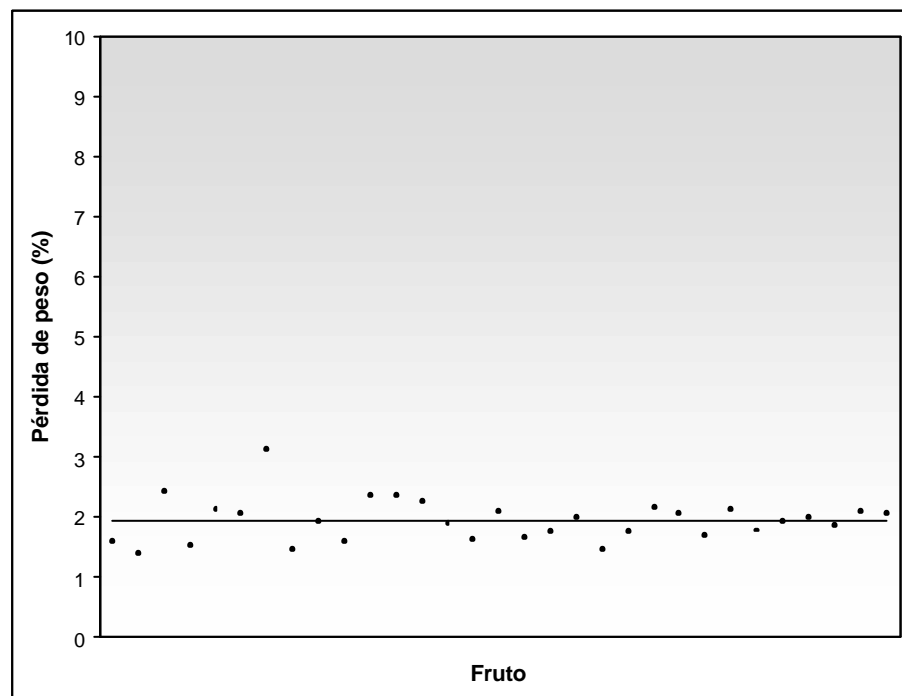


Figura I.3: Pérdida de peso en frutillas luego del tratamiento térmico con aire (45°C, 3h).

3.2.3. Actividad respiratoria durante el tratamiento

No se observaron variaciones en la tasa respiratoria en los frutos controles durante las primeras horas luego de la cosecha (Figura I.4). En el caso de los frutos tratados, la actividad respiratoria se incrementó desde valores de 40 ml CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ hasta 170 ml CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ al final del tratamiento. La actividad respiratoria de los frutos generalmente es incrementada por la exposición a altas temperaturas (Klein y Lurie, 1990; Lurie y Klein, 1991; Mitcham y McDonald, 1993). Luego del tratamiento térmico la tasa respiratoria declina hasta valores similares o menores a los de los controles no tratados térmicamente (Paull, 1990; Mitcham y McDonald, 1993). En el caso de los tratamientos analizados, cuando los frutos se transfirieron nuevamente a 20°C se observó que luego de 3 h recuperaron la tasa respiratoria inicial no hallándose diferencias con los frutos controles. Resultados diferentes fueron hallados por Lurie (1990) en manzanas, quien encontró que una vez finalizado el tratamiento, y cuando los frutos de transfirieron a 20°C, la tasa respiratoria de los mismos descendió por debajo de la de los frutos controles.

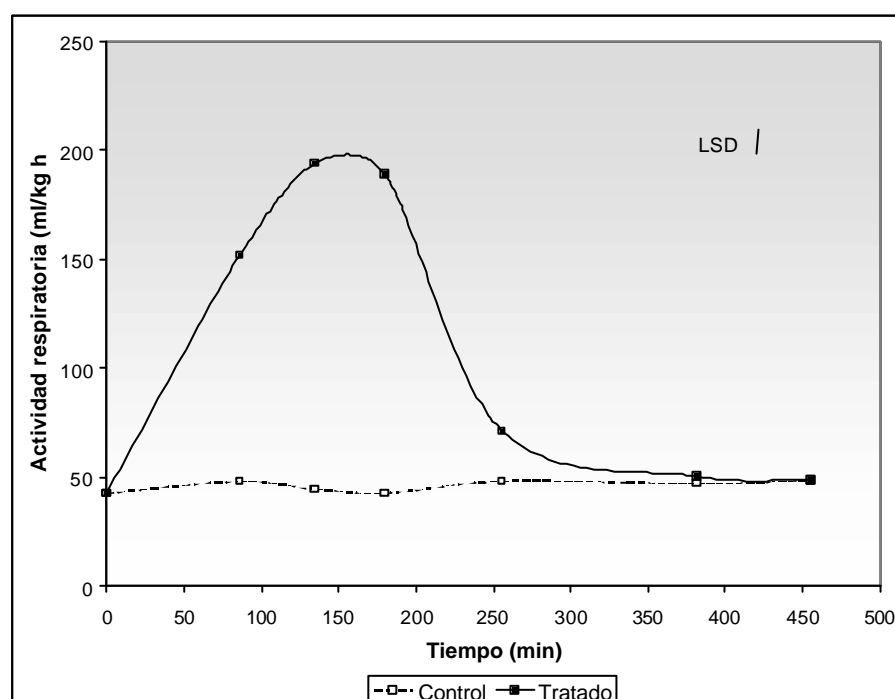


Figura I.4: Actividad respiratoria en frutillas durante el tratamiento térmico (45°C,3h) y posterior recuperación a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.3. Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura en combinación con el almacenamiento refrigerado sobre calidad y vida postcosecha de frutillas

3.3.1. Pérdida de peso

Luego de 2 d a 20°C se observó un claro incremento en la pérdida de peso tanto en los frutos controles como tratados (Tabla I.1). La tasa de pérdida de peso fue comparativamente superior en los frutos controles, por lo que luego de 4 d a 20°C no se observaron diferencias con los tratados térmicamente. Después de 7 d a 0°C, no se encontraron diferencias en la pérdida de peso respecto al valor inicial, pero cuando los frutos se transfirieron a 20°C por 4 d, la pérdida de peso se incrementó en ambos tratamientos sin observarse diferencias. Luego de 14 d a 0°C todos los frutos mostraron un incremento en la pérdida de peso respecto al valor inicial. En este caso la pérdida de peso a 20°C fue superior en el caso de los frutos tratados.

Tabla I.1: Pérdida de peso en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. ND: No determinado. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del correspondiente control a un nivel de significancia de 0,05.

		Días a 0°C								
		0			7			14		
Días a 20°C		0	2	4	0	2	4	0	2	4
Pérdida de peso (%)	Control	0	2,92	5,85	0,34	3,43	8,47	1,47	4,55	ND
	Tratado	2,04*	3,69	6,45	2,18*	3,92	9,54	3,23*	5,66*	ND

3.3.2. Color superficial y antocianinas

Los cambios en el color superficial durante el almacenamiento se evaluaron a través del ángulo hue (Figura I.5) y del parámetro L* (Figura I.6). Inmediatamente luego del tratamiento, no se encontraron diferencias en el ángulo hue entre los frutos controles y tratados. En todos los casos, tanto los frutos controles como los tratados mostraron una disminución en el ángulo hue durante el almacenamiento a 20°C (Figura I.5). Luego de 0, 7 o 14 d de almacenamiento a 0°C y 2 d a 20°C los frutos tratados presentaron mayores valores de hue que los controles indicando un retraso en la evolución del color superficial. No obstante después de 4 d a 20°C no se encontraron diferencias.

La luminosidad de los frutos se evaluó a partir del parámetro L*. Los tratamientos térmicos provocaron una pérdida en la luminosidad (Figura I.6). Durante el almacenamiento a 20°C se observó un descenso en la luminosidad de los frutos. No obstante en ausencia de almacenamiento refrigerado la pérdida de luminosidad fue menor en el caso de los frutos tratados térmicamente.

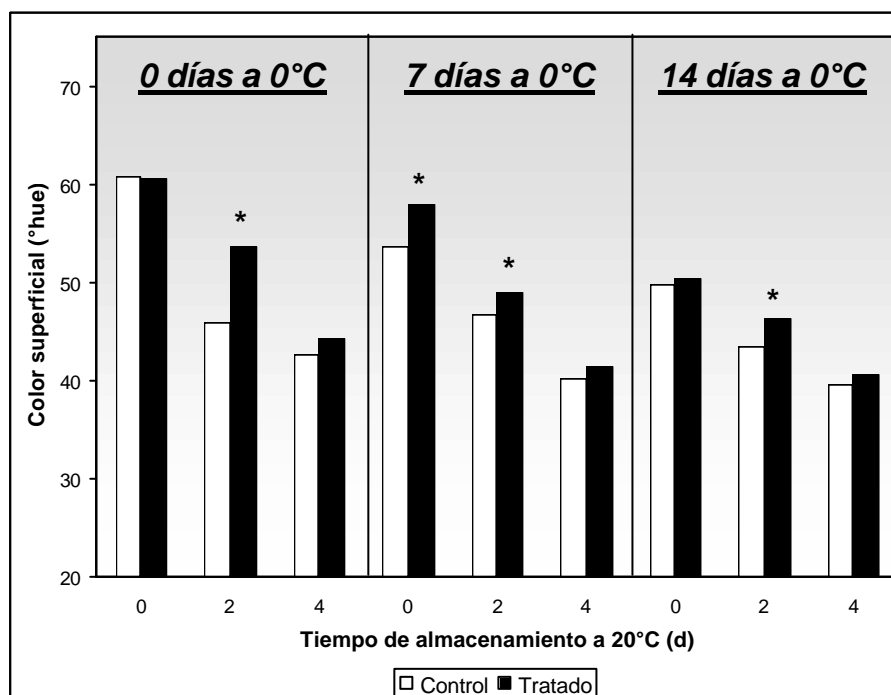


Figura I.5: Cambios en el color superficial (hue) en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

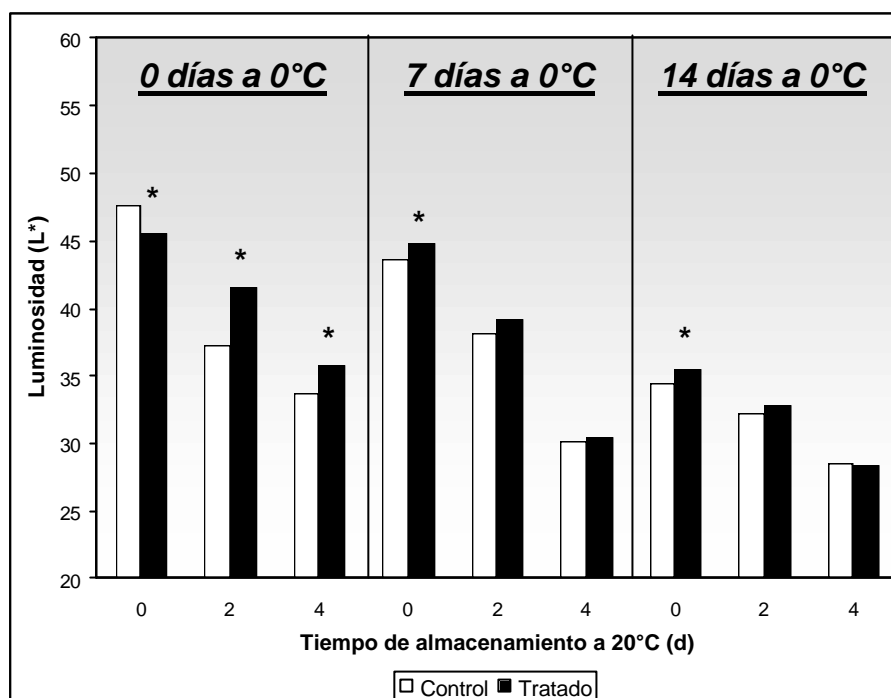


Figura I.6: Cambios en la luminosidad (L^*) en frutos controles y tratados térmicamente (45°C , 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C . El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

También se observó un mayor valor de L^* luego de 7 ó 14 d a 0°C en los frutos tratados pero estas diferencias desaparecieron durante la subsiguiente incubación a 20°C . La influencia de los tratamientos en el desarrollo de color fue también evaluada a través del contenido de antocianinas (Figura I.7). Inmediatamente luego del tratamiento no se encontraron diferencias en el contenido de antocianinas. No obstante durante el almacenamiento a 20°C , los frutos tratados mostraron una menor acumulación de antocianinas que los controles. La reducción en el contenido de antocianinas podría deberse a la reducción en la actividad fenilalanina amonio-liasa (PAL) decrita previamente en frutillas tratadas térmicamente (Civello y col., 1997). La síntesis de PAL comienza durante el viraje de color de la fruta y se incrementa notablemente durante el progreso del proceso de maduración (Hyodo, 1971; Given y col., 1988a, b). La aplicación del TAT podría provocar una reducción en la síntesis de PAL y consecuentemente una menor acumulación de antocianinas. Luego de 7 d a 0°C , el contenido de antocianinas fue menor en los frutos tratados y esta diferencia se mantuvo aún luego de 4 d a 20°C .

Después de 14 d a 0°C y durante el almacenamiento a 20°C los frutos tratados nuevamente mostraron un menor contenido de antocianinas que los controles. Estos resultados indican que el efecto residual de los tratamientos térmicos de alta temperatura aún existe después de 7 ó 14 d de almacenamiento refrigerado. Por otra parte es de resaltar que cuando los frutos controles y tratados se almacenaron a 0°C por 7 ó 14 d y se transfirieron a 20°C la acumulación de antocianinas fue menor que en el caso de los frutos sin almacenamiento refrigerado. Estos resultados muestran un descenso en la capacidad de producción de antocianinas a 20°C de los frutos una vez almacenados a bajas temperaturas.

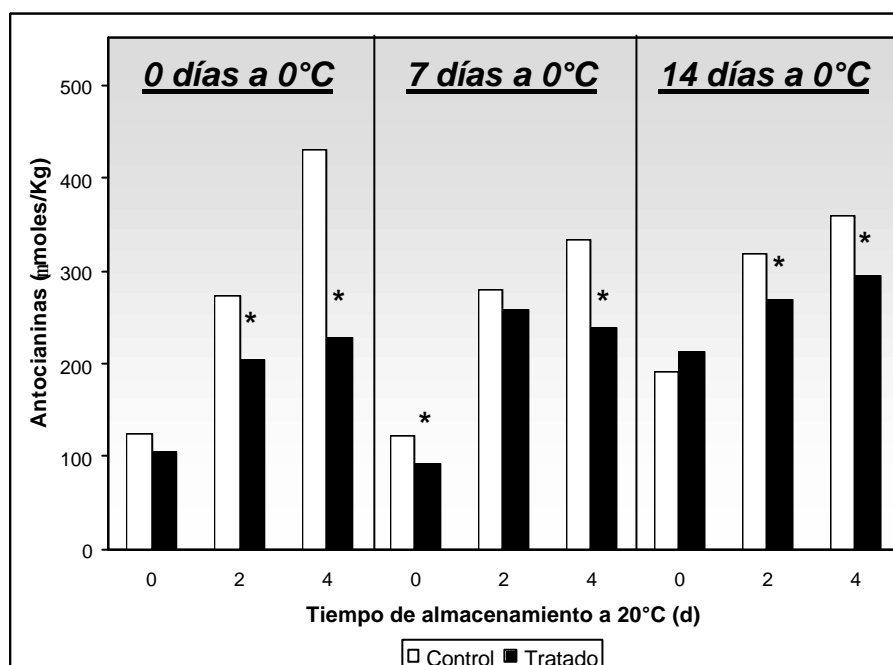


Figura I.7: Cambios en el contenido de antocianinas en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

3.3.3. Firmeza

Inmediatamente luego del tratamiento los frutos se mostraron más firmes que los controles. Luego de 1 d a 20°C los frutos tratados mostraron una menor tasa de ablandamiento, pero las diferencias desaparecieron luego de 2 d a 20°C (Figura I.8).

Los frutos tratados y almacenados por 7 d a 0°C mostraron niveles de firmeza superiores que los controles, lo que se observó también luego de 2 d a 20°C. Cuando los frutos se almacenaron a 0°C por 14 d no se encontraron diferencias entre frutos controles y tratados ni a la salida de cámara ni al final de la incubación a 20°C.

La firmeza de las frutillas disminuye notablemente al comenzar el viraje de color de los frutos. Esta disminución contribuye durante la vida postcosecha a reducir la calidad de los frutos y además incrementa la susceptibilidad de los mismos al ataque de patógenos. Por lo tanto aquellas tecnologías capaces de retrasar el proceso de ablandamiento resultan de gran utilidad a fin de extender la vida de frutos altamente perecederos como la frutilla.

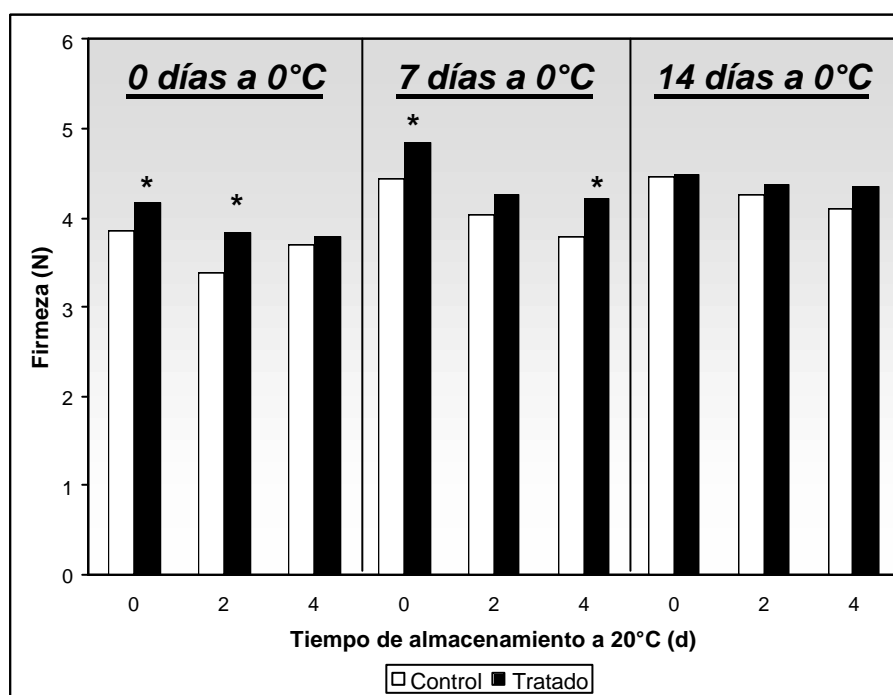


Figura I.8: Cambios en la firmeza en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

El efecto de los tratamientos térmicos de alta temperatura retrasando el ablandamiento ha sido descrito en diversos frutos (Biggs y col., 1988; Porrit y Lidster, 1978; Klein y Lurie, 1990). Cuando los TAT se combinaron con el almacenamiento refrigerado en manzanas, también se observó un retraso aún luego de seis meses a 0°C (Porrit y Lidster, 1978; Klein y Lurie, 1990; Conway y col., 1994). Los tratamientos térmicos afectan el metabolismo de los frutos, suspendiendo la síntesis de proteínas presentes durante el desarrollo normal de los frutos para producir proteínas de shock térmico (Brodl, 1989). Civello y col. (1997), demostraron que los TAT a 42-48°C por 3 h inhiben la síntesis proteica en forma temporaria en frutillas. El efecto observado en el presente estudio podría deberse a una suspensión transiente en la síntesis de enzimas involucradas en la degradación de las paredes celulares. Una vez que los tratamientos finalizan se recupera la síntesis de proteínas y los efectos de los tratamientos tienden a desaparecer.

3.3.4. pH y acidez titulable

El pH de los frutos tanto controles como tratados fue cercano a 3,60 y no se encontraron cambios significativos durante el almacenamiento a 0 ó 20°C (Tabla I.2). Con respecto a la acidez titulable esta fue reducida por los TAT manteniéndose la diferencia luego de 4 d a 20°C. La reducción en la acidez titulable luego de la aplicación de tratamientos térmicos ha sido encontrada en otros frutos tales como manzanas (Liu, 1978; Klein y Lurie, 1990), pelones (Lay-Yee y Rose, 1994), naranja (Shellie y Mangan, 1994) y tomate (García y col., 1995b). Estos resultados también concuerdan con los descritos por García y col., (1995a) en frutillas cv Tudla. El incremento observado en la actividad respiratoria de los frutos (Figura I.2) durante el tratamiento térmico podría provocar una utilización de ácidos orgánicos en este proceso (Lurie y Klein, 1991). Luego de 7 d de almacenamiento refrigerado los frutos tratados aún mostraron una menor acidez que los controles pero la diferencia no se mantuvo durante la incubación a 20°C. Después de 14 d a 0°C y cuando los frutos se transfirieron a 20°C por 4 d, la acidez se incrementó en los controles.

Tabla I.2: pH y acidez titulable en frutillas controles y tratadas térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. C: control, T: tratado. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del correspondiente control a un nivel de significancia de 0,05.

		Días a 0°C								
		0			7			14		
		0	2	4	0	2	4	0	2	4
Días a 20 °C		0	2	4	0	2	4	0	2	4
pH	C	3,60	3,53	3,50	3,45	3,50	3,54	3,54	3,56	3,61
	T	3,53	3,65	3,53	3,51	3,51	3,59	3,51	3,60	3,69
Acidez (meq H⁺ kg⁻¹)	C	17,9	18,1	20,3	18,4	17,4	19,1	17,6	18,4	20,3
	T	16,9*	16,0*	18,5*	17,9*	17,4	18,5	18,6*	18,1	16,8*

3.3.5. Azúcares totales y reductores

El contenido de azúcares totales no mostró diferencias entre frutos controles y tratados (Tabla I.3). En el caso de los azúcares reductores se observó un mayor contenido en los frutos tratados luego de 2 d a 20°C. Del mismo modo los frutos tratados mostraron un mayor contenido de azúcares reductores luego de 14 d a 0°C y 2 d a 20°C. En el caso de los frutos almacenados por 7 d se observó la misma tendencia pero el incremento en el contenido de azúcares reductores no fue significativo.

Tabla I.3: Azúcares totales y reductores en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. C: control, T: tratado. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del correspondiente control a un nivel de significancia de 0,05.

		Días a 0°C					
		0		7		14	
Días a 20 °C		0	2	0	2	0	2
Azúcares totales (g kg⁻¹)	C	48,9	49,5	45,0	53,4	51,2	48,7
	T	49,9	48,8	43,0	50,0	51,9	51,2
Azúcares reductores (g kg⁻¹)	C	22,3	23,8	24,7	29,7	28,1	29,8
	T	22,8	25,8*	25,3	30,8	27,4	31,3*

En frutillas maduras, los azúcares constituyen el 80-90% de los sólidos solubles (Wrolstad y Shallenberger, 1981). La mayor parte de los azúcares totales se debe a glucosa, fructosa y sacarosa (Forney y Breen, 1985; Kader, 1992). En frutillas se conocen formas de invertasa solubles y unidas a pared celular (Ranwala y col., 1992b). La mayor parte de la actividad se asocia con la fracción soluble. Resulta valioso resaltar que la invertasa soluble de frutillas, así como una de las formas unidas a pared, muestran alta actividad enzimática en el rango de temperaturas entre 40 y 60°C, encontrándose el máximo a 50°C (Ranwala y col., 1992b). Por lo tanto resulta posible hipotetizar que la mayor actividad invertasa a las temperaturas del tratamiento podría incrementar el contenido de azúcares reductores.

3.3.6. Ataque de patógenos

Los tratamientos térmicos de alta temperatura han sido utilizados para reducir el daño ocasionado por patógenos de postcosecha (Klein y col., 1997) en diversos frutos, incluyendo frutillas (Civello y col., 1997). El efecto de los tratamientos seguidos de almacenamiento a 0 y 20°C sobre el ataque de patógenos se observa en la Figura I.9. En ausencia de almacenamiento refrigerado y luego de la transferencia a 20°C, los frutos tratados mostraron un 45% menos de frutos atacados que los controles.

Cuando los frutos se almacenaron a 0°C por 7 ó 14 d no se observó ataque de patógenos en los frutos controles ni en los frutos tratados. En el caso de la fruta almacenada a 0°C por 7 d y transferida a 20°C por 1 d, 23% de los frutos controles mostraron ataque fúngico mientras que no se observaron frutos dañados en los tratados térmicamente. Esto sugiere que los tratamientos térmicos poseen un efecto protector y que este efecto aún se observa luego de 7 d de almacenamiento refrigerado. Posteriormente el porcentaje de frutos dañados se incrementó tanto en los frutos controles como tratados a igual velocidad. Luego de 14 d de almacenamiento a 0°C no se observaron diferencias en el porcentaje de frutos infectados entre controles y tratados. No obstante, el número de lesiones visibles y la severidad de las mismas fue menor en el caso de los frutos tratados (datos no mostrados).

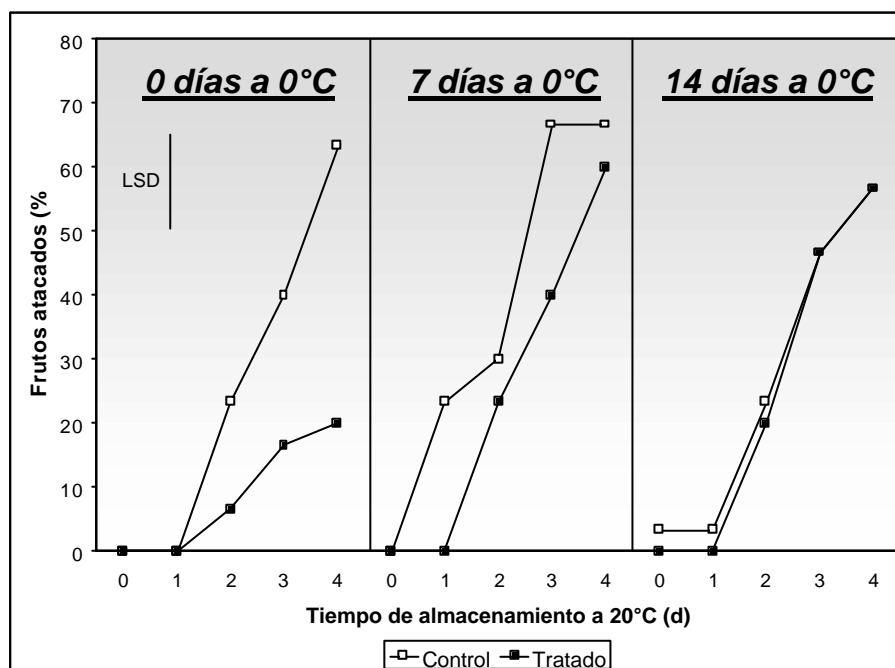


Figura I.9: Ataque de patógenos en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

4. CONCLUSIONES

Los tratamientos térmicos de alta temperatura con agua caliente en frutillas no resultaron beneficiosos ya que incrementaron el daño y la incidencia de enfermedades de postcosecha. Por su parte los tratamientos con aire caliente (45°C, 3 h) permitieron reducir significativamente el ataque de patógenos. Estos tratamientos provocaron una pérdida de peso cercana al 2% lo que resulta muy inferior respecto a los beneficios obtenidos. De acuerdo a los resultados de este estudio la realización de tratamientos térmicos de alta temperatura con aire caliente en forma previa al almacenamiento retrasan la maduración, el ablandamiento y el ataque de patógenos sin afectar los parámetros vinculados con la calidad organoléptica. Cuando los tratamientos se combinan con el almacenamiento a 0°C por 7 d los efectos beneficiosos aún se observan, por lo que esta metodología podría ser considerada como una alternativa para mantener la calidad de frutillas y disminuir las pérdidas de postcosecha sin recurrir al empleo de métodos químicos. Si el almacenamiento refrigerado se realiza por períodos más prolongados (14 d) el efecto residual desaparece, por lo que resultaría de interés optimizar estos métodos de manera de poder extender su uso para casos de almacenamiento aún más prolongado.

Capítulo II

***“Efecto de tratamientos térmicos
de alta temperatura sobre la
degradación de pared celular y
ablandamiento de frutillas”***

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas en la postcosecha de frutos que tiene especial relevancia en el caso de frutillas, es el ablandamiento (Salunkhe y Desai, 1984). Diversos factores influyen en este proceso, incluyendo la morfología y tamaño de la célula, la adhesión célula-célula, el contenido celular y la turgencia (Harker y col., 1997). No obstante, uno de los principales aspectos vinculados a la textura es la estructura de la pared celular y las modificaciones que ésta sufre durante la maduración o el almacenamiento (Carpita y Mc Cann, 2000).

1.1. Composición de la pared celular

La pared celular es una estructura dinámica y altamente organizada compuesta por polisacáridos, proteínas y compuestos de naturaleza fenólica (Carpita y Gibeaut, 1993). No todas las funciones de la pared celular son estructurales, sino que algunas moléculas pueden participar en procesos de reconocimiento celular, reacciones metabólicas de síntesis y degradación o aspectos regulatorios. La laminilla media consiste en una capa rica en compuestos de naturaleza péctica que forma la interfase entre las paredes celulares de células vecinas. Interiormente a ésta se encuentra la pared celular primaria (Figura II.1).

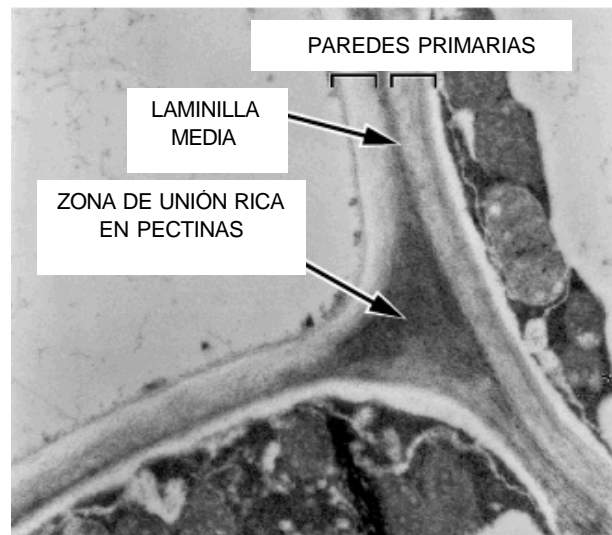


Figura II.1: Detalle de pared celular y laminilla media.

Fuente: Carpita y Mc Cann, 2000.

1.1.1. Monosacáridos de pared celular

Los hidratos de carbono son los principales componentes de las paredes celulares y forman su matriz estructural. Los polisacáridos constituyentes de las paredes celulares se encuentran formados por largas cadenas de monosacáridos unidos covalentemente en diferentes posiciones. Si bien los monosacáridos existentes en la naturaleza son muy numerosos, sólo unos pocos se encuentran formando parte de los componentes de las paredes celulares vegetales (Carpita y Mc Cann, 2000). La D-manosa y la D-galactosa son epímeros de la D-glucosa y poseen los OH en posición axial en los carbonos 2 y 4 respectivamente (Figura II.2). El carbono 6 de estos tres azúcares puede oxidarse a grupos carboxílicos para formar ácido D-manurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, respectivamente. La remoción del grupo carboxílico del ácido glucurónico (GlcA) forma la D-xilosa. A partir del GlcA también puede formarse un azúcar ramificado complejo denominado D-apiosa. También se encuentra un epímero de la glucosa llamado L-arabinosa. Finalmente la deshidratación del carbono 6 de la D-glucosa y D-manosa da lugar a la formación de otros dos azúcares presentes en la pared celular: la L-ramnosa y la L-fucosa.

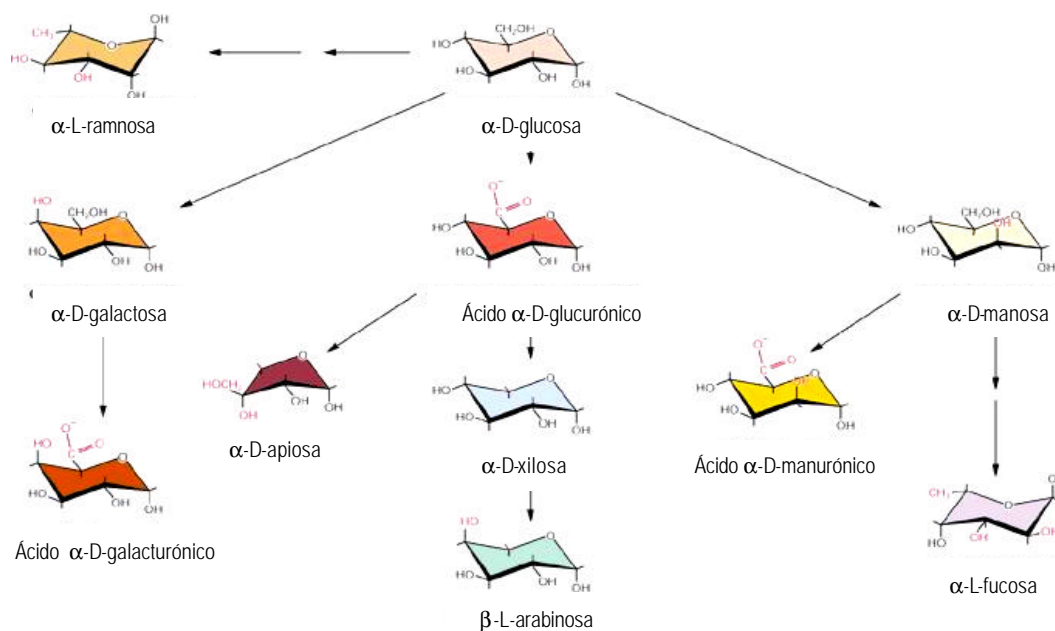


Figura II.2: Estructura de los monosacáridos presentes en la pared celular.

Fuente: Carpita y Mc Cann, 2000.

1.1.2. Polisacáridos de pared celular

A-Celulosa: La celulosa es el polisacárido más abundante con un 15-30% del peso seco de la pared. La celulosa se encuentra en forma de microfibrillas, que son arreglos paracrystalinos de varias docenas de cadenas de β -1,4-D-glucano unidas entre sí por puentes de hidrógeno. En plantas, en promedio, cada microfibrilla tiene un espesor de entre 5 y 12 nm e incluye 36 cadenas de glucano (Carpita y Mc Cann, 2000).

B-Hemicelulosas: Se trata de glucanos que pueden unirse mediante puentes de hidrógeno a la celulosa; pueden encontrarse recubriendo las microfibrillas o actuando de puente entre microfibrillas formando una red (Brummell y Harpster, 2001). En plantas existen dos grupos mayoritarios de hemicelulosas: el xiloglucano (XiG) y el glucuron-arabinoxilano (GAX).

B.1.Xiloglucano: El XiG es el polímero de entrecruzamiento más abundante en dicotiledóneas y parte de las monocotiledóneas. Consiste en cadenas lineales de β -1,4-D-glucosa con numerosos residuos de α -xilosa unidos en la posición 6 de las unidades de glucosa, algunos de las cuales pueden a su vez encontrarse sustituidos con β -D-galactosa, α -L-arabinosa o α -L-fucosa.

B.2.Glucuron-arabinoxilano: Es el polímero de entrecruzamiento más abundante en Gramíneas y Ciperáceas. Todas las Angiospermas poseen además al menos una pequeña cantidad de GAX, el cual posee una cadena principal de β -1,4-D-xilosa con cadenas laterales de α -L-arabinosa y ácido α -D-glucurónico. Otros polisacáridos no celulósicos presentes en menores cantidades incluyen a los glucomananos, mananos y galactoglucomananos. Estos últimos poseen una cadena principal de β -1,4-D-glucano y β -1,4-D-manano aproximadamente en iguales proporciones, con cadenas laterales ocasionales de β -D-galactosa.

C-Compuestos de naturaleza péctica: Las pectinas incluyen una mezcla de polisacáridos ramificados ricos en ácido D-galacturónico, definidas clásicamente como material extraído de las paredes celulares con agua, agentes quelantes o ácidos diluidos.

Se cree que las pectinas poseen muchas funciones, dentro de las que se destacan la determinación de la porosidad de las paredes, la modulación del pH y balance iónico, la participación en la adhesión célula-célula y el reconocimiento de la presencia de ciertos patógenos. Por otra parte, algunas enzimas de pared celular pueden unirse a las redes cargadas de pectinas limitando su acción a ciertas regiones de la pared. Asimismo, al afectar la porosidad, las pectinas pueden regular el acceso de enzimas de degradación de la pared a sus sustratos. Dos constituyentes fundamentales de las pectinas son el homogalacturonano (HGA) y ramnogalacturonano I.

C.1.Homogalacturonano: Está formado por unidades de ácido D-galacturónico (GalA) unidas por enlaces α -1,4. Contiene aproximadamente 200 unidades de GalA y una longitud de 200 nm. Dos homogalacturonanos modificados presentes en la pared celular son el xilogalacturonano y el ramnogalacturonano II (RG II). El xilogalacturonano posee una cadena principal de unidades de ácido galacturónico y presenta ramificaciones laterales de xilosa. Por su parte el RGII posee una elevada diversidad de azúcares incluyendo apiosa, ácido acérico, metil- fucosa, y metil-xilosa. Su estructura se encuentra altamente conservada entre las plantas superiores, lo que sugiere una importante función a pesar de su relativa poca abundancia. Se han descrito dímeros de RGII producto de la formación de dos uniones di-éster con átomos de boro y unidades de apiosa presentes en las cadenas laterales.

C.2. Ramnogalacturonano I: Es un heteropolímero formado por unidades repetitivas del disacárido α -1,2-D-ramnosa- α -1,4-D-GalA. Otros polisacáridos compuestos principalmente de azúcares neutros, como arabinanos, galactanos y arabinogalactanos, se adicionan a los residuos de ramnosa en la posición 4 para dar lugar a la formación de cadenas laterales.

D. Proteínas estructurales de pared celular: A pesar de que los componentes más abundantes de las paredes celulares son los polisacáridos, también se encuentran proteínas que pueden formar parte de la red estructural. Existen cuatro tipos de proteínas estructurales clasificadas de acuerdo al aminoácido en el cual se encuentran enriquecidas o a los tipos de azúcares que se unen a la fracción proteica: proteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en glicina, proteínas ricas en prolina y arabinogalactano-proteínas.

Aún no resulta clara la función de estas proteínas aunque se sugiere que podrían participar como sitios de nucleación para el ensamblaje de la pared, o bien uniéndose a otros polímeros.

E. Compuestos aromáticos: Algunos componentes de naturaleza fenólica pueden encontrarse también en las paredes celulares. Una alta proporción de los mismos consiste en ácidos hidroxicinámicos como el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico. Estos componentes pueden participar en la formación de uniones di-éster entrecruzando polímeros de la pared, unirse a residuos de arabinosa o galactosa del RG I o bien pueden reducirse para formar los alcoholes precursores de la lignina.

1.2. Arquitectura de la pared celular

Si bien se conoce con bastante detalle cuáles son los componentes que forman parte de las paredes celulares, resulta importante comprender la forma en que se encuentran dispuestos, así como la interacción existente entre las diferentes fracciones. La composición y arreglos de los polímeros de pared celular muestran diferencias entre especies, tejidos, células individuales y aún entre regiones dentro de una misma célula (Carpita y Mc. Cann, 2000). No obstante, se han propuesto modelos que intentan sugerir arreglos espaciales de los mismos. Las paredes celulares de dicotiledóneas contienen cantidades iguales de celulosa y xiloglucano. Las microfibrillas de celulosa se encuentran recubiertas y unidas entre sí por otros glucanos, de los cuales el más abundante es el xiloglucano (Figura II.3). La unión entre la celulosa con el xiloglucano se produce por medio de puentes de hidrógeno, y el xiloglucano puede ubicarse uniéndose microfibrillas adyacentes de celulosa. Los glucomananos y glucuron-arabinosanos se encuentran presentes en menor proporción y también participan en el entrecruzamiento de las fibrillas de celulosa mediante la formación de enlaces de hidrógeno más débiles que los formados por el xiloglucano. Los espacios entre la red de celulosa-hemicelulosas son ocupados por pectinas altamente hidratadas, que se entrecruzan mediante uniones éster y mediante uniones iónicas de calcio. Por otra parte, la matriz celulosa-hemicelulosas se une a las pectinas mediante enlaces covalentes entre el xiloglucano y las pectinas (Thompson y Fry, 2000). Las proteínas estructurales pueden formar una red adicional. Estas pueden interactuar con la matriz péctica o entre sí formando puentes entre proteínas.

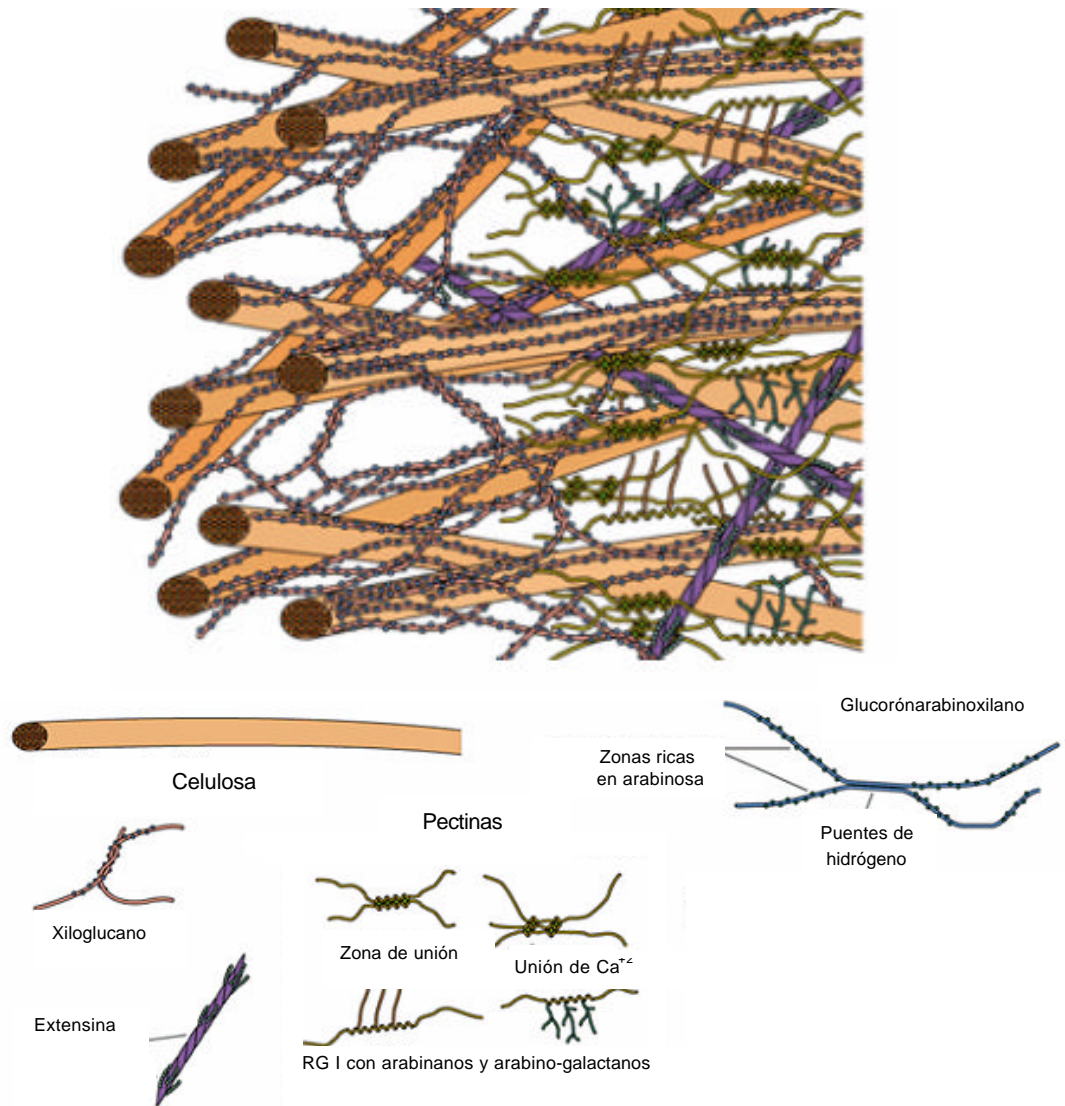


Figura II.3: Modelo de arquitectura de pared de dicotiledóneas

Fuente: Carpita y Mc Cann, 2000.

1.3. Degradación de paredes celulares

1.3.1. Cambios en los componentes de la pared celular

Durante la maduración, los polímeros que forman parte de la pared celular sufren cambios progresivos. La pared celular incrementa su hidratación y la cohesión entre pectinas disminuye, determinando una mayor facilidad para la separación entre células (Jarvis, 1984). La reducción en la adhesión célula-célula es ocasionada por la degradación y disolución de la laminilla media (Crookes y Grierson, 1983). Durante la maduración el pH apoplástico disminuye, se observa un aumento en la concentración de ciertos iones (Almeida y Huber, 1999) y una disminución del turgor (Shackel y col., 1991). Con respecto a los polímeros de pared, se observa una degradación debida a procesos de depolimerización, solubilización o ambos dependiendo del fruto analizado y de la fracción considerada. Asimismo se observan marcadas diferencias en el patrón de degradación de la pared celular entre variedades de un mismo fruto. A fin de examinar las modificaciones en sus componentes, las paredes celulares deben ser aisladas y extraídas secuencialmente para producir fracciones enriquecidas en los principales grupos de polímeros constituyentes (Brummell y Harpster, 2001). Estas extracciones se realizan usualmente con:

1. Agua a fin de extraer las pectinas lábilmemente unidas a las paredes celulares.
2. Agentes quelantes como CDTA o EDTA, los cuales remueven el calcio de la pared, solubilizando las pectinas unidas mediante enlaces iónicos.
3. HCl, que libera las pectinas unidas a la pared mediante enlaces covalentes.
4. Álcalis como el NaOH 4 M, que provoca la ruptura de puentes de hidrógeno con la celulosa y solubiliza los glicanos de entrecruzamiento (xiloglucano, glucomanos glucuron-arabinoxilanos). El residuo obtenido luego de esta extracción es principalmente celulosa.

Durante la maduración las pectinas son solubilizadas y/o depolimerizadas (Brummell y Labavitch, 1997; Chun y Huber, 1997). Esto se produce por hidrólisis de los poliuronidos, que se convierten en solubles en agua o en agentes quelantes si es que permanecen unidos a la pared por uniones iónicas a otras moléculas de pectina.

Por lo tanto la solubilización de poliurónidos usualmente determina un incremento en la facilidad de extracción. La depolimerización de pectinas y la pérdida de galactosa y arabinosa en las cadenas laterales del RG I (Gross y Sams, 1984) incrementan la porosidad de las paredes, que inicialmente puede ser muy pequeña, y limita así el acceso de las enzimas hidrolíticas a sus sustratos (Baron-Epel y col., 1988). Los glucanos de entrecruzamiento unidos débilmente a la celulosa (glucomanos y xilanos) muestran en general pocos cambios en el peso molecular aunque la depolimerización sí tiene lugar en el caso de los xiloglucanos (Tong y Gross, 1988). En el caso de la celulosa, en general no se observan importantes cambios durante el ablandamiento. Además de la degradación de las paredes celulares, ha sido demostrado que la incorporación y síntesis de nuevos componentes continúa durante todo el proceso de maduración (Greve y Labavitch, 1991).

1.3.2. Degradación de paredes celulares

Diferentes enzimas y otras proteínas sin actividad enzimática capaces de degradar los componentes de la pared han sido descritas en frutos. Algunas de ellas se encuentran en diversas etapas del desarrollo, mientras que otras son específicas de la maduración. Algunas se incrementan durante el proceso, mientras que otras muestran pocas variaciones o incluso disminuyen.

Poligalacturonasa (PG): Esta enzima (β -1,4-D-galacturónico glicanohidrolasa) cataliza la hidrólisis de las uniones de ácido galacturónico actuando tanto como endo o exoenzima. Las de tipo exo (EC 3.2.1.67) remueven las unidades de ácido galacturónico a partir del extremo no-reductor de los poliurónidos, mientras que las de tipo endo (EC 3.2.1.15) clivan estos polímeros en diferentes posiciones internas. El sustrato de PG en la pared celular es principalmente el homogalacturonano, el cual es secretado en la pared altamente metil-esterificado y debe ser desesterificado para ser sustrato de PG (Carpita y Gibeaut, 1993). En algunos frutos como durazno, palta y tomate la actividad PG es muy elevada, aunque la actividad en durazno es 50 veces menor que en tomate (Huber y O'Donoghue, 1993). En los primeros estudios realizados en otras especies como manzana, melón y frutilla no se detectó actividad PG por lo que se pensó que la enzima estaba ausente, pero finalmente fueron detectados ARNm codificando para PG y se pudo medir la actividad enzimática (Hadfield y Bennett, 1998). Las poligalacturonasas se encuentran presentes en familias multigénicas (Hadfield y Bennett, 1998).

Esta enzima fue la primera que se evaluó utilizando métodos de transgénesis. La supresión de PG disminuyó la depolimerización de los poliuronidos en tomate, pero no fueron importantes las diferencias en firmeza entre los frutos de plantas transformadas y salvajes. En los últimos estadios de maduración, los frutos en los que se inhibió la expresión de PG mostraron una menor degradación de pectinas y una mejor integridad que los controles. Esto demuestra que la actividad PG es responsable de la depolimerización de poliuronidos pero que la actividad de la enzima no es necesaria ni suficiente para el ablandamiento del fruto y que participa principalmente en los últimos estadios de maduración.

Pectin metilesterasa (PME): Los poligalacturonanos son secretados en la pared celular altamente metil-esterificados y son desesterificados durante el desarrollo celular. Durante la maduración, el grado de metilesterificación de las paredes celulares disminuye (Koch y Nevins, 1989). La enzima pectin metilesterasa (PME; EC 3.1.1.11) elimina los grupos metilo de la posición 6 de los residuos de ácido galacturónico de las pectinas. Esto provoca la liberación de grupos carboxilos, cambiando el pH y la carga de la pared celular, permitiendo la unión de poliuronidos por puentes de calcio (Carpita y Gibeaut, 1993). La PME se encuentra en diversos tejidos vegetales y existen diferentes isoformas (Tucker y col., 1982). Su rol en el ablandamiento no es claro ya que por un lado al demetilar las pectinas favorece la acción de PG y con ello la depolimerización de pectinas, mientras que por otra parte la liberación de grupos carboxilo promueve la formación de enlaces iónicos en la pared. Plantas de tomate PME antisentido presentaron un mayor grado de esterificación (15-40%) de pectinas que las plantas controles y un menor contenido de pectinas solubles en EDTA (Tieman y col., 1992; Tieman y Handa, 1994). Probablemente los cambios en las condiciones físicas e iónicas de la pared pueden haber afectado la actividad de otras enzimas de pared (Brady y col., 1985). No obstante, la firmeza de los frutos no se vio afectada. Al igual que en el caso de PG, los resultados sugieren que la enzima se encuentra involucrada en la degradación de pared celular pero que su supresión no es suficiente para modificar la firmeza de frutos.

b-galactosidasa (b-gal): Uno de los cambios más importantes que ocurre en las paredes celulares durante el ablandamiento es la pérdida de residuos de galactosa de los polímeros de pared celular (Gross y Sams, 1984). La mayor parte de la galactosa se encuentra formando parte de las cadenas laterales del RG I unida a residuos de ramnosa (β -1,4-D-galactanos) o en el RG II por uniones β -1,3 o β -1,6 (Carpita y Gibeaut, 1993). Las endo galactanasas no han sido detectadas en plantas superiores, por lo que se cree que la enzima responsable de la degradación de los β -galactanos de pared es la exo- β -D-galactosidasa (EC 3.2.1.23). La supresión de β -galactosidasa en estadios tempranos de la maduración redujo la pérdida de galactosa y el ablandamiento hasta en un 40%. En otras líneas transgénicas, la supresión de β -gal en estadios avanzados de la maduración también redujo la pérdida de galactosa pero no se encontraron diferencias en firmeza entre frutos transformados y frutos controles. Estos resultados sugieren que la supresión de β -gal podría tener un efecto indirecto en el ablandamiento. Quizás al evitar el incremento de la porosidad de la pared podría impedir el acceso de otras hidrolasas a sus sustratos.

Endo-b-1.4-D-glucanasa (EGasa): Los glicanos de pared son depolimerizados durante el ablandamiento (Huber, 1984; Brummell y col., 1999). Una de las enzimas que se considera responsable de este proceso es la EGasa (EC 3.2.1.4). Las EGasas hidrolizan glucanos con uniones β -D-1,4 pero probablemente no son capaces de degradar la celulosa cristalina (Brummell y col., 1994). Sus sustratos en la pared celular podrían incluir al xiloglucano, regiones no cristalinas de la celulosa y posiblemente glucomananos con cantidad suficiente de residuos de β -1,4-D-glucanos para permitir la unión de la enzima al sustrato. Se han descrito numerosas isoformas de EGasa durante la maduración de frutos (Kanellis y Kalaitzis, 1992). Se ha encontrado actividad EGasa en todos los frutos examinados (Brummell y col., 1994) pero las cantidades encontradas varían notablemente según la especie considerada. En frutillas, apoyando la hipótesis de la regulación propuesta por Given y col. (1988c), la expresión de un gen de EGasa (Fa-Cel1) relacionado con la maduración es suprimida por los elevados niveles de auxinas encontrados en frutos jóvenes y su mRNA no se acumula hasta que los niveles de auxinas declinan a medida que el proceso de maduración progresa (Harpster y col., 1998). Otra EGasa, denominada Fa-Cel2, también ha sido detectada durante el desarrollo de frutillas, pero su expresión se incrementa en frutos verdes y permanece relativamente constante en estadios más avanzados de maduración (Llop-Tous y col., 1999; Trainotti y col., 1999).

Al igual que en el caso de FaCel1, la abundancia del mRNA de este gen también es reducida por tratamientos con auxinas (Trainotti y col., 1999). Si bien, como se mencionó anteriormente, EGasa podría participar en la depolimerización de hemicelulosas y regiones no cristalinas de celulosa, esta enzima no resulta suficiente para explicar el proceso de ablandamiento de frutillas, ya que frutos transgénicos en los que se suprimió su expresión no mostraron diferencias en el ablandamiento respecto a frutos controles (Wooley y col., 2001).

β -Xilosidasa (β -Xil): La xilosa se encuentra en las paredes celulares de plantas formando parte de hemicelulosas y pectinas. En el caso de las hemicelulosas, los residuos de α -D-xilosa se ubican en las cadenas laterales, mientras que en los xilanos forman parte de la cadena principal de β -1,4-D-xilosa. Estos son degradados por la acción de endo β -1,4-xilanasas, las cuales clivan las uniones glicosídicas β -1,4 entre residuos adyacentes de D-xilosa para producir oligosacáridos que pueden luego ser degradados por las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), que liberan residuos simples de xilosa (Cleemput y col., 1997). Entre las pectinas, la xilosa se halla en el xilogalacturonano formando parte de las cadenas laterales y unida al C3 como residuos de β -D-xilosa. La presencia de β -xilosidasa ha sido descrita en peras (Ahmed y Labavitch., 1980), pepino (Miller y col., 1987; Mujer y Miller, 1991) y frutillas (Martínez y col., 2004). A pesar de que el porcentaje de xilosa en la pared es bajo, su relevancia podría ser alta ya que la supresión de β -xil en *Arabidopsis* provocó alteraciones en la composición de la pared afectando el desarrollo normal de las plantas (Goujon y col., 2003).

Pectato liasa (PL): Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en bacterias patógenas, las cuales la secretan favoreciendo la degradación de las pectinas de la laminilla media (Henrissat y col., 1995). La degradación de las pectinas por acción de la PL ocurre por β -eliminación a diferencia del mecanismo hidrolítico de las poligalacturonasas. Los estudios de la degradación de compuestos de naturaleza péctica en frutos han puesto mucho énfasis en la acción de poligalacturonasas mientras que el rol de las pectato liasas ha comenzado a analizarse más recientemente. En el caso de frutillas, la supresión de PL permitió obtener frutos más firmes que los controles (Jiménez Bermúdez y col., 2002), indicando que esta enzima podría poseer un rol importante en el proceso de ablandamiento.

Arabinofuranosidasa (α -Afs): Los xilanos se hallan formados por residuos de xilosa con uniones β -1,4 con un grado de polimerización de 70 a 200. Muchos de los residuos de xilosa se encuentran sustituidos con α -L-arabinofuranósido. Las α -L-arabinofuranosidasas (α -Afs; α -L-arabinofuranósido arabinofuranohidrolasas, EC 3.2.1.55) catalizan la hidrólisis de los residuos terminales no reductores de estos compuestos (Beldman y col., 1997; Saha, 2000). Se han aislado y caracterizado Afs de hongos y bacterias y en el caso de frutos ha sido detectada la presencia de tres isoformas en tomate durante el proceso de maduración, presentando las mismas diferencias en su regulación hormonal (Sozzi y col., 2002). Su rol en el proceso de ablandamiento de frutos no se encuentra elucidado.

Endo-1,4- β -mananasa: La endo 1,4- β -mananasa (EC 3.2.1.78) es una hidrolasa de pared identificada inicialmente en tomate (Pressey, 1989) pero que no ha recibido demasiada atención. Se presume que sus sustratos *in vivo* serían mananos no sustituidos, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos (Nonogaki y col., 2000; Wozniowski y col., 1992), que a pesar de encontrarse en pequeña proporción en las paredes de dicotiledóneas (Brummell y Harpster, 2001), podrían jugar un rol importante reforzando las paredes.

Xiloglucano endotransglucosilasa (XET): El rol de esta enzima en la maduración y ablandamiento no se conoce totalmente, pero se cree que podría contribuir a la depolimerización del xiloglucano por transglucosilación, utilizando pequeñas moléculas resultantes de la acción de EGasa (Brummell y Harpster., 2001). XET también podría modificar la pared celular realizando arreglos en los polímeros existentes, o incorporando nuevos xiloglucanos, ya que la síntesis de los mismos continúa a lo largo del proceso de maduración (Mitcham y col., 1989).

Expansinas: Las expansinas son proteínas presentes en las paredes celulares de plantas, y fueron descubiertas en estudios de alargamiento celular. Diversos genes que codifican para expansinas han sido descritos en frutos. Se cree que participan en la degradación de paredes celulares vegetales y que tienen influencia en los procesos de crecimiento y desarrollo. No ha sido detectada una actividad enzimática conocida y su mecanismo de acción es un enigma. Se conoce que incrementan la relajación de las paredes celulares y que este proceso resulta óptimo a pH ácido (McQueen-Mason y col., 1992). Las expansinas purificadas no poseen actividad hidrolasa o

transglicosilasa y no producen depolimerización observable de carboxi-metil-celulosa, glicanos de entrecruzamiento o pectinas (McQueen-Mason y col., 1992, 1993; McQueen-Mason y Cosgrove., 1994, 1995). Las expansinas se unen débilmente a la celulosa cristalina y más fuertemente a la celulosa recubierta con glicanos de entrecruzamiento. Se cree que actúan ocasionando una disrupción de los puentes de hidrógeno entre las fibrillas de celulosa y los glucanos de entrecruzamiento, particularmente el xiloglucano (McQueen-Mason y Cosgrove., 1995). En el caso de frutillas, se ha caracterizado el cDNA de una expansina cuya expresión es específica de fruto y se incrementa durante la maduración (Civello y col., 1999) y más recientemente se ha descrito la presencia de 6 genes de expansina (Harrison y col., 2001).

1.4. Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura sobre el ablandamiento

El ablandamiento usualmente es retrasado por la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura (Klein y Lurie, 1990; 1992). La exposición de manzanas a 38°C por 4 d resultó en frutos con mayor porcentaje de pectinas insolubles y una menor proporción de pectinas solubles que los frutos no tratados (Klein y col., 1990; Ben-Shalom y col., 1993). En el caso de tomates, se observó una menor pérdida de arabinosa y galactosa luego de 4 d a 40°C (Mitcham y McDonald, 1992). El retraso del ablandamiento ha sido asociado a una reducción en la actividad de enzimas hidrolíticas de degradación de pared celular. Los resultados encontrados con diferentes enzimas muestran que la disminución de la actividad como consecuencia de los TAT puede deberse tanto a la reducción en la transcripción y estabilidad de ARNm como al efecto sobre la síntesis y degradación de proteínas. A temperaturas de 50°C por 5 min la actividad endoglucanasa de tomate disminuye en un 87% (Pressey, 1983), en tanto que la actividad endo-mananasa y galactosidasa disminuyen marcadamente por la aplicación de tratamientos térmicos (40°C, 2 d), para recuperarse luego de 4 y 14 d respectivamente (Sozzi y col., 1996). En el caso de PG, también se observa una recuperación de los niveles normales de actividad luego de 6 d a 25°C (Yoshida y col., 1984). Una vez recuperadas las actividades normales, los frutos continúan el proceso de ablandamiento (Lurie y Klein, 1991). En el caso de frutillas, se encontró que los tratamientos térmicos de alta temperatura pueden retrasar el ablandamiento de los frutos (Capítulo I). En el presente capítulo se evaluará el efecto de los TAT sobre la degradación de pared celular y la actividad de enzimas asociadas a este proceso en la zona interna y externa del receptáculo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se cosecharon frutillas, (*Fragaria x ananassa* Duch., cv Selva), con 75% de color superficial rojo a partir de cultivos locales (La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina) e inmediatamente se transportaron al laboratorio. Un total de quinientos frutos se colocaron en 50 bandejas plásticas y se cubrieron con PVC (15 μm de espesor). Los frutos se mantuvieron a 45°C, 3 h. Luego del tratamiento los frutos se almacenaron a 20°C por 2 d. Los controles se almacenaron a 20°C por 2 d.

2.2. Disección de los frutos

Se cortaron dos discos (5 mm de espesor) de la zona ecuatorial de cada fruto y se delimitaron dos zonas (externa e interna). La zona externa fue obtenida separando el tercio externo con un bisturí, mientras que los dos tercios restantes fueron considerados como zona interna. Se tomaron muestras luego del tratamiento y luego de 1, y 2 d a 20°C; las muestras se procesaron inmediatamente o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.3. Firmeza

La firmeza se midió en la zona interna y externa del receptáculo luego de 0, 1 y 2 d a 20°C utilizando un analizador de textura (TA.XT2, Stable Micro Systems Texture Technologies, Scarsdale, NY) equipado con una sonda plana de 2 mm. Se obtuvieron discos de los frutos como se describió en 2.2. Cada fruto se comprimió 2 mm a 0,5 mm s^{-1} , registrándose la fuerza máxima en N. Cada disco se midió dos veces en cada zona y se utilizaron 40 discos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado.

2.4. Actividad de enzimas que participan en la degradación de pared celular

2.4.1. Endo-1,4- β -D-glucanasa

Se trituraron frutos en un molinillo refrigerado y 5 g del polvo obtenido se extrajeron con 15 ml de buffer (ácido acético-acetato de sodio 50 mM pH 6,0; PVPP 10 g l^{-1}). La suspensión obtenida se centrifugó a 10.000 x g por 30 min y el sobrenadante se descartó. Luego, el residuo obtenido se resuspendió en 15 ml de buffer (ácido acético-acetato de sodio 50 mM pH 6,0; NaCl 1 M; PVPP 10 g l^{-1}) y se agitó 2 h a 4°C.

El homogenato se centrifugó a 10.000 x g por 30 min y el sobrenadante se utilizó para ensayar la actividad enzimática. Todos los pasos durante la preparación de los extractos se realizaron a 4°C. La actividad enzimática se midió en una mezcla de reacción conteniendo buffer ácido acético-acetato de sodio 50 mM pH 6,0; NaCl 1 M; carboxi-metil celulosa 0,5% (p/v) y 1,5 ml de extracto enzimático en un volumen total de 2 ml. La mezcla se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas luego de 0, 2, 5, 8 y 24 h y se congelaron en nitrógeno líquido hasta la determinación de azúcares. Los azúcares se determinaron con ácido di-nitrosalicílico (DNS) midiendo la absorbancia a 550 nm (Miller, 1959). Se prepararon dos extractos para cada tratamiento, zona y tiempo de almacenamiento analizado y cada extracto se midió por duplicado. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica (ΔDO) en una hora bajo las condiciones del ensayo, por gramo de fruto.

2.4.2. *b*-xilosidasa

Frutos congelados (5 gramos) se homogeneizaron en un Omnimixer con 15 ml del siguiente buffer de extracción: ácido acético/acetato de sodio 0,05 M pH 6,0; NaCl 1 M; PVPP 10 g l⁻¹. La mezcla se mantuvo en agitación a 4°C por 2 h y luego se centrifugó a 9.000 x g por 10 min. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad β -xilosidasa utilizando p-nitrofenil β -D-xilopiranosido como sustrato según Cleemput y col., (1997) con modificaciones menores. Se preparó la siguiente mezcla de reacción: p-nitrofenil β -D-xilopiranosido 5 mM; NaCl 1 M; buffer ácido acético/acetato de sodio 0,05 M pH 6,0; y 750 μ l de extracto enzimático en un volumen total de 1,5 ml. La mezcla se incubó a 55°C y la reacción se detuvo a tiempo 0 y luego de 1, 2, 3 y 4 h, mezclando 150 μ l de mezcla de reacción y 500 μ l de solución de Trizma base 1%. El p-nitrofenol liberado se determinó midiendo la densidad óptica a 410 nm. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento, zona y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica (ΔDO) en una hora bajo las condiciones de ensayo, por gramo de fruto.

2.4.3. Poligalacturonasa

Aproximadamente 5 g de fruto se procesaron en un Omnimixer con 15 ml de buffer de extracción (ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 6,0; NaCl 1 M; PVPP 10 g l⁻¹). La suspensión obtenida se agitó por 2 h y luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 min. El sobrenadante se dializó por 12 h en buffer ácido acético/acetato de

sodio 100 mM pH 4,5. El extracto obtenido se utilizó para la determinación de la actividad PG. Todos los pasos durante la preparación de los extractos se realizaron a 0-4°C. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento, zona y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad se ensayó en una mezcla de reacción conteniendo ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 6,0, ácido poligalacturónico 0,15% p/v y extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 40°C y se tomaron alícuotas de 300 μ l a diferentes tiempos y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El ácido galacturónico liberado se midió con 2-ciano acetamida de acuerdo a Gross (1982). Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica (Δ DO) en una hora bajo las condiciones de ensayo, por gramo de fruto.

2.4.4. *b*-galactosidasa

Aproximadamente 5 g de fruto se procesaron en un Omnimixer con 15 ml de buffer (ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 6,0; NaCl 1 M; PVPP 10 g l⁻¹). La suspensión obtenida se agitó por 2 h y luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 min. Todos los pasos durante la preparación del extracto se realizaron a 0-4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de la actividad enzimática. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento, zona y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad se midió en una mezcla conteniendo buffer ácido acético/acetato de sodio 0,05 M pH 4,5 y p nitrofenil β -D-galactopiranosido 3 mM. La mezcla de reacción se incubó a 40°C, se tomaron alícuotas de 150 μ l a diferentes tiempos y se mezclaron con 500 μ l de Na₂CO₃ 0,4 M. Se midió la absorbancia a 410 nm y los resultados se expresaron como la variación en la densidad óptica por minuto bajo las condiciones de ensayo, por gramo de fruto.

2.4.5. *Pectin metilesterasa*

Aproximadamente 5 g de fruto se procesaron en un Omnimixer con 15 ml de NaCl 1 M y PVPP 10 g l⁻¹. La suspensión obtenida se agitó por 4 h y luego se centrifugó a 10.000 x g por 30 min. El sobrenadante se ajustó a pH 7,5 con NaOH y se utilizó para ensayar la actividad PME. Todos los pasos durante la preparación de los extractos se realizaron a 0-4°C. Se realizaron dos extractos para cada tratamiento, zona y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad se ensayó en una mezcla de reacción conteniendo 600 μ l de

pectina 0,5% p/v, 150 μ l de azul de bromotimol 0,01% en buffer fosfato 0,003 M pH 7,5; 100 μ l de agua pH 7,5 y 100 μ l de extracto enzimático. Se midió la reducción de la densidad óptica a 620 nm a 37°C. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica (Δ DO) en un minuto bajo las condiciones de ensayo, por gramo de fruto.

2.5. Análisis de la composición de pared celular

2.5.1. Aislamiento de polisacáridos de pared celular

Los polisacáridos de pared celular se obtuvieron como residuo insoluble en alcohol (RIA) de acuerdo a d'Amour y col. (1993), con modificaciones menores. Aproximadamente 10 g de tejido congelado se homogeneizaron con 4 volúmenes de etanol y se mantuvieron en ebullición por 30 min. El homogenato se filtró y el residuo se lavó tres veces con 15 ml de etanol. El sólido obtenido (RIA) se secó a temperatura ambiente.

2.5.2. Extracción y cuantificación de pectinas

Los poliuronidos se aislaron de acuerdo a Nara y col. (2001), con modificaciones menores. Alícuotas de 100 mg de RIA se suspendieron en 100 ml de agua y se agitaron a 20°C por 12 h. El homogenato se filtró y el sólido se lavó tres veces con 10 ml de agua destilada. Los filtrados se denominaron pectinas solubles en agua (PS_{H_2O}).

El residuo fue luego resuspendido en 100 ml de buffer ácido acético/acetato de sodio 0,05 M conteniendo EDTA 0,04 M, pH 4,5 y se agitó durante 4 h a 20°C. El homogenato se filtró y el residuo se lavó tres veces con 10 ml del mismo buffer. Los filtrados se denominaron pectinas solubles en EDTA (PS_{EDTA}). Finalmente el residuo obtenido se resuspendió en 100 ml de HCl 0,05 M y se calentó con agitación a 100°C por 1 h. Luego de enfriarlo el homogenato se filtró y el residuo se lavó tres veces con aproximadamente 10 ml de HCl 0,05 M. El filtrado obtenido se denominó pectinas solubles en HCl (PS_{HCl}). La concentración de ácidos urónicos de todas las fracciones se determinó por el método del m-hidroxidifenilo (Blumenkrants y Asboe-Hansen, 1973) utilizando ácido galacturónico como estándar. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg de ácido galacturónico por gramo de fruto.

2.5.3. Extracción y cuantificación de hemicelulosas

El residuo proveniente de la extracción de pectinas se agitó por 8 h con 100 ml de NaOH 4 M a 20°C. El homogenato se filtró y luego se lavó tres veces con 5 ml de NaOH 4 M. Los filtrados obtenidos se denominaron fracción hemicelulosas (Hem). La cuantificación de hemicelulosas se realizó luego de la hidrólisis de la fracción Hem con H₂SO₄ a 100°C por 15 min. La determinación de azúcares liberados se realizó por el método descrito por d'Amour y col., (1993) utilizando glucosa como estándar. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg de glucosa por g de fruto.

2.6. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial. Los datos se analizaron por medio de un ANOVA. Las medias se compararon a través del test LSD a un nivel de significancia de 0,05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Firmeza

La firmeza de los frutos fue aproximadamente 2 veces superior en la zona interna del receptáculo que en la externa. Durante el almacenamiento se observó una reducción en la firmeza tanto en la zona interna (Figura II.4) como externa (Figura II.5) La firmeza cambió en los frutos controles desde valores de 1,57 y 0,65 hasta 0,92 y 0,39 luego de 2 d de almacenamiento en la zona interna y externa de los frutos respectivamente. Inmediatamente luego del tratamiento térmico no se encontraron diferencias en la firmeza entre los frutos controles y tratados en ninguna de las zonas analizadas. Luego de 1 d a 20°C los frutos tratados mostraron una mayor firmeza que los controles tanto en la zona interna como en la externa. Luego de 2 d a 20°C no se encontraron diferencias en la región interna pero cuando se analizó la zona externa los frutos tratados se mantuvieron más firmes que los controles. Los tratamientos térmicos pueden retrasar el ablandamiento en diversos frutos (Paull, 1990; Lurie, 1998).

Civello y col., (1997) hallaron que los tratamientos térmicos de alta temperatura

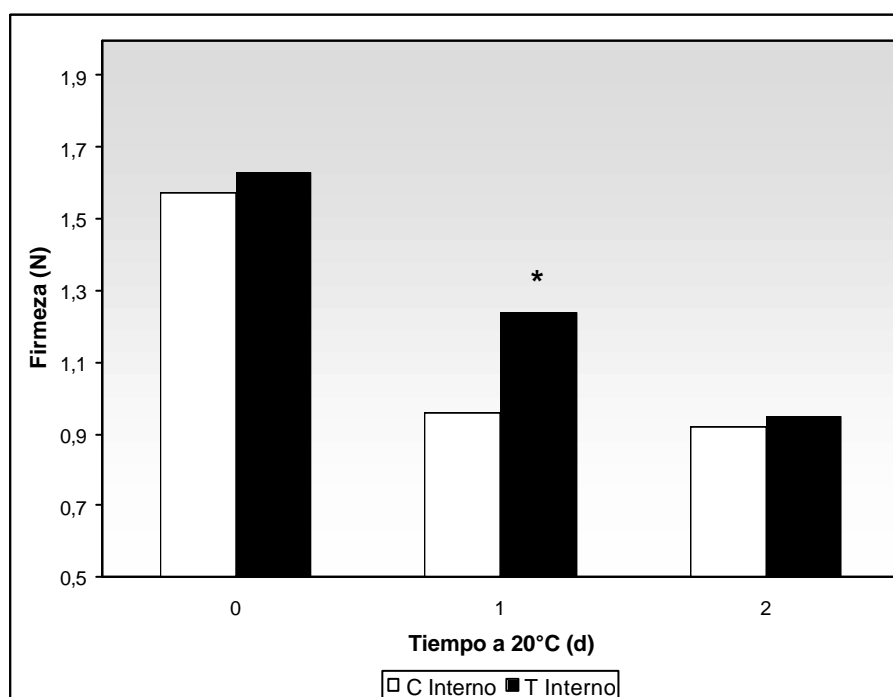


Figura II.4: Cambios en la firmeza en la zona interna del receptáculo en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

(42-48°C) retrasan el ablandamiento en frutillas. Los resultados muestran que los tratamientos térmicos retrasan el proceso de ablandamiento tanto en la zona interna como externa de frutillas. Varios autores han descrito que los tratamientos térmicos pueden reducir la actividad de enzimas asociadas a la degradación de las paredes celulares (Paull, 1990; Lurie, 1998; Sozzi y col., 1996) lo que podría influir en la velocidad de ablandamiento.

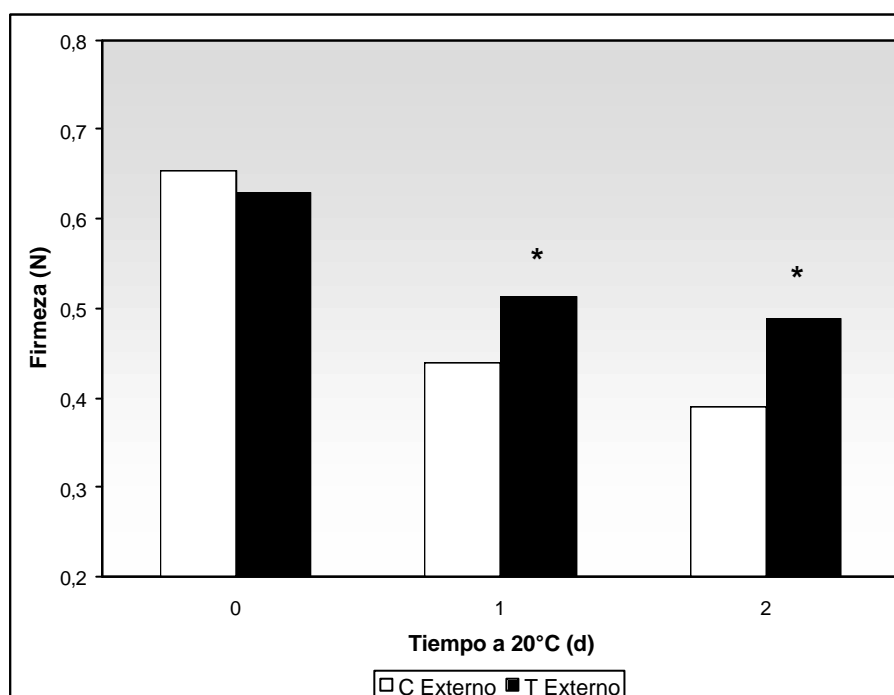


Figura II.5: Cambios en la firmeza en la zona externa del receptáculo en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

3.2. Actividad de enzimas que participan en la degradación de pared celular

3.2.1. Endo- β -1,4-D-glucanasa

Se ha mencionado una elevada actividad EGasa en frutillas en estadios avanzados del proceso de maduración (Abeles y Takeda, 1990). Más recientemente se ha descrito la existencia de diversos genes de endoglucanasa cuya expresión es elevada en frutillas maduras (Harpster y col., 1998; Llop-Tous y col., 1999; Trainotti y col., 1999).

Los resultados hallados mostraron que la actividad EGasa fue mayor en la zona interna que en la externa de los frutos (Figura II.6). Luego de la cosecha la actividad EGasa fue $0,15 \Delta\text{DO g}^{-1} \text{h}^{-1}$ en la región interna de los frutos y $0,07 \Delta\text{DO g}^{-1} \text{h}^{-1}$ en la región externa.

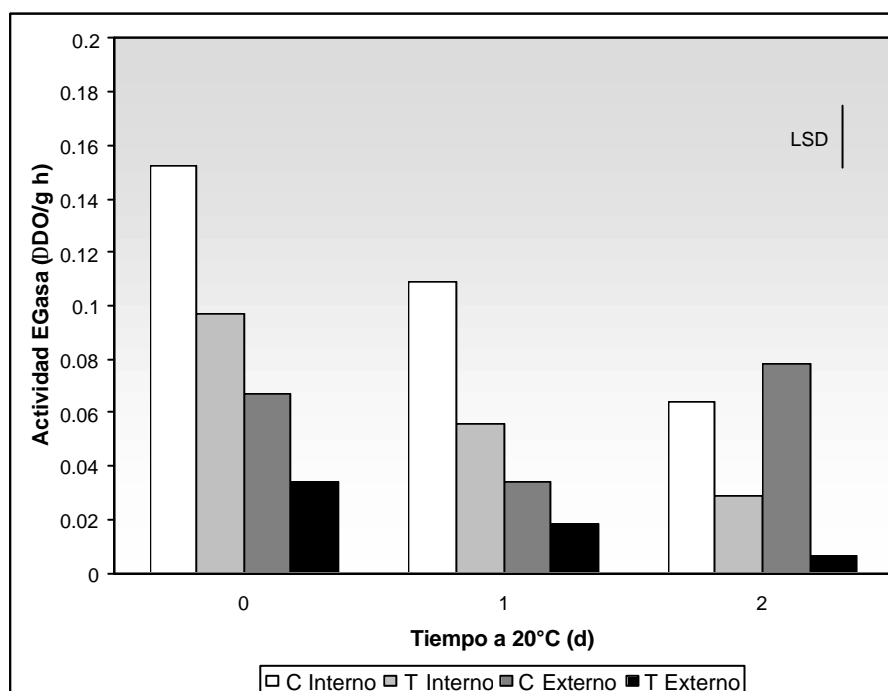


Figura II.6: Actividad EGasa en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C , 3 h) durante el almacenamiento a 20°C . Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Los frutos tratados presentaron una menor actividad EGasa que los controles inmediatamente luego del tratamiento en ambas zonas. La misma tendencia se observó luego de 1 y 2 d a 20°C. La frutilla muestra una pequeña cantidad de celulosa que permanece sin alteraciones importantes durante la maduración (Woolley y col., 2001) lo que sugiere que esta fracción no posee un importante rol en el proceso de ablandamiento. Las EGasas podrían participar en la degradación de xiloglucanos y regiones no cristalinas de la celulosa (Llop-Tous y col., 1999; Woolley y col., 2001). Los menores niveles de EGasa hallados en el caso de los frutos tratados podrían determinar una menor modificación de las fracciones de xiloglucano.

3.2.2. b-xilosidasa

La xilosa representa el 29% de las hemicelulosas y también se encuentra presente en pequeñas proporciones en las pectinas (Koh y Melton, 2002). Aproximadamente sólo el 25% sería β -xilosa (xilanos o xilogalacturonanos). A pesar que el porcentaje de β -xilosa es bajo, su relevancia en la estructura de la pared celular podría ser elevada ya que la disminución en la expresión de un gen de β -xilosidasa altera la composición de la pared celular y el desarrollo normal (Goujon y col., 2003).

La actividad β -xilosidasa disminuyó durante el almacenamiento a 20°C tanto en los frutos controles como tratados (Figura II.7). Después del tratamiento térmico se observó una menor actividad β -xil en los frutos tratados que en los controles en ambas zonas analizadas. Lo mismo se observó luego de 1 d a 20°C, pero no se encontraron diferencias después de 2 d a 20°C. En contraposición a lo que sucede con las pectinas, donde el tamaño molecular medio permanece sin importantes variaciones durante la maduración de frutillas, las hemicelulosas muestran una significativa reducción en el tamaño molecular medio (Huber., 1984). Se ha sugerido que β -xil es una de las enzimas responsables en el proceso de depolimerización de compuestos de naturaleza hemicelulósica. Tanto la expresión del mRNA (FaXyl1), como la actividad de β -xil muestran un máximo en frutillas 25 y 50 % rojas (Martínez y col., 2004). No obstante, tanto la expresión de dicho gen como la actividad enzimática β -xil son detectados aún en frutos totalmente maduros, y la reducción hallada en el caso de los frutos tratados térmicamente podría provocar un retraso en la degradación de los xilanos. Por otra parte, el clivaje de residuos de β -xilosa de las cadenas laterales de compuestos de naturaleza péctica podría ser reducido.

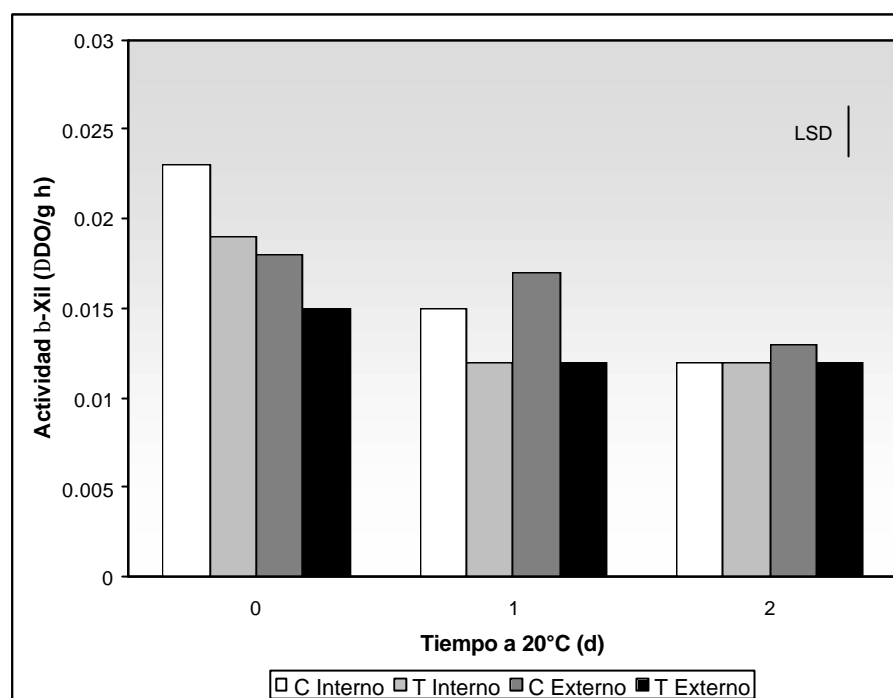


Figura II.7: Actividad *b-xil* en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0.05.

3.2.3. Poligalacturonasa

En frutillas se han purificado y caracterizado parcialmente tres poligalacturonasas (Nogata y col., 1993). Dos de ellas presentan actividad endopoligalacturonasa mientras que la restante posee actividad tanto endo como exo poligalacturonasa (Nogata y col., 1993). En el presente trabajo, no se encontraron diferencias en actividad PG entre la zona interna y externa de frutillas (Figura II.8). Tampoco se encontraron cambios en la actividad PG de los frutos controles durante el almacenamiento a 20°C. No obstante, los tratamientos térmicos redujeron la actividad PG en ambas zonas. Luego de 1 d a 20°C los frutos tratados aún presentaron menor actividad PG que los controles, pero luego de 2 d a 20°C se recuperaron los niveles normales de PG y no se observaron diferencias entre frutos con o sin tratamiento térmico. Nogata y col. (1993) describieron que la actividad PG disminuye durante la maduración de frutillas y que una baja actividad se encuentra en frutos maduros. Por otra parte, algunos trabajos describieron que el ARNm de PG se no se expresa en frutos maduros (Redondo Nevado y col., 2001).

No obstante trabajos más recientes mencionan que la actividad PG se incrementa notablemente durante la maduración de frutillas y que este aumento es aún más marcado en variedades con alta tasa de ablandamiento (Rosli y col., 2004). La reducción en la actividad PG podría entonces contribuir a retrasar el ablandamiento en los frutos tratados térmicamente.

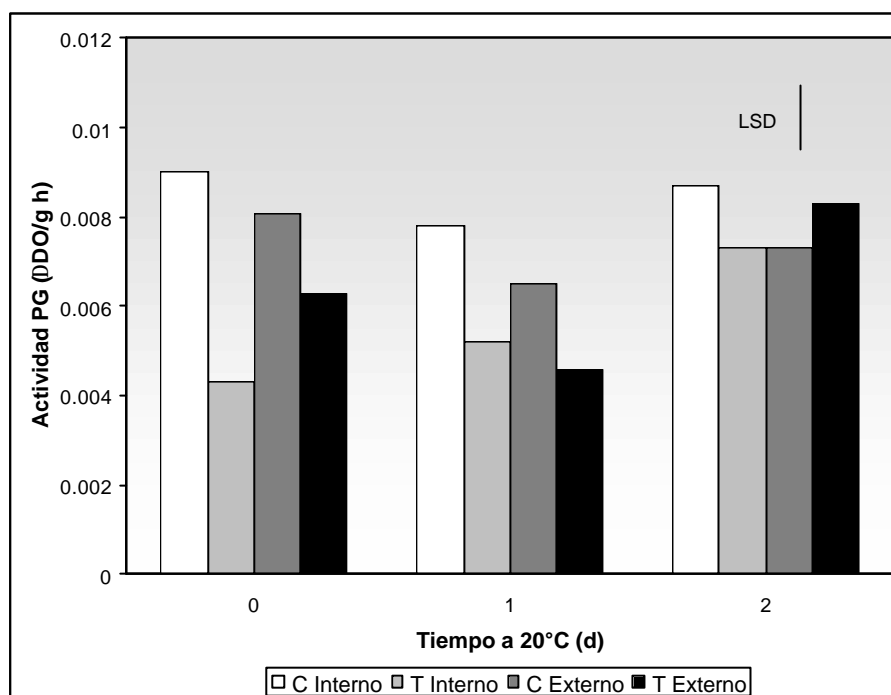


Figura II.8: Actividad PG en la zona interna y externa frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.4. b-galactosidasa

Tres galactosidasas diferentes han sido halladas en frutillas (Trainotti y col., 2001). En el presente trabajo la actividad galactosidasa fue superior en los tejidos internos que en los tejidos externos de los frutos (0,20 y 0,16 $\Delta\text{DO g}^{-1} \text{h}^{-1}$ respectivamente) y no se encontraron cambios en la zona interna y externa de los frutos controles durante el almacenamiento (Figura II.9). La actividad β -gal fue menor en la zona interna de los frutos tratados que en los los controles inmediatamente luego del tratamiento térmico, pero no se detectaron diferencias en la región externa del receptáculo. No obstante, los frutos tratados mostraron una menor actividad β -gal que los controles en ambas zonas analizadas luego de 1 d a 20°C.

Cuando los frutos se mantuvieron a 20°C por 2 d, no se hallaron diferencias entre los frutos controles y tratados ni en la zona interna ni en la zona externa. Sozzi y col. (1996) mostraron que el estrés por altas temperaturas redujo la actividad β -galactosidasa en tomates. La participación de galactosidasa en la solubilización de pectinas ha sido sugerida (Ranwala y col., 1992a), y se ha propuesto que las β -1,4-galactosidasas podrían remover cadenas laterales de los ramnogalacturonanos (Smith y col., 1998). Esta remoción podría contribuir a reducir las interacciones no covalentes entre cadenas de polisacáridos adyacentes, las cuales refuerzan la estructura de la pared celular. Por otra parte, los residuos de galactosa también se encuentran en hemicelulosas ubicados a nivel de las cadenas laterales (Trainotti y col., 2001). Se ha informado la pérdida de galactosa durante el ablandamiento de frutillas (Knee y col., 1977; Regdwell y col., 1997). La actividad β -galactosidasa podría jugar un rol relevante en el ablandamiento de estos frutos, y la reducción de β -gal como consecuencia de los tratamientos térmicos podría contribuir a retrasar la degradación de los polímeros presentes en la pared celular.

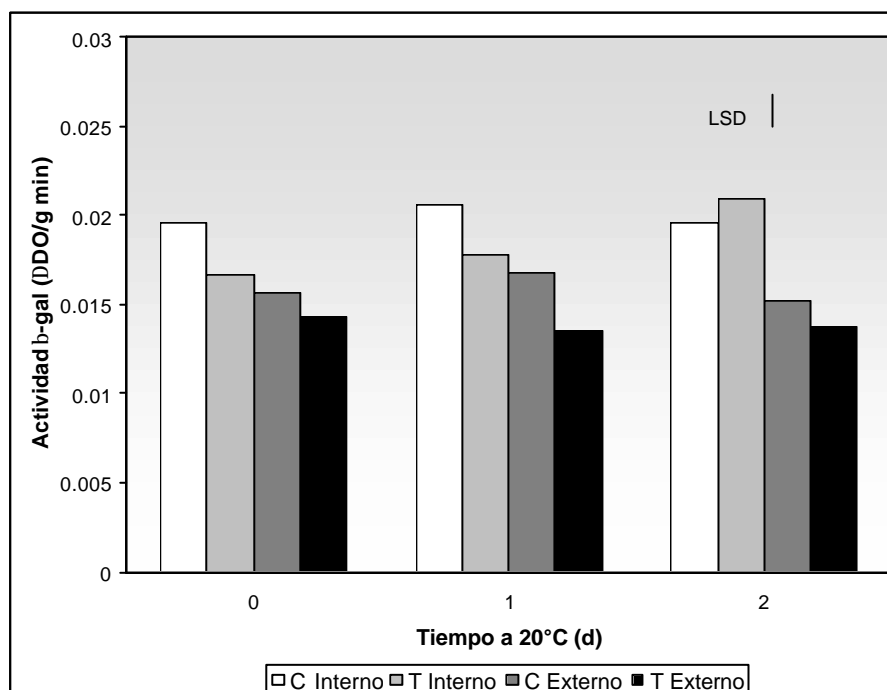


Figura II.9: Actividad *b-gal* en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.5. Pectin metilesterasa

PME es una enzima ubicua en plantas que desesterifica las pectinas metoxiladas en la pared celular. Una vez finalizado el tratamiento térmico los frutos tratados presentaron una mayor actividad PME que los controles en ambas zonas analizadas (Figura II.10). Luego de 2 d a 20°C los frutos tratados mostraron mayor actividad PME que los controles en la zona interna pero no se observaron diferencias en la región externa. Trabajos previos en manzanas no detectaron diferencias en la actividad PME entre frutos controles y tratados térmicamente (Klein y col., 1995). No obstante, tanto el producto analizado como las condiciones del tratamiento difieren notablemente de las utilizadas en el presente trabajo. Incluso se ha descrito que las respuestas a los tratamientos térmicos dependen no sólo del producto sino también del cultivar utilizado (Lurie, 1998).

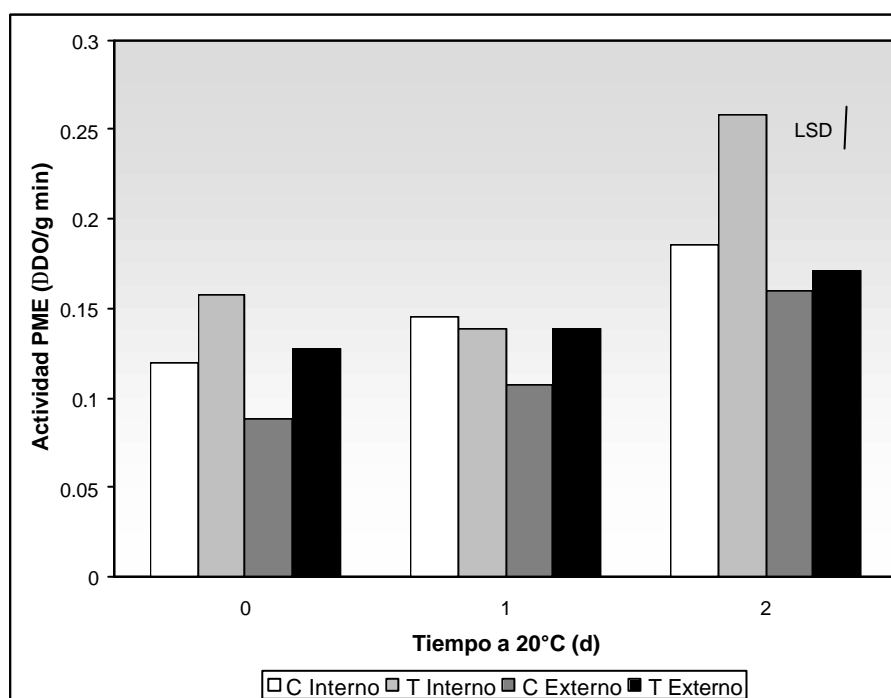


Figura II.10: Actividad PME en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

La mayor actividad PME hallada en los frutos tratados térmicamente podría incrementar la liberación de grupos carboxílicos en las pectinas y con ello aumentar el número de sitios putativos para la formación de puentes de calcio en la pared, contribuyendo a retrasar el desensamblaje de los compuestos pécticos.

3.3. Análisis de la composición de pared celular

3.3.1. Hemicelulosas

El contenido de hemicelulosas se redujo en la región externa de los frutos controles durante el almacenamiento a 20°C (Figura II.11). No se encontraron diferencias en el contenido de Hem entre frutos controles y tratados inmediatamente luego del tratamiento. No obstante, luego de 2 d a 20°C los niveles de Hem fueron más elevados en los frutos tratados en ambas zonas analizadas. Por mucho tiempo se consideró que la celulosa era uno de los sustratos de la EGasa *in vivo*, pero no se ha probado experimentalmente que las EGAsas puedan degradar a la celulosa cristalina y se ha propuesto al xiloglucano como blanco de esta enzima (Wooley y col., 2001).

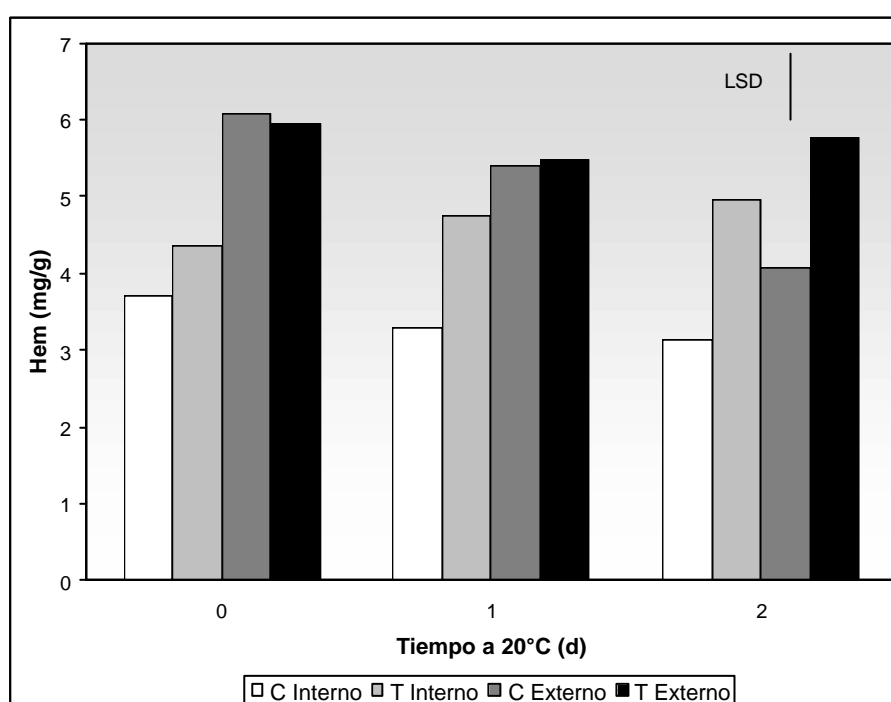


Figura II.11: Hemicelulosas en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

EGasa y β -xil actuando sobre las hemicelulosas en conjunto con otras proteínas que modifican la red de celulosa-hemicelulosas como las expansinas, podrían contribuir a la degradación de la pared celular (Wooley y col., 2001). La inhibición de EGasa ocasionada por los TAT podría reducir la solubilización de Hem. Asimismo, la reducción en la actividad β -xil hallada en el caso de los frutos tratados podría contribuir también a retrasar la degradación de los xilanos. Finalmente, cambios en la matriz péctica podrían participar en el ablandamiento de los frutos especialmente en los últimos estadios del proceso de maduración (Hadfield y Bennett, 1998).

3.3.2. Pectinas totales

No se observaron cambios en las pectinas totales en ninguna de las dos zonas analizadas durante el almacenamiento a 20°C (Figura II.12). Nogata y col. (1996) demostraron que las pectinas totales presentan cambios durante el desarrollo de frutillas, pero no encontraron modificaciones entre los estadios rojo maduro y sobremaduro. Los TAT no produjeron cambios en las pectinas totales y los niveles hallados fueron iguales a los de los controles. Resultados similares fueron hallados por Ben Shalom y col. (1993) en manzanas.

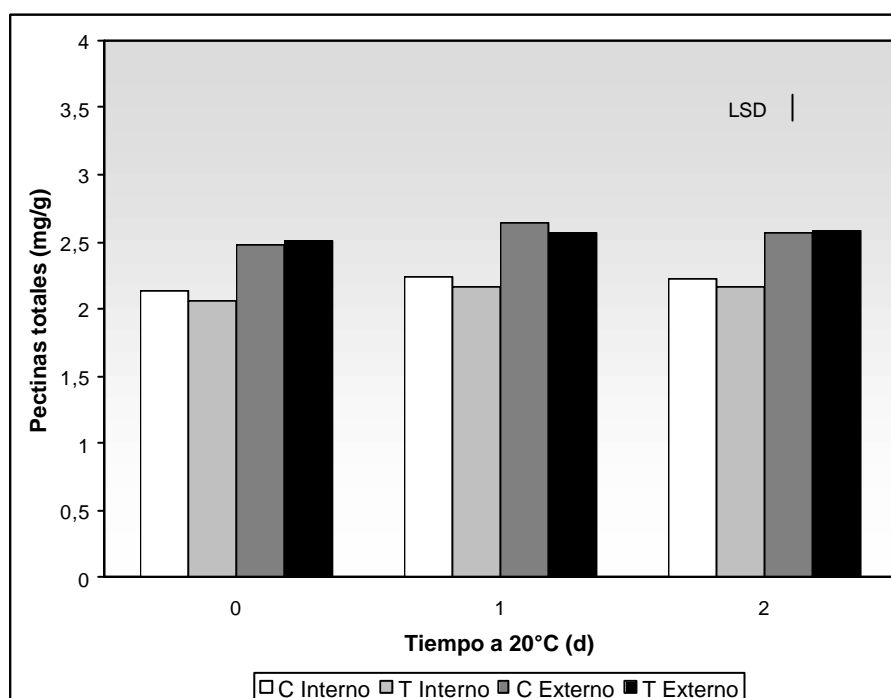


Figura II.12: Pectinas totales en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.3.3. Pectinas solubles en agua (PS_{H_2O}) pectinas solubles en EDTA (PS_{EDTA}) y pectinas solubles HCl (PS_{HCl})

Inmediatamente luego del tratamiento no se observaron diferencias en el contenido de PS_{H_2O} , entre frutos controles y tratados (Figura II.13). Luego de 2 d a 20°C los frutos tratados presentaron un menor nivel de PS_{H_2O} que los controles tanto en la zona interna como externa. En el caso de las PS_{EDTA} , una vez finalizado el tratamiento, los frutos tratados presentaron mayores niveles que los controles en ambas zonas analizadas. Esta diferencia se observó también luego de 1 y 2 d a 20°C (Figura II.14). Finalmente los frutos tratados mostraron una reducción en el contenido de PS_{HCl} luego del TAT en la zona interna (Figura II.15). Durante el almacenamiento a 20°C el contenido de PS_{HCl} disminuyó tanto en la zona interna como externa de los frutos. Sin embargo, la reducción en PS_{HCl} fue menor en el caso de los frutos tratados térmicamente y luego de 2 d a 20°C presentaron mayores niveles de PS_{HCl} que los controles.

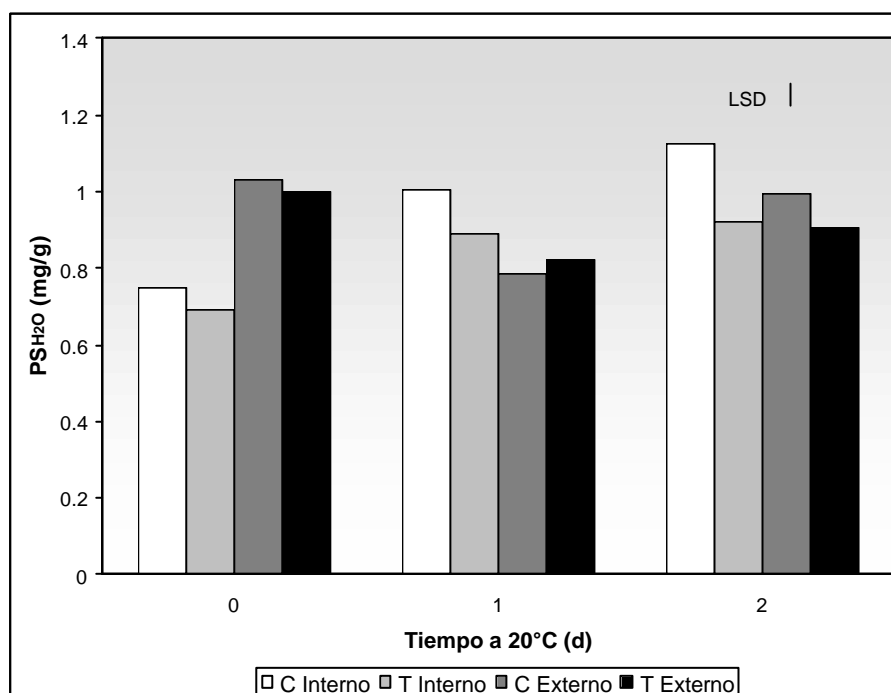


Figura II.13: Pectinas solubles en H_2O en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C , 3 h) durante el almacenamiento a 20°C . Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

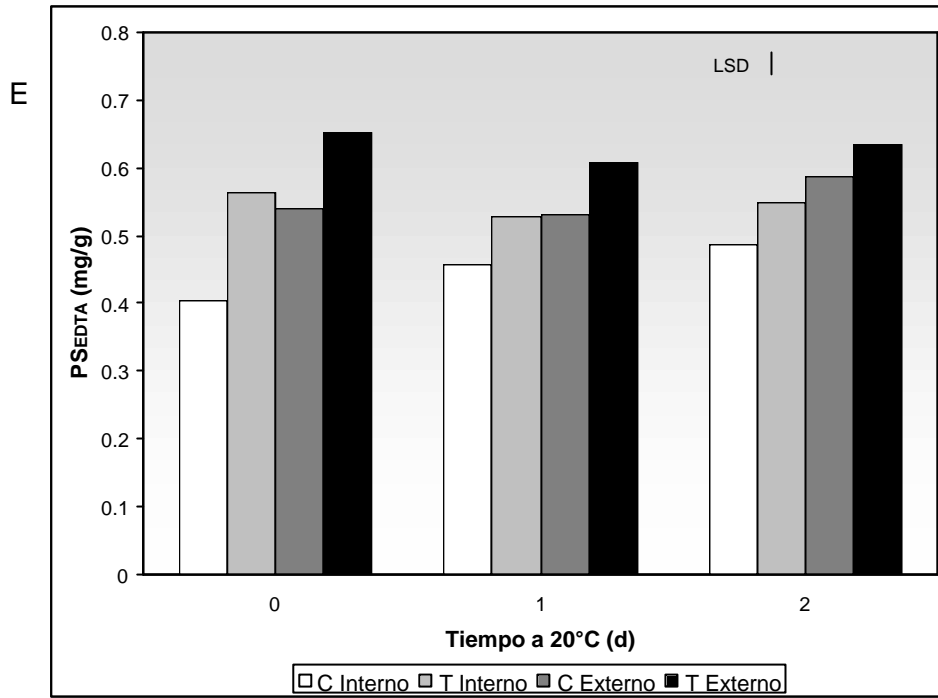


Figura II.14: Pectinas solubles en EDTA en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

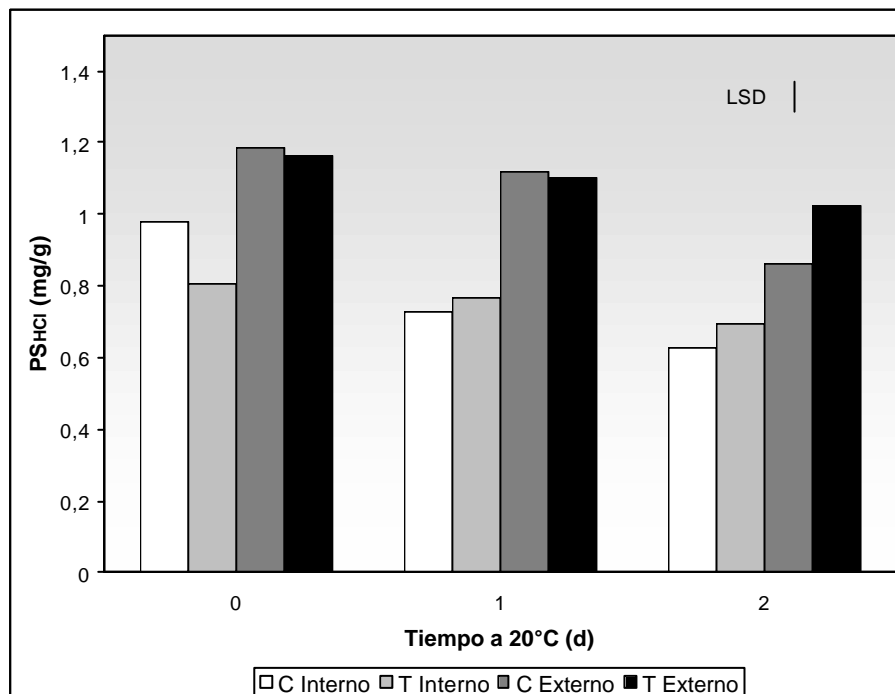


Figura II.15: Pectinas solubles en HCl en la zona interna y externa de frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

El mecanismo bioquímico del ablandamiento de frutos no ha sido elucidado aún (Brummell y Harpster, 2001). Durante la maduración, el porcentaje de pectinas solubles se incrementa pero la cantidad total de residuos urónicos (Woodward., 1972; Knee y col., 1977; Huber., 1984; Regdwell y col., 1997) y el tamaño de los compuestos pécticos son muy levemente modificados (Huber, 1984; Regdwell y col., 1997). Los resultados de este trabajo coinciden con trabajos previos en caqui, en los que se describió una reducción en la solubilización de pectinas como consecuencia de tratamientos térmicos (Woolf y col., 1997). El análisis de paredes de manzanas demostró que la exposición a tratamientos con aire caliente retrasó la solubilización de las pectinas (Klein y col., 1990). La reducción de la actividad β -gal, que puede clivar uniones covalentes en las cadena laterales de los compuestos pécticos, hallados en los frutos tratados podría contribuir a reducir la solubilización de las pectinas. No obstante, otras enzimas como las pectato liasas parecen tener un importante rol en la degradación de pectinas y ablandamiento de frutillas (Jiménez-Bermúdez y col., 2002).

Los mayores niveles de pectinas unidas iónicamente (PS_{EDTA}) en el caso de los frutos tratados inmediatamente luego del tratamiento, podrían explicarse considerando que durante los primeras etapas del tratamiento térmico la temperatura alcanzada en los frutos podría no ser suficiente para inhibir la actividad enzimática. Trabajos previos muestran que PME de tomate presenta una temperatura óptima de 55°C (Van den Broeck y col., 2000). Por otra parte el mayor contenido de PS_{EDTA} que se observó durante el almacenamiento correlaciona con el incremento en PME descrito en 3.2.5. Es conocido que PME actúa desesterificando pectinas y por tanto genera más sitios posibles para la formación de puentes de calcio (Barnavon y col., 2000). Tieman y Handa (1994) hallaron que la expresión de un gen antisentido de PME en tomate redujo los niveles de Ca^{2+} y Mg^{2+} fijado en el pericarpio de los frutos transgénicos. También se encontraron niveles elevados de calcio unido a las paredes celulares en manzanas tratadas térmicamente (Lurie y Klein, 1992). La formación de puentes de calcio podría aportar mayor rigidez a la pared (Jarvis, 1984). Además, la mayor proporción de pectinas desesterificadas modifica la carga de las paredes, lo que podría modular el pH, el balance iónico y limitar el movimiento de proteínas cargadas (Carpita y Gibeaut, 1993). Por otra parte, cambios en el pH y en las condiciones iónicas del apoplasto podrían afectar la actividad de otras enzimas relacionadas con la degradación de pared (Chun y Huber, 2000; Almeida y Huber, 1999).

4. CONCLUSIONES

Los tratamientos térmicos retrasan el ablandamiento en la zona interna y externa de frutillas. Los tratamientos provocan una reducción en la actividad EGasa y β -xil y retrasan la degradación de hemicelulosas. Las actividades de PG y β -galactosidasa también son reducidas por los tratamientos mientras que PME es activada. Esto provoca una disminución en la tasa de degradación de pectinas unidas covalentemente (PS_{HCl}) y un menor incremento de pectinas lábilmente unidas (PS_{H_2O}) lo que podría estar asociado con una reducción en el clivaje de compuestos pécticos por enzimas hidrolíticas. Por otra parte, los mayores niveles de pectinas unidas iónicamente (PS_{EDTA}) en los frutos tratados indican que el incremento de los sitios putativos para la formación de puentes de calcio en la pared celular podría contribuir a retrasar el desensamblaje de los compuestos pécticos.

Capítulo III

***“Efecto de tratamientos térmicos
de alta temperatura sobre el
deterioro y ataque de patógenos
en frutillas”***

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Principales enfermedades de postcosecha de frutillas

La incidencia de enfermedades es uno de los problemas más importantes en la postcosecha de frutillas (Salunkhe y Desai, 1984). Los principales patógenos que pueden atacar a los frutos son: *Botrytis cinerea*, *Rhizopus Stolonifer*, *Mucor mucedo* y *Colletotrichum dematium*. Los tres primeros (especialmente *Botrytis cinerea*) suelen ser los patógenos que ocasionan los mayores problemas durante la postcosecha (Maas, 1992).

a. Podredumbre por *Botrytis cinerea*: Es un hongo capaz de atacar una gran diversidad de frutas y hortalizas durante el almacenamiento postcosecha, así como arbustos, flores, árboles y malezas en cultivo (Maas, 1992). La enfermedad se ve favorecida por condiciones de elevada humedad y baja ventilación. Con algunas excepciones, *Botrytis* ataca principalmente tejidos blandos (flores, pétalos, yemas, plántulas o frutos), tejidos débiles o dañados y tejidos senescentes o muertos (Figuras III.1 y III.2).



Figura III.1: Ataque de *Botrytis* en frutos en desarrollo.

Los ataques de *Botrytis* son frecuentes en cultivos en invernadero, especialmente durante la primavera y otoño cuando las condiciones para el desarrollo del patógeno resultan más favorables. El hongo ocasiona daños en los botones florales y yemas, aunque también puede producir otro tipo de problemas como manchas en hojas y podredumbre radicular. Durante el almacenamiento refrigerado de frutas y hortalizas, las podredumbres ocasionadas por *Botrytis* suelen ser muy importantes y de difícil control, ya que este hongo puede continuar creciendo aún a temperaturas cercanas a 0°C (Olías y col., 1998). La infección comienza en las flores, pero los síntomas se observan comúnmente en los frutos. Las lesiones en muchos casos se observan en la zona basal y se asocian con la presencia de estambres o pétalos infectados adheridos a la fruta o atrapados bajo el cáliz. Las infecciones también pueden producirse a través de rajaduras, cortes, lesiones, daños por insectos y otros patógenos (Agrios, 1999). Las lesiones comienzan como manchas firmes, pequeñas, de color amarillento, que rápidamente se expanden formando regiones marrones irregulares de aspecto blando. Luego se cubren de micelio blanco y esporas color grisáceo. A partir de aquí, puede continuar su expansión y destruir totalmente el fruto pudiendo eventualmente momificarlo. Los frutos enfermos pueden liberar un elevado número de esporas favoreciendo la diseminación de la enfermedad (Maas, 1992).



Figura III.2: Ataque de *Botrytis* en frutos maduros.

Características del agente causal: *Botrytis cinerea* es el estado conidial de *Sclerotinia fuckeliana* de Bary. En agar papa glucosado el micelio es de color blanco y luego se torna gris. Las hifas son septadas, ramificadas y hialinas. Forman conidióforos de hasta 5 mm oscuros y ramificados en forma irregular o dicotómica. En la parte superior de los mismos, se forman una serie de ramificaciones cortas que llevan las esporas. Los conidios son unicelulares, coloreados o no y de un tamaño de 11x11x15 μm (Figura III.3). Pueden tener forma elipsoidal o globoide. El estado sexual se encuentra raramente en la naturaleza. En este caso se forman esclerocios oscuros irregulares (Maas, 1992).

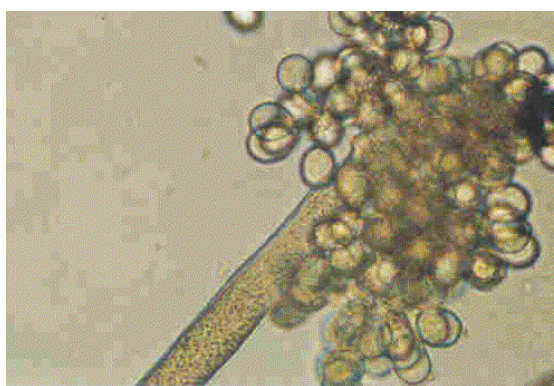


Figura III.3: Conidióforo y conidios de *Botrytis* sp.

Ciclo de la enfermedad: El hongo pasa el invierno en forma de micelio o bien como esclerocios de color oscuro y forma irregular. El movimiento de restos vegetales y suelo provoca la diseminación del hongo que germinará y crecerá bajo condiciones de humedad elevada y temperaturas de 15-25°C. Las infecciones raramente ocurren por encima de 25°C, pero una vez que esta ocurren, el hongo crece en el rango de 0 a 35°C (Maas, 1992).

b. Podredumbre por Rhizopus sp: La podredumbre por *Rhizopus* es característica de la postcosecha de frutillas, aunque también puede ocurrir en el campo en frutos maduros. Las esporas se encuentran usualmente en el aire y pueden diseminarse fácilmente. El hongo penetra en frutos maduros sólo a través de heridas. Los frutos infectados se observan levemente decolorados y se tornan gradualmente de color marrón claro. Luego colapsan rápidamente y comienzan a exudar. Bajo condiciones de elevada humedad, se cubren de una masa densa de micelio blanquecino que posee largos esporangióforos que finalizan en esporangios negros (Figura III.4).

Este problema se encuentra ampliamente distribuido pero su importancia ha sido minimizada ya que el enfriamiento por debajo de 5°C limita el crecimiento y esporulación de *Rhizopus sp.* (Mitchell y col., 1996).

Características del agente causal: El agente causal más común de estas podredumbres en frutillas es *R. stolonifer* Ehremb. y ocasionalmente *R. sexualis* Smith. Estos hongos son cosmopolitas, atacando una gran diversidad de frutos. Las colonias de *R. stolonifer* en agar papa glucosado son en un principio blancas y algodonosas y luego se tornan de color oscuro en la madurez. Las hifas son gruesas (10-20 μm de espesor). Los esporangióforos se producen a partir de estolones que se unen a los sustratos a través de rizoides. Los esporangióforos miden comúnmente 1-2 mm pero pueden llegar hasta 2 cm. Los mismos culminan en esporangios erectos de 85-200 μm de diámetro. Las esporas (10-20 x 7-8 μm) son marrones a negras, estriadas y ovaladas. Las zigosporas resultantes de la fusión sexual son también redondeadas, oscuras y de un tamaño de 160-220 μm de diámetro (Maas, 1992).



Figura III.4: Esporangio de *Rhizopus sp.*

Ciclo de la enfermedad: *R. stolonifer* es un hongo saprófito que vive en restos vegetales en descomposición, o en el suelo. Las zigosporas sirven como esporas de resistencia y las esporangiosporas pueden mantener su viabilidad por varios meses. *Rhizopus sp.* es un hongo que invade tejidos dañados. Una vez que la infección se ha establecido, la acción de enzimas pectolíticas degrada la laminilla media, ocasionando una desorganización de los tejidos del fruto. La esporulación es abundante y rápida bajo condiciones favorables, pudiendo diseminarse fácilmente por el viento (Maas, 1992).

1.2. Estrategias para el control de enfermedades de postcosecha

Las estrategias para el control de enfermedades de postcosecha resultan muy variadas. De todos modos, cualquiera de los métodos utilizados intenta lograr la reducción de la cantidad de inóculo, la reducción de la patogenicidad del organismo causante de la enfermedad, la reducción de la susceptibilidad del fruto y/o el incremento de su resistencia.

1.2.1. Reducción de la cantidad de inóculo

La primera estrategia posible para reducir la incidencia de enfermedades consiste en reducir la cantidad de inóculo. Por esta razón, resulta importante comprender que el control de enfermedades de postcosecha comienza a realizarse durante la precosecha. Así existe un gran número de medidas susceptibles de ser consideradas a fin de reducir la carga de inóculo de los frutos a la llegada a la planta de empaque, como utilizar plantas de buena calidad sanitaria, realizar los cultivos en sitios luminosos y bien drenados, realizar una esmerada preparación del terreno, evitar en la medida de lo posible suelos muy pesados, densidad de plantas excesiva, pobre ventilación, plantaciones muy profundas y la fertilización excesiva (especialmente con nitrógeno), utilizar mulch para evitar el contacto de los frutos con el suelo, evitar la acumulación de excesiva humedad, mantener los invernaderos ventilados, evitar excesos hídricos y cambios térmicos bruscos, evitar la condensación de agua sobre las plantas, utilizar fungicidas recomendados cuando las condiciones son predisponentes para la enfermedad, remover todos los frutos que presenten ataque de *Botrytis* en la zona de producción, utilizar cajones totalmente higienizados para la recolección de los frutos y luego de la cosecha coleccionar los restos de tejidos vegetales muertos (PROEXANT, 2004).

Los patógenos de postcosecha son llevados a las plantas de empaque tanto en frutos infectados como en frutos sanos. Los restos de material en descomposición cerca de las plantas de empaque son también una fuente de inóculo y luego de un tiempo, el aire, los equipos y el agua en la planta pueden contaminarse. Las medidas de sanitización para reducir la cantidad de inóculo en la planta resultan de utilizar diferentes químicos para disminuir la incidencia de enfermedades de postcosecha. El formaldehído es altamente efectivo contra hongos de postcosecha. No obstante, posee una elevada toxicidad y es corrosivo, lo que dificulta su utilización. Algunos fungicidas como el orto-fenilfenato de sodio pueden utilizarse para la desinfección de cajones cosecheros. Las cintas transportadoras pueden tratarse con sales de amonio cuaternario, hipoclorito de sodio y orto-fenilfenato de sodio. En el caso de frutillas, no se recomienda el enfriamiento con agua o lavado de los frutos, por lo que la contaminación por el uso de agua no es tan importante como en otros productos. La utilización de fungicidas resulta una estrategia utilizada para la disminución de la cantidad de inóculo en muchos frutos, pero en el caso de frutillas las aplicaciones de este tipo de productos se realizan solamente en la precosecha (PROEXANT, 2004).

1.2.2. Reducción de la patogenicidad del agente causal

Germinación y adhesión: El proceso de patogénesis comienza con la adhesión de las esporas a la superficie del hospedante y la germinación de las mismas (Staples y Mayer, 1995). Cualquier estrategia que afecte estos procesos será de utilidad para reducir la incidencia de enfermedades. La utilización de ceras resulta útil en algunos frutos, ya que la formación de una barrera no polar dificulta la iniciación del proceso de patogénesis. No obstante, ésta no es una práctica recomendada en el caso de frutillas. Algunos tratamientos como la refrigeración (Mitchell, 1992), las atmósferas modificadas (Agar, 1990) y la aplicación de tratamientos con luz UV-C (Pan y col., 2004) permiten retrasar la germinación de esporas fúngicas y con ello reducir la patogenicidad de los microorganismos.

Penetración y colonización de tejidos: Una etapa importante para la instalación de la enfermedad es la penetración de los patógenos para dar lugar a la colonización de los frutos (Sasaki y Nagayama, 1994). Por lo tanto algunas estrategias posibles a fin de reducir la patogenicidad de los hospederos consisten en controlar el medio ambiente donde se realizará el almacenamiento.

Los principales factores que afectan el desarrollo de enfermedades de postcosecha son:

a. Temperatura: La temperatura afecta a la incidencia de enfermedades de postcosecha más que ningún otro factor del ambiente. El manejo de temperatura resulta crítico para controlar las enfermedades y comúnmente otras medidas tomadas se consideran suplementos de la refrigeración. Una vez que los frutos han sido cosechados debe realizarse el enfriamiento de los mismos a la temperatura óptima (Kader, 1992).

b. Humedad relativa: Los productos perecederos son especialmente susceptibles al ataque de patógenos cuando se encuentran mojados. Por lo tanto las frutas deben ser cosechadas, manipuladas y almacenadas cuando no poseen agua libre en su superficie. Por otra parte, estos productos se deterioran marcadamente si no son almacenados en condiciones de humedad elevada. Una HR de 85-95% se recomienda generalmente para el almacenamiento de frutas (Mitchell y col., 1996).

c. Modificación y control de atmósferas: Las frutas y hortalizas son a menudo expuestas a ambientes en los que se ha alterado la composición de la atmósfera, lo que puede reducir significativamente la incidencia de enfermedades de postcosecha al afectar entre otras cosas el desarrollo de los patógenos (Yahía e Higuera-Ciapara., 1992). Existen diferentes posibilidades de modificación de atmósferas, siendo las más comúnmente utilizadas el incremento de los niveles de CO₂ y la reducción del contenido de O₂.

1.2.3. Reducción de la susceptibilidad de los frutos

1.2.3.1. Integridad de tejidos

Como se indicó anteriormente, muchos patógenos de postcosecha ingresan a sus hospedantes a través de heridas. Por lo tanto una forma de reducir sustancialmente la incidencia de enfermedades de postcosecha es tomar todas las precauciones necesarias para evitar golpes y heridas que puedan producirse durante el manipuleo de los frutos (Kader, 1992). Por otra parte, el ataque de *Botrytis cinerea* involucra la síntesis de una serie de enzimas por parte del hongo que participan en la degradación de las paredes celulares del fruto (Viterbo y col., 1994).

Éstas incluyen a la celulasa, poligalacturonasa, pectin metilesterasa y β -glucosidasa. Se ha hallado una correlación positiva entre la actividad β -glucosidasa de *Botrytis cinerea* y su patogenicidad en manzanas (Sasaki y Nagayama, 1994) y uvas (Touzani y col., 1994). Además de la degradación de paredes celulares inducida por acción del hongo, como se mencionó en el Capítulo II éste es un proceso natural en la maduración de los frutos y que ocurre a una tasa elevada en el caso de frutillas. Por lo tanto, la aplicación de tratamientos que permitan el retraso del desensamblaje de los polímeros de la pared puede tener influencia sobre el desarrollo de enfermedades, ya que dificulta el proceso de infección. Dentro de los tratamientos que disminuyen el ataque de patógenos y el ablandamiento debido a un retraso de la degradación de las paredes celulares se encuentran entre otros la refrigeración, la inhibición de la acción del etileno (principalmente en frutos climatéricos), las atmósferas modificadas, la aplicación de luz UV-C (Kader, 1992; Baka y col., 1999), la obtención de plantas transgénicas con una menor tasa de degradación de pared celular (Jiménez Bermúdez y col., 2002) y los tratamientos térmicos de alta temperatura (Capítulo II).

1.2.3.2. Defensa antioxidante

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico. Generalmente resultan de la excitación del O_2 para formar el oxígeno singulete o de la transferencia de 1, 2 ó 3 electrones para formar el radical superóxido, peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo (Mittler, 2002). A diferencia del oxígeno atmosférico las ERO son capaces de provocar la oxidación de diferentes componentes celulares y determinar la destrucción de la célula (Asada, 1999). La muerte celular provocada por las ERO puede resultar de procesos como la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas, la inhibición de enzimas y el daño a nivel de ARN y ADN (Noctor y Foyer, 1998). Las plantas han desarrollado una serie de mecanismos que le permiten mantener los niveles de ERO bajo control. Los principales mecanismos incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), fenol peroxidasas (POD) y catalasa (CAT) (Asada, 1994; Bowler, 1992; Mittler, 2002). El balance entre estas enzimas resulta crucial para mantener los niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno. Otros antioxidantes como el ascorbato, fenoles y el glutatión también resultan de utilidad para evitar el daño oxidativo (Noctor y Foyer, 1998). Así, se observa que plantas transgénicas alteradas en sus niveles de ácido ascórbico son hipersensibles al estrés oxidativo (Conklin y col., 1996). Existen diferentes fuentes de producción de ERO en plantas

incluidas reacciones involucradas en el metabolismo normal. Bajo condiciones normales la producción de ERO a nivel celular es baja, pero diversas condiciones de estrés pueden alterar la homeostasis e incrementar la producción de ERO. Dentro de las condiciones que favorecen la producción de ERO se encuentran una serie de situaciones comunes durante el almacenamiento postcosecha de frutas y hortalizas, como las bajas temperaturas, la deshidratación, la falta de nutrientes, la senescencia, el daño mecánico y el ataque de patógenos (Allen, 1995, Bowler, 1992). *Botrytis cinerea* produce diversas oxidasas que generan peróxido de hidrógeno incluyendo a las enzimas glucosa oxidasa, xilosa oxidasa, galactosa oxidasa y ascorbato oxidasa, (Edlich y col., 1989). Ha sido hallada una correlación positiva entre la patogenicidad de *B. cinerea* y los niveles de ERO (Edlich y col., 1989). Por otra parte, en concordancia con el hecho de que las ERO poseen un rol en la patogenicidad, Edlich y col., (1989) hallaron que diferentes antioxidantes inhiben la infección. Todo esto indica que la modificación del estado antioxidante de los frutos podría influir sobre su susceptibilidad a ciertas enfermedades. Estudios realizados mediante la obtención de plantas transgénicas sobre-expresando diversas enzimas antioxidantes permitieron comprobar que las plantas tenían menor susceptibilidad a enfermedades (Bowler y col., 1992). Desde otro punto de vista algunos tratamientos de postcosecha podrían afectar a los sistemas de defensa antioxidante y con ello contribuir a una mejora en la respuesta a las condiciones de estrés oxidativo que puedan generarse durante el almacenamiento como consecuencia de la acción de factores de tipo biótico o abiótico que puedan ejercer alguna influencia desventajosa.

1.2.4. Incremento de la resistencia del fruto

La resistencia a las enfermedades en plantas en muchos casos puede asociarse a la activación de una amplia gama de mecanismos de defensa útiles para reducir la movilidad o replicación de los patógenos. Algunas de las respuestas comunes incluyen el entrecruzamiento de las paredes celulares por la acción de peroxidadasas, la activación de genes que codifican para glutatión transferasas, inhibidores de proteinasas, quitinasas, glucanasas, polifenol oxidasas, peroxidadasas, inhibidores de poligalacturonasas y enzimas que participan en la biosíntesis de otros compuestos como fenilalanina amonioliase (Van Loon, 1997; Somssich y Hahlbrock 1998; Machinandiarena y col., 2001). PAL es la primera enzima en la vía de los fenilpropanoides, que involucra la síntesis de compuestos de bajo peso molecular con capacidad antimicrobiana conocidos como fitoalexinas.

La reducción de PAL en plantas transgénicas provocó una disminución de la resistencia local de las plantas a los patógenos (Maher y col., 1994). Los fenil-propanoides son una parte fundamental del arsenal de defensa de los vegetales contra patógenos. Así, los monolignoles, flavonoides, isoflavonas y estilbenos sirven como fitoalexinas preformadas o inducidas en diferentes especies (Dixon, 2001). El incremento en la producción de estos compuestos mejora la resistencia a enfermedades (He y Dixon, 2000). La expresión de PAL es incrementada en respuesta a diferentes elicitores (Jaek y col, 1992; Pellegrini y col., 1993) lo que podría traducirse en un aumento en la síntesis de compuestos defensivos.

Señalización de respuestas de defensa: Existe mucha evidencia que indica que el ácido salicílico (AS) es una molécula fundamental en la señalización de las respuestas de defensa locales y sistémicas (Delaney y col., 1994). La incorporación de transgenes de bacterias para incrementar la producción de AS incrementó la resistencia de las plantas a patógenos (Verbene y col., 2000). Hasta hace poco se creía que el AS era sintetizado a partir de la L-fenilalanina (Lee y col., 1995). No obstante, evidencia genética ha mostrado recientemente que una importante fracción del AS inducido durante las respuestas de defensa se origina a partir del isocorismato en una vía independiente de la de los fenil-propanoides (Wildermuth y col., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que otras hormonas como el etileno y el ácido jasmónico también median la activación de diferentes respuestas de defensa (Baker y col., 1997).

1.3. Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura sobre la incidencia de enfermedades de postcosecha

Uno de los principales efectos de la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura es la reducción del ataque de patógenos (Woolf, 1995; Paul, 1990; Lurie, 1998). No obstante, los mecanismos responsables del control de patógenos en los frutos tratados no están totalmente elucidados y el tipo de respuesta encontrada depende del producto analizado y de las condiciones de tratamiento utilizadas (Lurie, 1998). Se ha informado la existencia de un efecto directo del calor en la reducción de la viabilidad de los hongos, así como en la capacidad de infección. Fallik y col. (1996c) encontraron que los TAT reducen la patogenicidad de *Penicillium expansum* en manzanas al reducir la germinación de esporas.

Resulta de interés destacar que cuando los frutos se inocularon luego del tratamiento también se observó una reducción en la infección, sugiriendo la presencia de compuestos inhibitorios o mecanismos activos de defensa que podrían contribuir a reducir el ataque de patógenos. Similares resultados se observaron en peras, donde la incidencia de *Mucor* y *Phialophora* fue reducida mediante la aplicación de TAT incluso cuando los frutos fueron inoculados luego del tratamiento térmico (Spotts y Chen, 1987). Los mecanismos indirectos de resistencia contra patógenos involucran una serie de interacciones complejas con diferentes líneas de respuesta, como la presencia de barreras mecánicas a los microorganismos, la presencia de compuestos antimicrobianos y la existencia de proteínas capaces de tolerar las condiciones de estrés o de inhibir la colonización de los tejidos por los patógenos (Couey, 1989). Algunas de estas respuestas son constitutivas, mientras que otras son inducidas por diferentes factores. La aplicación de TAT incrementa la resistencia de frutos en algunos casos al inducir a la enzima PAL y con ello la biosíntesis de lignina y compuestos fenólicos. También se ha mencionado la obstrucción de rajaduras a nivel superficial de los frutos debido a la fusión y redistribución homogénea de las ceras superficiales (Roy y col., 1994) como consecuencia de la aplicación de TAT. Este efecto fue hallado en diferentes frutos tratados térmicamente, tales como pomelo (Rodov y col., 1996), mandarina (Schirra y D'hallewin, 1997), pimientos (Fallik y col., 1996b) y melones (Fallik y col., 2000). En otros casos se ha encontrado un incremento en los niveles de compuestos antimicrobianos. Estudios en cítricos mostraron que los TAT promueven la síntesis de la fitoalexina escoparona en las células cercanas a heridas luego de 12-24 h del tratamiento (Kim y col., 1991). Otros estudios mostraron que los TAT incrementan la actividad de proteínas asociadas a defensa como quitinasas, glucanasas y peroxidasas (Schirra y col., 2000; Lurie, 1997). Estos resultados demuestran la existencia de respuestas comunes entre el estrés por alta temperatura y el provocado por patógenos. Por otra parte, también se ha descrito la existencia de respuestas comunes frente al estrés térmico y al estrés oxidativo, aunque no se ha analizado en detalle en frutos (Larkindale y Knight, 2002; Dat y col., 1998). La inducción de HSP, que es una respuesta común de los organismos luego de la exposición a las altas temperaturas (Nover, 1991), puede ser inducida por estrés oxidativo (Liu y Thiele, 1996; Mc Dufee y col., 1997). Del mismo modo, el estrés térmico puede inducir la expresión de genes involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo (Morgan y col., 1986). La modificación de la defensa antioxidante como consecuencia de diferentes tratamientos resulta entonces de interés ya que el

incremento de las ERO y el daño oxidativo puede presentarse comúnmente durante la postcosecha como consecuencia del ataque de patógenos, estrés por bajas temperaturas, deficiencia de agua y nutrientes y advenimiento de la senescencia.

El objetivo del presente capítulo es analizar si la reducción en la incidencia de enfermedades de postcosecha provocada por los TAT en frutillas se asocia con efectos directos del calor sobre la viabilidad y patogenicidad de los hongos o si existen respuestas mediadas por el fruto (asociadas con el metabolismo fenólico u oxidativo) que puedan estar involucradas en el proceso.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Efecto directo de los tratamientos

2.1.1. Viabilidad bacterias y hongos

Se cosecharon frutillas (*Fragaria x ananassa* cv Selva) con 75% de color superficial rojo y se trasladaron inmediatamente al laboratorio. Se seleccionaron frutos sin presencia de defectos o deterioro, se colocaron en bandejas plásticas y se cubrieron con PVC (15 µm de espesor). Luego se trataron a 45°C por 3 h. Finalizado el tratamiento las bandejas se almacenaron a 0°C por 0,7 y 14 d y luego se transfirieron a 20°C por 2 d. Se tomaron dos muestras de 5 frutos para cada tiempo de almacenamiento y tratamiento analizado. Cinco frutos, pesando aproximadamente 50 g se agitaron en agua estéril por 45 min. A partir de la suspensión resultante, se prepararon dos series de diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-5} y 1 ml de cada dilución se sembró en medios de cultivo apropiados (placas Petrifilm™ 6400 y 6407, 3M, St. Paul, MN, USA) por triplicado. Las placas para el recuento de bacterias mesófilas se incubaron a 30°C por 2 d y las correspondientes al recuento de hongos a 20°C por 5 d. Los recuentos se descartaron cuando se encontraron menos de 30 o más de 300 colonias. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de fruto. El experimento se repitió dos veces en el caso de hongos y tres veces en el caso de bacterias. Dado que la misma tendencia se observó en todos los casos, sólo se muestran los resultados del primer experimento.

2.1.2. Velocidad de germinación de conidios

Alícuotas de suspensiones conidiales de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* obtenidas de cepas aisladas en el IIB-INTECH (INTECH 377/00-F18 e INTECH 364/00-F8, respectivamente) se sembraron en agar papa glucosado y luego se incubaron las placas en la oscuridad a 20°C por 12 d. Las placas se colocaron en estufa a 45°C por 3 h. Un grupo de placas no se trató térmicamente y fue utilizado como control. Los conidios se suspendieron en Tween-20 0,03%, y la suspensión se filtró a través de un filtro de tela. Utilizando un hemocitómetro para realizar los recuentos se prepararon diluciones de la suspensión y se ajustó la concentración a 2×10^5 conidios ml⁻¹. Utilizando una placa multicelda los conidios se colocaron en las celdas con Tween-20 0,03% y extracto de malta 2 x. La germinación se frenó cada hora adicionando una alícuota de 100 µl de formaldehído.

El porcentaje de germinación se estimó contando 100 esporas al azar en un microscopio (400 x). Un conidio se consideró germinado cuando la longitud del tubo germinativo fue igual o superior a la del conidio. Cada conteo se realizó por triplicado y la experiencia completa se realizó por duplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de conidios germinados.

2.2. Efecto de tratamientos térmicos sobre el metabolismo fenólico

2.2.1. Fenoles totales

Se cosecharon frutos 75% rojos y se trataron térmicamente. Luego se almacenaron a 20°C por 2 d. Se cortaron dos discos (5 mm de espesor) de la zona ecuatorial de cada fruto y se dividieron en 2 zonas (externa e interna). La zona externa fue obtenida separando el tercio externo mientras que los dos tercios restantes fueron considerados como zona interna. Se tomaron muestras luego del tratamiento y luego de 1 y 2 d a 20°C y las mismas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Aproximadamente 1 g de fruto congelado se procesó en 6 ml de etanol. La mezcla se homogeneizó y centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4°C. Tres mililitros del sobrenadante resultante se llevaron a 100 ml con agua. Los extractos se utilizaron para la determinación de fenoles totales. Doscientos microlitros de extracto se adicionaron a 1,11 ml de agua y 200 µl de reactivo Folin-Ciocalteu. Luego de 3 min a 25°C se adicionaron 1,5 ml de solución saturada de Na₂CO₃ y la mezcla de reacción se incubó por 1 h a la misma temperatura. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento, zona y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por triplicado. Se midió la absorbancia a 760 nm y se calculó el contenido de compuestos fenólicos utilizando fenol como estándar. El contenido de fenoles totales se expresó como g de fenol por kg de fruto.

2.2.2. Actividades enzimáticas

Para la evaluación de la actividad de enzimas vinculadas con el metabolismo fenólico se cosecharon frutos 75% rojos y se trataron térmicamente (45°C, 3h). Luego se almacenaron a 20°C por 1 d. Se tomaron muestras finalizado el tratamiento y luego de 6, 12 y 24 h en el caso de polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD), y luego de 0, 12, 24 y 48 h en el caso de fenilalanina amonio-liasa (PAL). Las mismas se procesaron inmediatamente o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.2.2.3. Actividad fenilalanina amonioliasa (PAL)

Aproximadamente 5 g de tejido fresco se homogeneizaron por 2 min en un Omnimixer con 20 ml de buffer $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, mercaptoetanol 50 mM, EDTA 2 mM polivinilpolipirrolidona (PVPP) 30 g l⁻¹, pH 8,8. La suspensión se centrifugó a 10.000 x g por 10 min y el sobrenadante se utilizó para ensayar la actividad PAL. La mezcla de reacción se preparó del siguiente modo: buffer $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,03 M, L-fenilalanina 0,01 M y 1 ml de extracto enzimático en un volumen final de 3 ml. La mezcla se incubó a 30°C y la actividad se determinó espectrofotométricamente a 290 nm a través de la producción de ácido trans-cinámico. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica (ΔDO) en una hora bajo las condiciones del ensayo, por gramo de fruto. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.2.2. Actividad pirogalol peroxidasa (POD)

Aproximadamente 5 g de tejido fresco se homogeneizaron por 2 min en un Omnimixer con 20 ml de buffer Na_2HPO_4 0,02 M, NaH_2PO_4 0,03 M, PVPP 10 g l⁻¹, PMSF 1mM, Triton X 100 0,1% v/v, NaCl 1 M, pH 7,0. La suspensión se centrifugó a 10.000 x g por 10 min y el sobrenadante se utilizó para ensayar la actividad pirogalol peroxidasa. La mezcla de reacción se preparó del siguiente modo: buffer fosfato 50 mM pH 6,5, H_2O_2 8 mM, pirogalol 45 mM y 300 μl de extracto en un volumen total de 3 ml. La mezcla se incubó a 30°C y la actividad se determinó espectrofotométricamente a 430 nm. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica (ΔDO) en una hora bajo las condiciones del ensayo, por gramo de fruto. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.2.3. Actividad polifenol oxidasa (PPO)

Aproximadamente 5 g de tejido congelado se homogeneizaron por 2 min en un Omnimixer con 20 ml de buffer (Na_2HPO_4 0,02 M, NaH_2PO_4 0,08 M, PVPP 30 g l⁻¹, PMSF 1mM, Triton X 100 0,1% v/v, NaCl 1 M, pH 6,0). La suspensión se centrifugó a 10.000 x g por 10 min y el sobrenadante se utilizó para ensayar la actividad polifenol oxidasa. La mezcla de reacción se preparó del siguiente modo: buffer fosfato 100 mM pH 6,0; pirocatecol 20 mM, y 400 μl de extracto en un volumen total de 3 ml. La mezcla se incubó a 30°C y la actividad se determinó espectrofotométricamente a 410

nm.

Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica (ΔDO) en una hora bajo las condiciones del ensayo, por gramo de fruto. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.3. Contenido de ácido salicílico

Se procesaron aproximadamente cinco gramos de frutos congelados con 10 ml de etanol 90% en un Omnimixer y el extracto obtenido se centrifugó a 10.000 x g por 15 min. El tratamiento de las muestras se realizó de acuerdo a Scott y Yamamoto (1994). Finalmente las muestras se resuspendieron en 500 μ l de buffer fosfato 100 mM pH 7,0, se filtraron a través de membranas de 0,22 μ m y se inyectaron (20 mbar por 25 segundos) en un equipo de electroforesis capilar Hewlett Packard 3D (Agilent Technologies, Inc. CA, USA), equipado con un capilar de sílica fundida de 25 mM de diámetro interno (Thermal Separations, USA). Los capilares nuevos, fueron acondicionados por lavados sucesivos con HCl 1M, NaOH 1M y agua. Las corridas fueron registradas mediante un detector de arreglo de diodos UV-visible (190–600 nm), realizándose finalmente la detección a 280 nm. Las determinaciones se realizaron a 20°C en buffer K_2HPO_4 - KH_2PO_4 100mM pH 7,0 y el voltaje utilizado fue de 25 kV. Se utilizaron muestras de AS como patrón. Se prepararon dos extractos independientes para cada tratamiento y tiempo analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.3. Efecto de tratamientos térmicos sobre el deterioro y aspectos vinculados al metabolismo oxidativo

2.3.1. Material vegetal.

Frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch., cv. Selva) se cosecharon con 75% de color superficial. Los frutos se transportaron al laboratorio inmediatamente, donde se inspeccionaron seleccionándose sólo frutos uniformes en color y tamaño y libres de daño mecánico e infecciones.

2.3.2. Tratamiento térmico y almacenamiento

Doscientos setenta frutos se colocaron en bandejas plásticas (10 frutos por bandeja), se cubrieron con PVC (15 μ m de espesor) y se trataron por 3 h a 45°C en

estufa. Luego del tratamiento las bandejas se almacenaron a 0°C por 0, 7 ó 14 d y finalizado dicho período se transfirieron a 20°C por 2 d. Las muestras se tomaron luego de 0, 7 y 14 d a 0°C seguido de 0, 1 ó 2 d a 20°C y la fruta se analizó inmediatamente o se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.3.3. Actividad respiratoria

La producción de CO₂ durante el almacenamiento se midió confinando 100 g de frutos en jarras de 1000 ml. Las muestras se tomaron luego de 2 h con una jeringa de 1 ml a través de un septum presente en las jarras. El análisis de gases se realizó utilizando un cromatógrafo gaseoso (Varian CX 3400, CA, USA) equipado con una columna CTR I (Alltech, San José, CA, USA) y un detector de conductividad térmica. Las temperaturas en el inyector, columna y detector fueron de 120, 30 y 120°C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador con un flujo de 20 ml min⁻¹, y se utilizó una mezcla conteniendo 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ como estándar. Las determinaciones se realizaron por triplicado y la tasa respiratoria se expresó en ml de CO₂ kg⁻¹ h⁻¹.

2.3.4. Pérdida de electrolitos y pérdida de potasio

Cinco discos de frutos (3 mm de espesor, pesando 3 g) de la zona ecuatorial de los frutos se incubaron en 25 ml de una solución de sorbitol 0,6 M y fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0). La conductividad eléctrica de la solución se midió al comienzo de la incubación y luego de 3 h. A fin de evaluar el contenido de electrolitos remanentes los discos se congelaron, descongelaron y procesaron en un Omnimixer (Sorvall, Inc., Norwalk, Conn, USA) con 25 ml de la solución descrita anteriormente. La suspensión obtenida se filtró a través de una tela, se centrifugó a 10.000 x g por 10 min y se midió la conductividad del sobrenadante. Se realizaron triplicados para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado. Las mismas soluciones se utilizaron para determinar el contenido de potasio por fotometría de llama (Metron Lab Instruments, Londres, Inglaterra). Los resultados se expresaron como el porcentaje de pérdida de electrolitos o potasio.

2.3.5. Actividad pirogalol peroxidasa

La determinación se realizó como se describió en 2.2.2.2.

2.3.6. Peróxido de hidrógeno

El contenido de peróxido de hidrógeno se determinó utilizando luminol según Warm y Laties (1982) y Chen y col., (1993) con modificaciones menores. El tejido (0,5 g) se procesó en nitrógeno líquido y se extrajo con 3 ml de ácido tricloro acético (TCA) 5% p/v previamente refrigerado. Los extractos crudos se centrifugaron por 10 min a 9.000 x g a 2°C. Una fracción del sobrenadante (0,5 ml) se sembró en una columna conteniendo resina Dowex como fase estacionaria previamente equilibrada con 5% de TCA. La columna se lavó con 3,5 ml de TCA 5% y el eluato se recogió y utilizó para la determinación de H₂O₂. En un tubo se mezclaron 0,5 ml de eluato y 0,5 ml de luminol 0,5 mM y el volumen se llevó a 5,5 ml con NH₄OH 0,2 M (pH 9,0). La mezcla se analizó utilizando un equipo de quimioluminiscencia. La reacción se inició inyectando 50 µl de ferricianuro de potasio 0,5 mM en NH₄OH 0,2 M (pH 9,0). Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado y las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como cantidad de H₂O₂ producida relativa al valor inicial.

2.3.7. Poder antioxidante

La capacidad para neutralizar radicales libres de los frutos se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Brand Williams y col., (1995). Muestras de 1 g de fruto se procesaron en 6 ml de etanol y la mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4°C. Tres mililitros del sobrenadante se llevaron a 100 ml con agua. Alícuotas del extracto etanólico (5, 10, 20, 40, 80 y 120 µl) se adicionaron a tubos conteniendo 3,9 ml de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) 0,025 g l⁻¹ en metanol preparado diariamente. Se midió la absorbancia a diferentes tiempos con un espectrofotómetro (Modelo DU650, Beckman, Berkeley, CA, USA) hasta que no se observaron cambios en la absorbancia. Se graficó el porcentaje de DPPH* remanente contra el volumen de extracto adicionado y se determinó la cantidad de extracto necesaria para reducir la concentración de DPPH* en un 50%, la que se definió como EC₅₀. Las determinaciones se realizaron por triplicado. El poder antioxidante se expresó como EC₅₀⁻¹.

2.3.8. Ácido ascórbico

Aproximadamente 5 g de fruto se procesaron con 20 ml de ácido cítrico 3% p/v en un Omnimixer. Los extractos se centrifugaron a 10.000 x g por 10 min. Todos los

pasos durante la extracción se realizaron a 04°C. Alícuotas del sobrenadante se filtraron a través de una membrana de celulosa y se utilizaron para la determinación de ácido ascórbico. Las determinaciones se realizaron por HPLC en un equipo Waters (Waters Associates, Inc., Milford, MA, USA) equipado con una columna de fase reversa (Ultrasphere ODS of 250 mm x 4,6 mm Beckman CA, USA). Se empleó acetonitrilo-agua (30:70), K₂HPO₄ pH 4,3 como fase móvil a un flujo de 2 ml min⁻¹. La detección se realizó espectrofotométricamente a 210 nm. Los resultados se expresaron como gramos de ácido ascórbico por kilogramo de fruto.

2.3.9. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

Cinco gramos de fruto congelado se procesaron en un Omnimixer con 16 ml de buffer (fosfato de sodio 100 mM; pH 7,8; NaCl 1 M; PMSF 1 mM; EDTA 0,1 mM; Triton X 100 0,1 % v/v; PVPP 10 g l⁻¹) y la suspensión obtenida se agitó por 1 h. El homogenato se centrifugó a 10.000 x g por 10 min y el sobrenadante se utilizó para ensayar la actividad enzimática. La mezcla de reacción se preparó del siguiente modo: fosfato de sodio 50 mM pH 7,8, metionina 13 mM, nitro blue tetrazolium (NBT) 75 µM, riboflavina 2 µM, EDTA 0,1 mM y 300 µl de extracto enzimático, en un volumen total de 3 ml. La mezcla se colocó 50 cm debajo de una fuente de luz de 4 tubos fluorescentes de 15 W a 20°C. La reacción se inició y detuvo encendiendo y apagando las luces respectivamente. Luego se midió la absorbancia a 560 nm. Mezclas de reacción no irradiadas no desarrollaron color y se utilizaron como controles. La mezclas de reacción sin extracto enzimático desarrollaron el máximo color. Se definió 1 unidad de actividad enzimática (UAE) como la cantidad de enzima necesaria para disminuir en un 10% la reacción del NBT. Los resultados se expresaron como UAE por gramo de fruto. Se prepararon dos extractos por tratamiento y tiempo de almacenamiento y las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.10. Actividad ascorbato peroxidasa (APX)

Aproximadamente 5 g de frutos se procesaron en un Omnimixer con 16 ml de buffer de extracción (fosfato de sodio 100 mM pH 7,0; Triton X 100 0,1% v/v; NaCl 1 M; PVPP 10 g l⁻¹). La suspensión obtenida se agitó por 1 h, se centrifugó a 10.000 x g por 10 min y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad APX. La actividad se ensayó en una mezcla de reacción conteniendo buffer fosfato 100 mM pH 7,0; ácido ascórbico 2 mM; H₂O₂ 4 mM y 500 µl de extracto enzimático en un volumen final de 3 ml. La disminución en la absorbancia se siguió a 290 nm y 30°C. Los resultados

se expresaron como el cambio en la densidad óptica (ΔDO) en una hora bajo las condiciones del ensayo, por gramo de fruto. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento y las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.4. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial. Los datos se analizaron por medio de ANOVA y las medias se compararon con un test de Fisher a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto directo de los tratamientos

3.1.1. Viabilidad de bacterias y hongos

Considerando que el tratamiento térmico de alta temperatura redujo significativamente la incidencia de enfermedades de postcosecha (Capítulo I) se realizaron recuentos a fin de determinar si los tratamientos controlaban de la incidencia de patógenos mediante un efecto directo sobre la viabilidad de bacterias y hongos.

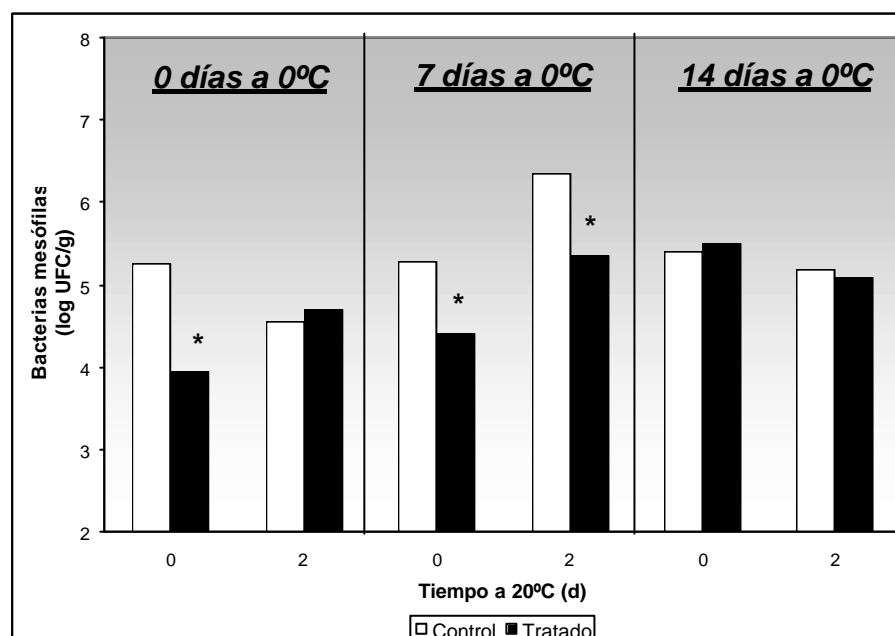


Figura III.5: Unidades formadoras de colonias de bacterias mesófilas por gramo (log UFC g⁻¹) en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

Inmediatamente luego del tratamiento el número de unidades formadoras de colonias de bacterias mesófilas por gramo de fruto (UFC g⁻¹) fue menor en el caso de los frutos tratados térmicamente que en los controles (Figura III.5) pero luego de 48 h a 20°C no se encontraron diferencias. Cuando los frutos se almacenaron a 0°C por 7 d se encontró nuevamente en los frutos tratados un menor número de unidades formadoras de colonias por gramo de fruto que en los controles. En este caso las diferencias se mantuvieron luego de 2 d a 20°C. Finalmente, cuando los frutos se almacenaron por 14 d no se observaron diferencias entre controles y tratados.

Los recuentos en el caso de hongos mostraron que el número de UFC g⁻¹ no fue afectado inmediatamente luego del tratamiento o luego de 2 d a 20°C (Figura III.6) indicando que el shock térmico no redujo directamente la viabilidad de los conidios presentes en las muestras.

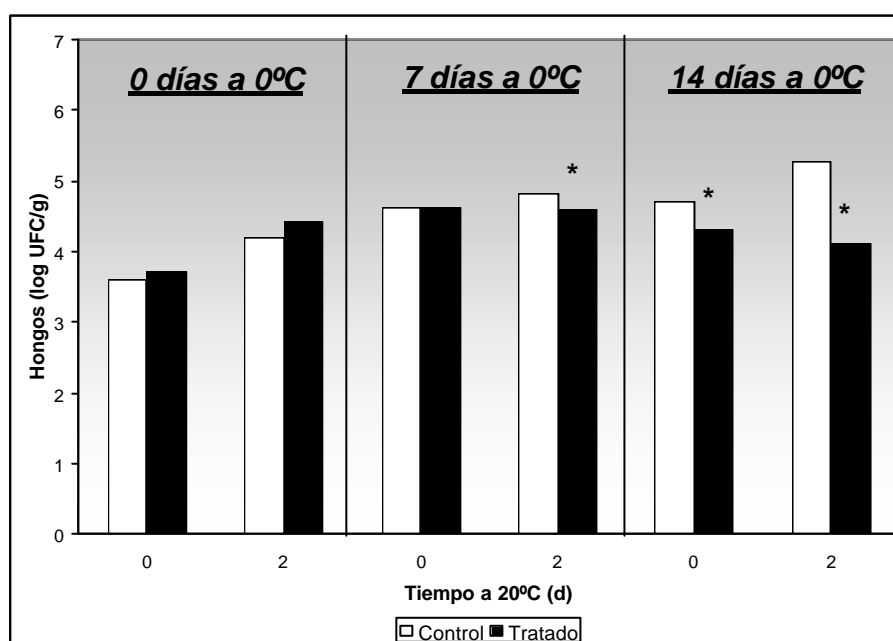


Figura III.6: Unidades formadoras de colonias de hongos por gramo (log UFC g⁻¹) en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

Después de 7 d de almacenamiento a 0°C, el número de UFC g⁻¹ se incrementó en forma similar tanto en los frutos controles como tratados. No obstante, luego de 2 d de almacenamiento a 20°C los frutos tratados mostraron un menor número de UFC g⁻¹ que los controles. Del mismo modo se encontró un menor número de UFC g⁻¹ en los frutos tratados luego de 14 d a 0°C y 2 d a 20°C. Por lo tanto, la reducción en el número de UFC g⁻¹ observada en el caso de los frutos tratados luego del almacenamiento a 0°C y posterior incubación a 20°C podría deberse a una respuesta fisiológica de los frutos. Lurie y col., (1997) describieron que los tratamientos térmicos de alta temperatura inducen la producción de enzimas asociadas a defensa en tomates. La presencia de sustancias antifúngicas incluyendo fitoalexinas y elicitores de la activación de mecanismos de defensa ha sido descrita en tejidos expuestos a diversas condiciones de estrés abiótico (Darvill y Albersheim, 1984).

3.1.2. Velocidad de germinación de conidios

Los ensayos de UFC g⁻¹ resultaron de utilidad para determinar que los tratamientos térmicos no provocaron una disminución directa en la viabilidad de las esporas fúngicas. No obstante, esto no elimina la posible existencia de un efecto directo de los tratamientos térmicos sobre los patógenos de postcosecha. El proceso de patogénesis involucra diversos aspectos dentro de los que podemos mencionar la germinación de esporas de hongos, y la penetración de las hifas a través de las barreras naturales de los frutos. La evaluación de la germinación de conidios a diferentes tiempos resultó de utilidad a fin de determinar si los tratamientos térmicos provocan retrasos en dicho proceso. Los resultados mostraron diferencias en las tasas de germinación de las dos especies ensayadas (Figuras III.7 y III.8). Las esporas de *Rhizopus stolonifer* iniciaron el proceso de germinación después de 5 h mientras que los conidios de *Botrytis* comenzaron a germinar luego de 2 h (datos no mostrados). Luego de 10 h el porcentaje de germinación de conidios de *Rhizopus* controles fue superior que el de los tratados térmicamente. Con respecto a *Botrytis cinerea*, los conidios tratados térmicamente mostraron también un retraso en la germinación luego de 5 h respecto a los controles (Figura III.8), aunque ambos grupos (control y tratado) lograron un 100% de germinación luego de 10 h.

Esto sugiere al igual que los estudios realizados con los recuentos de UFC g⁻¹ que los tratamientos térmicos no afectan la viabilidad de las esporas fúngicas. Sin embargo, se observa que existe un efecto directo del calor sobre los hongos ya que los tratamientos térmicos disminuyen la velocidad de germinación de las esporas de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, los dos principales patógenos de postcosecha de frutillas. Este retraso en el tiempo de germinación (tiempo necesario para desarrollar el tubo germinativo) podría resultar crítico para el desarrollo del proceso de infección en la superficie de los frutos.

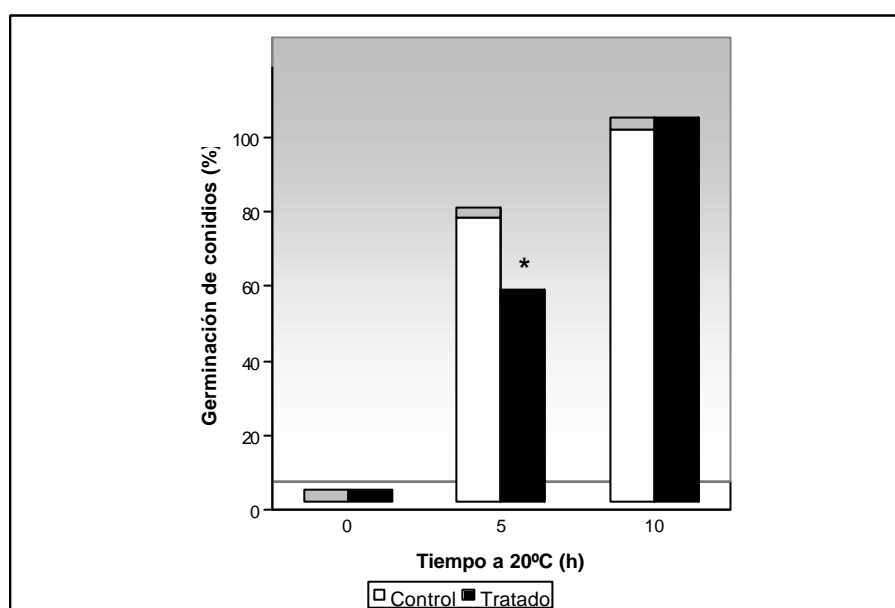


Figura III.8: Velocidad de germinación de conidios de *Botrytis cinerea* controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h). El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

3.2. Efecto de tratamientos térmicos sobre el metabolismo fenólico

3.2.1. Fenoles totales

En algunos frutos se ha descrito que la aplicación de TAT puede incrementar la síntesis de compuestos con capacidad antimicrobiana. El efecto inhibitorio de extractos de frutos tratados sobre el crecimiento de hongos apoya a esta hipótesis (Rodov y col., 1996). Los compuestos de naturaleza fenólica se encuentran dentro de los sugeridos como participes en la inhibición de patógenos. El contenido elevado de compuestos fenólicos en frutos verdes parecería ser uno de los aspectos

determinantes de la menor susceptibilidad de estos frutos al ataque de hongos. La síntesis de compuestos fenólicos se produce a partir de la enzima PAL la cual se cree que posee un rol regulatorio en dicho proceso (Shadle y col., 2003).

La realización de TAT incrementa la resistencia de frutos en algunos casos al inducir a la enzima PAL y con ello la biosíntesis de lignina y compuestos fenólicos (Ben-Yehoshua y col., 1987). No obstante, en el presente trabajo los tratamientos térmicos aplicados (45°C, 3h) no provocaron modificaciones en el contenido de fenoles totales ni en la zona interna ni en la zona externa de los frutos (Figura III.9), y sugieren que la síntesis de estos compuestos no sería una respuesta involucrada en la reducción de la incidencia de enfermedades. Estos resultados son coincidentes con los descritos por Loaiza-Velarde y col., (1997) quienes hallaron que la aplicación de TAT redujo la síntesis de fenoles.

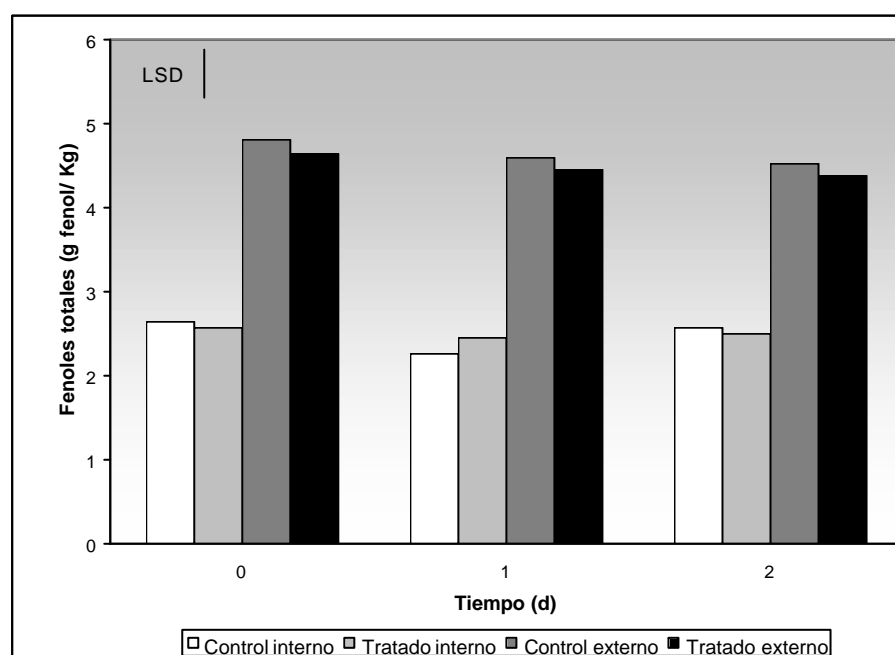


Figura III.9: Fenoles totales en las zona interna y externa de frutillas controles y tratadas térmicamente (45°C, 3 h). Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.2. Actividades enzimáticas

3.2.2.1. Actividad fenilalanina amonioliasa

Se ha descrito en otras hortalizas que la aplicación de TAT a 32°C puede incrementar la resistencia a patógenos a través de un incremento de la actividad PAL (Ismail y Brown, 1975; Ben-Yehoshua y col., 1987). No obstante en otros casos se ha observado que TAT más severos (40-60°C) inhiben la acción de esta enzima (Loaiza Velarde y col., 1997). Los resultados encontrados en este trabajo indican que los tratamientos térmicos aplicados provocan una marcada disminución en la actividad PAL y que este efecto se mantiene aún luego de 48 h a 20°C (Figura III.10). Esto podría explicar el retraso en el desarrollo de color encontrado como consecuencia de la aplicación de los TAT (Capítulo I). Por otra parte en forma conjunta con los resultados de fenoles totales estos resultados sugieren que en el sistema en estudio, el incremento de compuestos de naturaleza fenólica no sería una respuesta que participe en la defensa de los frutos contra el ataque de patógenos. No obstante mayores estudios resultan necesarios para determinar la independencia de los fenoles en las respuestas de defensa ya que podría existir un redireccionamiento hacia la síntesis de nuevos compuestos sin producirse modificaciones en los niveles totales.

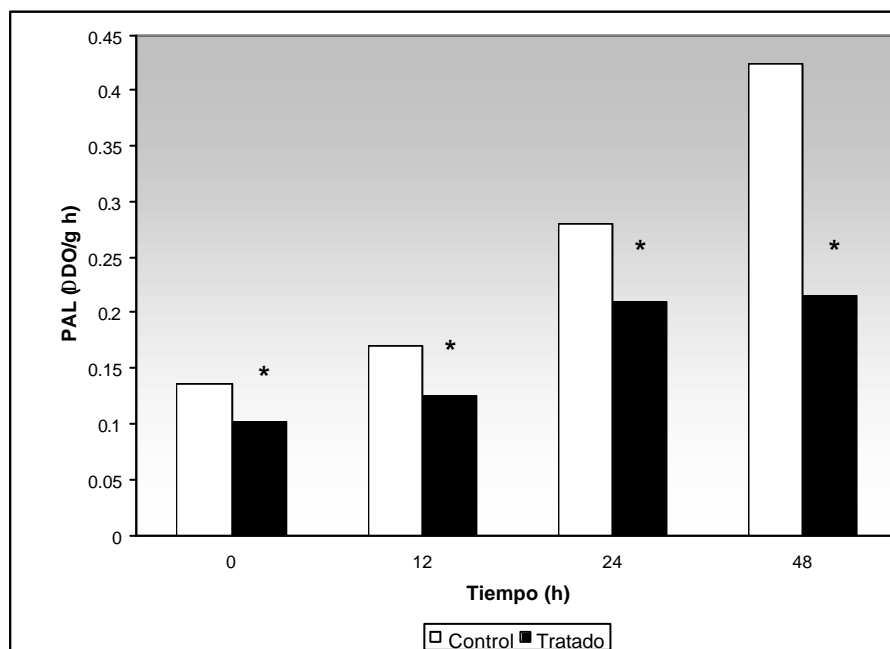


Figura III.10: Actividad PAL en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h). El asterisco (*) indica que el valor difiere estadísticamente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.2.2. Actividad pirogalol peroxidasa

Las peroxidasas (POD, EC: 1.11.1.7) se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, y diversas isoenzimas han sido asociadas como parte de los mecanismos defensivos contra patógenos. Las PODs se encuentran posiblemente involucradas en procesos fisiológicos como la lignificación (Lagrimini y col., 1987), suberización (Espelie y col., 1986), deposición de polifenoles (Lagrimini, 1991), entrecruzamiento de proteínas de pared celular (Bradley y col., 1992) y oxidación de compuestos fenólicos (Biles y Martin, 1993). Sin embargo, la participación de POD en la resistencia a enfermedades no es clara en todos los casos, y plantas de papa sobreexpresando POD no mostraron una mejor respuesta al ser desafiados contra *Fusarium sambucinum*, *Erwinia carotovora*, o *Phytophthora infestans* (Ray y col., 1998). Con respecto al efecto de los TAT sobre la actividad POD se han encontrado respuestas variables en función del sistema estudiado y de las condiciones de tratamiento utilizadas. Lurie y col. (1997), describieron que la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura en tomate induce una peroxidasa aniónica y sugirieron que esta podría involucrada en la resistencia de los frutos al ataque de *Botrytis cinerea*. Por el contrario, se han hallado en ciertas condiciones disminuciones en la actividad POD como consecuencia de TAT (Valderrama y col., 2001).

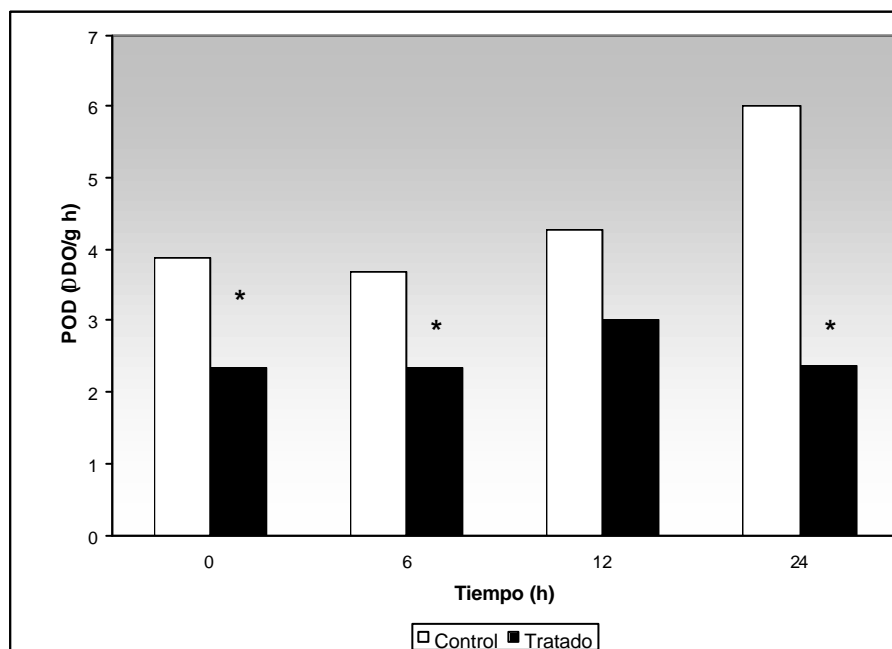


Figura III.11: Actividad POD en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h). El asterisco (*) indica que el valor difiere estadísticamente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

En el presente trabajo se encontró que la actividad peroxidasa fue reducida inmediatamente luego de los tratamientos térmicos (Figura III.11). Durante el período de recuperación a 20°C se observó que la actividad POD se mantuvo por debajo de la de los respectivos controles incluso luego de 24 h a 20°C, indicando que la activación de POD no sería una respuesta involucrada en la defensa de los frutos tratados térmicamente frente al ataque de patógenos.

3.2.2.3 Actividad polifenol oxidasa

Las polifenol oxidasas (PPOs) son enzimas ubicuas dentro de las Angiospermas y se considera que se encuentran involucradas en la respuesta contra patógenos (Avdiushko y col., 1993). En el caso de frutillas, los tratamientos térmicos aplicados incrementaron la actividad PPO (Figura III.12). La mayor actividad PPO en los frutos tratados se mantuvo aún luego de 1 d a 20°C. La PPO cataliza la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas y se considera que estos compuestos podrían participar en la defensa contra patógenos (Avdiushko y col., 1993). Frecuentemente se observan incrementos en la actividad PPO en plantas en las cercanías de las zonas de ataque de diversos patógenos (Avdiushko y col., 1993).

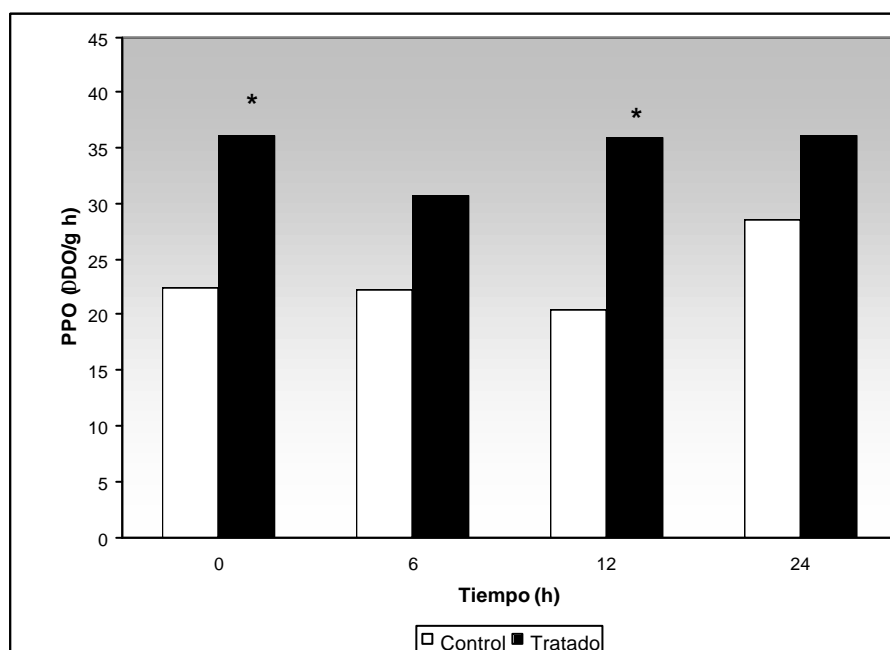


Figura III.12: Actividad PPO en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0.05

Plantas de tomate sobre expresando PPO muestran un elevado aumento en la resistencia a enfermedades (Li y Steffens, 2002). En comparación con los controles estas líneas transgénicas presentan una menor severidad en los síntomas de enfermedad, demostrando la importancia de esta enzima en la restricción del ataque microbiano (Li y Steffens, 2002). Si bien resultan necesarios mayores estudios a fin de determinar la existencia de un efecto causal entre la actividad PPO y el control de enfermedades por aplicación de TAT, los resultados hallados en el presente trabajo sugieren que el incremento en PPO como consecuencia de los TAT podría estar relacionado con la reducción hallada en el ataque de patógenos.

3.2.3. Contenido de ácido salicílico

Cuando los frutos se trataron térmicamente se observó un incremento en los niveles de AS (Figura III.13). Luego del tratamiento y cuando los frutos se transfirieron a 20°C la producción de AS disminuyó a niveles similares a los de los frutos controles. El ácido salicílico juega un rol fundamental en la señalización de las respuestas de defensa en plantas (Klessing y col., 2000).

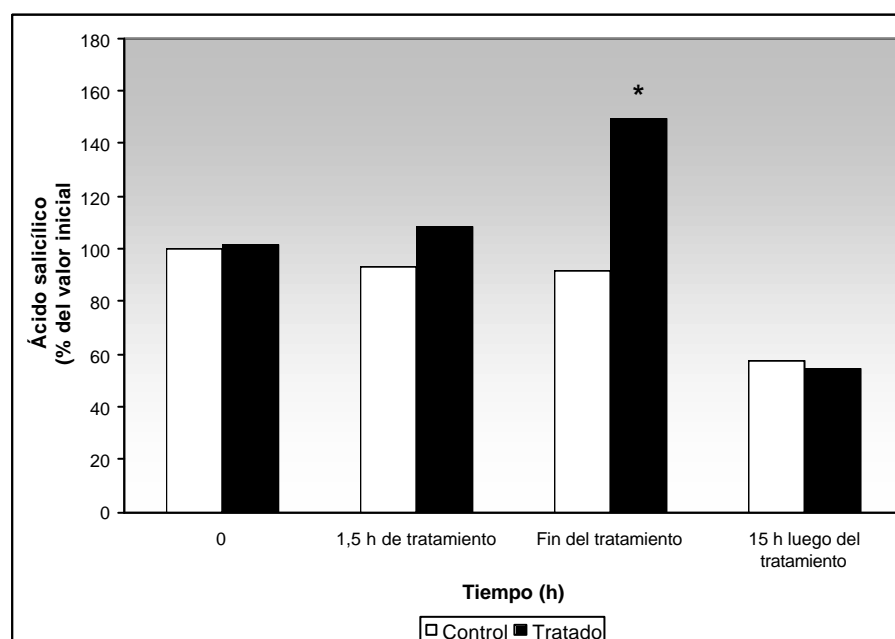


Figura III.13: Producción de ácido salicílico durante el tratamiento térmico (45°C, 3h) y luego de 15 de finalizado el mismo. El asterisco (*) indica que el valor difiere estadísticamente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0.05.

Además, se considera actualmente que el AS podría jugar un rol no sólo en la patogénesis sino también en el estrés por luz UV-C (Yalpani y col., 1994) por ozono (Sharma y col., 1996) y por altas temperaturas (Larkindale y Knight, 2001).

El hecho de que las proteínas asociadas a la patogénesis se produzcan en respuesta a diferentes tipos de estrés sugiere la existencia de puntos comunes en las vías de señalización de respuestas de las plantas (Yalpani y col., 1994; Sharma y col., 1996).

Ha sido descrito que aplicaciones exógenas de AS pueden inducir termotolerancia en plantas, indicando la participación de este compuesto en la señalización frente al estrés térmico (Dat y col., 1998). Resulta importante destacar que las principales respuestas no se observan durante el tratamiento térmico sino luego del período de recuperación (Larkindale y Knight, 2001). Con respecto a las respuestas relacionadas con el control de patógenos y la reducción del daño que podría mediar el AS, es bien conocida la inducción de proteínas PR involucradas en la defensa frente a patógenos. Por otra parte, el AS puede incrementar los niveles de PGIP, una proteína capaz de inhibir la acción de las poligalacturonasas de hongos, y con ello afectar el proceso de patogénesis (Machinandiarena y col., 2001). Por último, existen evidencias que apoyan la hipótesis de que el AS puede participar en la mediación de la protección o reparación contra el estrés oxidativo. Plantas de *Arabidopsis*, sobre-expresando un gen bacteriano de salicilato hidroxilasa (nahG) y en las cuales el AS es degradado inmediatamente luego de su formación, presentaron mayores niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y una menor supervivencia que las controles no transformadas (Borsani y col., 2001).

3.3. Efecto de tratamientos térmicos sobre el deterioro y aspectos vinculados al metabolismo oxidativo

3.3.1. Pérdida de electrolitos y pérdida de potasio

Inmediatamente luego del tratamiento no se observaron diferencias en la pérdida de potasio entre frutos controles y tratados térmicamente (Figura III.14). Cuando los frutos se almacenaron a 20°C por 1 ó 2 d los frutos controles presentaron una mayor pérdida de potasio que los tratados. Una tendencia similar se observó cuando los frutos almacenados a 0°C por 7 d se transfirieron a 20°C. Luego de 14 d a 0°C los frutos tratados también mostraron una menor pérdida de potasio pero cuando se incubaron a 20°C se observó un incremento tanto en los controles como en los tratados térmicamente, no encontrándose diferencias.

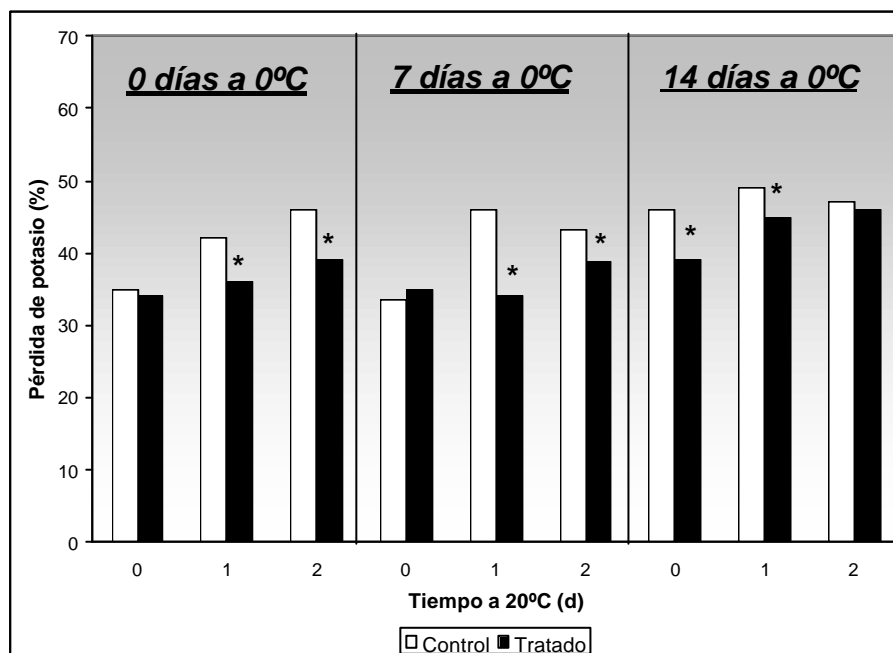


Figura III.14: Pérdida de potasio en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor difiere estadísticamente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

En el caso de la pérdida de electrolitos también se observó un aumento durante el almacenamiento a 20°C (Figura III.15). Inmediatamente después del tratamiento los niveles de pérdida de electrolitos fueron similares en frutos controles y tratados. Luego de 7 d a 0°C los frutos tratados mostraron una menor pérdida de electrolitos que los controles y la diferencia se mantuvo aún luego de 1 d a 20°C. Cuando los frutos se almacenaron por 14 d a 0°C y luego se incubaron a 20°C por 1 ó 2 d los frutos tratados presentaron un menor porcentaje de pérdida de electrolitos que los controles. Se ha demostrado que los tratamientos térmicos de alta temperatura provocan modificaciones en la composición de las membranas plasmáticas. Lurie y col. (1991) encontraron que los TAT incrementaron la estabilidad de membranas al modificar su composición lipídica. Los resultados hallados indican una menor disrupción de tejidos y daño de membranas en los frutos tratados térmicamente.

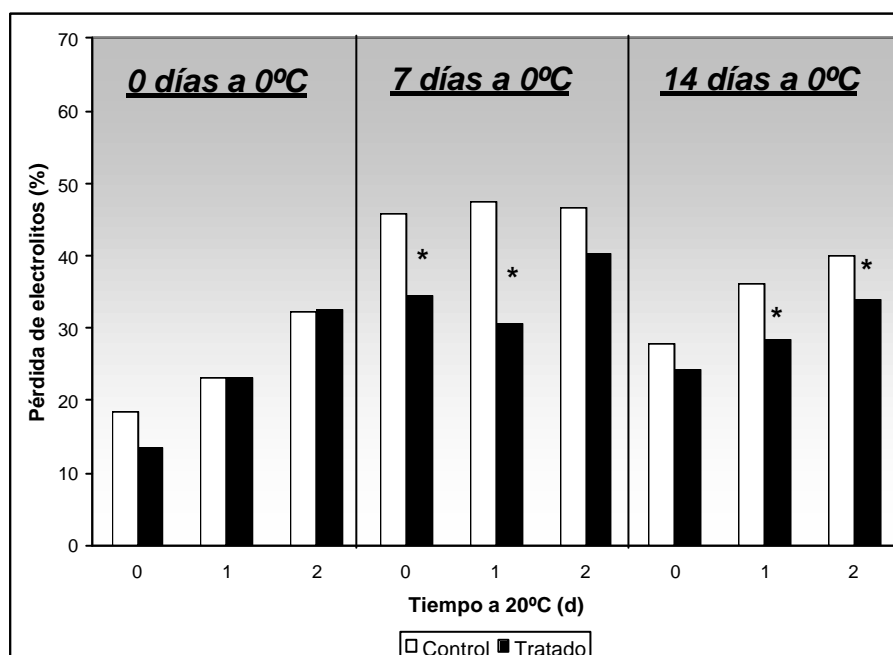


Figura III.15: Pérdida de electrolitos en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor difiere estadísticamente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

3.3.2. Actividad respiratoria

En ausencia de almacenamiento refrigerado la tasa respiratoria se incrementó en todos los tratamientos y no se detectaron diferencias entre controles y tratados (Figura III.16). Luego de 7 d a 0°C y 2 d a 20°C los frutos controles presentaron una mayor actividad respiratoria que los frutos tratados. Similares resultados se encontraron en los frutos almacenados por 14 d a 0°C y luego transferidos a 20°C. Es bien conocido que la actividad respiratoria se incrementa marcadamente en tejidos vegetales en respuesta al daño (Kahl, 1974). El incremento en la actividad respiratoria durante el almacenamiento puede ser una consecuencia del deterioro de los frutos, y la menor tasa respiratoria hallada en el caso de los frutos tratados térmicamente sugiere, en concordancia con los resultados de pérdida de electrolitos y potasio, una menor disrupción de tejidos en este grupo de frutos.

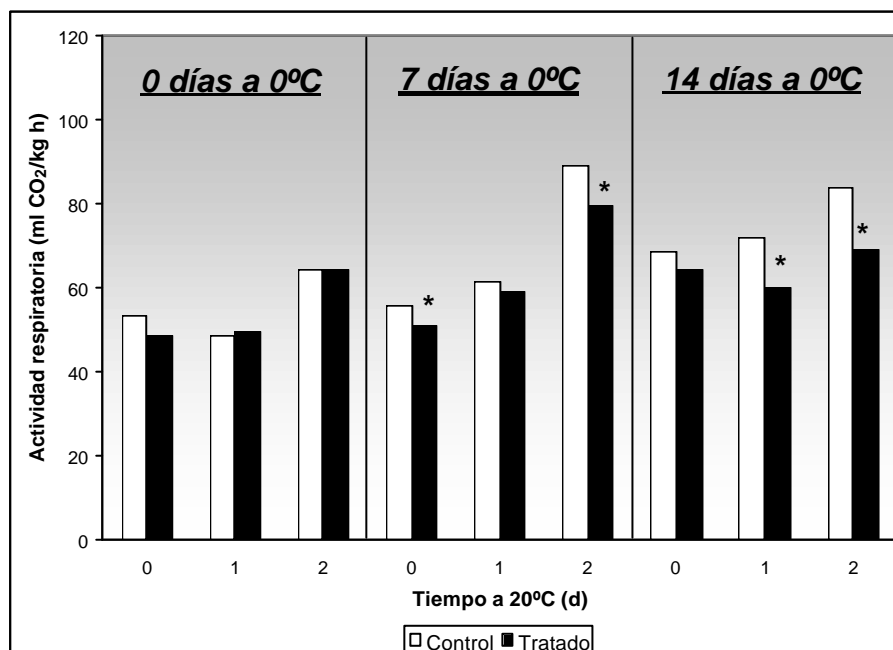


Figura III.16: Actividad respiratoria en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

3.3.3. Actividad pirogalol peroxidasa (POD)

Durante el almacenamiento a 20°C la actividad POD aumentó en frutos controles y tratados, pero luego de 1 d a 20°C los frutos controles presentaron mayor actividad POD que los tratados térmicamente (Figura III.17). Similares resultados se encontraron luego de 7 y 14 d a 0°C durante la incubación a 20°C. La reducción en la actividad POD por tratamientos térmicos ha sido descrita (Loaiza Velarde y col., 1997). Las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal y se ha demostrado su participación en numerosos procesos como la lignificación y cicatrización de heridas (Mäder y Fussi, 1982; Wakamatsu y Takahama, 1993). Biles y Martin (1993) sugirieron que POD participaría en la reparación de tejidos dañados realizando el entrecruzamiento de las paredes celulares en tejidos atacados por patógenos. Por lo tanto la alta actividad POD hallada en los frutos controles podría ser una respuesta al mayor daño en este grupo de frutos.

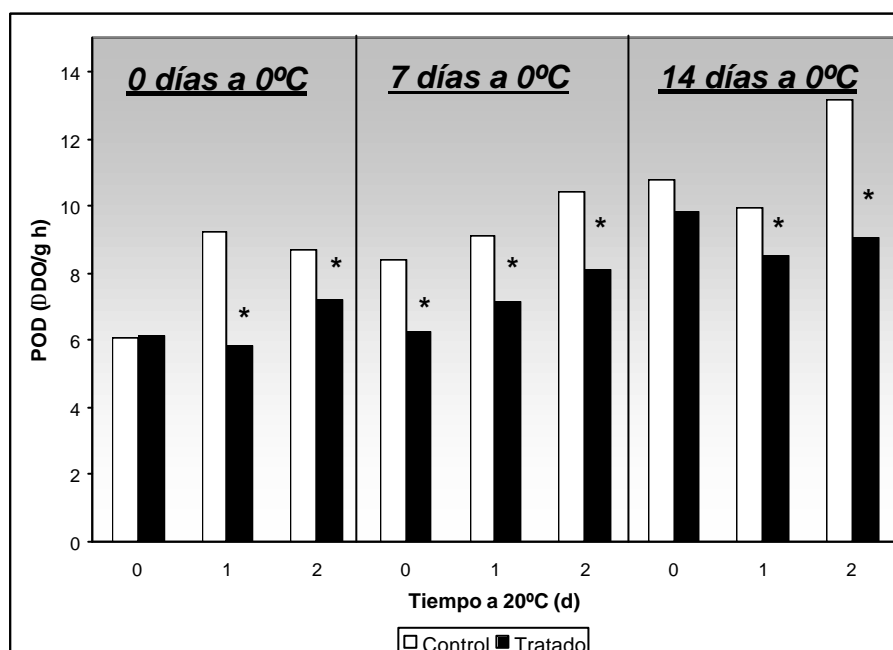


Figura III.17: Actividad POD en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. El asterisco (*) indica que el valor difiere estadísticamente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

3.3.4. Peróxido de hidrógeno

El contenido de peróxido de hidrógeno se incrementó durante el almacenamiento tanto en los frutos controles como tratados (Figura III.18). En ausencia de almacenamiento refrigerado, el contenido de H_2O_2 fue 30% superior en el caso de los frutos controles que en los tratados luego de 2 d a $20^\circ C$. Luego de 7 d a $0^\circ C$ no se encontraron diferencias entre frutos controles y tratados y los niveles fueron similares a los hallados en los frutos sin refrigeración. Cuando los frutos se transfirieron a $20^\circ C$ el contenido de H_2O_2 aumentó tanto en los frutos controles como tratados siendo el incremento mayor en el caso de los frutos controles. Luego de 14 d a $0^\circ C$, los frutos tratados presentaron menores niveles de H_2O_2 que los controles, pero luego de 2 d a $20^\circ C$ el contenido de H_2O_2 se incrementó marcadamente en todos los tratamientos y no se encontraron diferencias entre frutos controles y tratados. El incremento de especies reactivas del oxígeno ha sido frecuentemente observado durante procesos como la senescencia y ataque de patógenos (Mittler, 2002). Estos compuestos han sido implicados en el daño a nivel celular mediante la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas o la iniciación de la muerte celular programada. Desde este punto de vista, la reducción del contenido de H_2O_2 en los frutos tratados térmicamente indica un mejor estado de los mismos y correlaciona con el menor deterioro general observado.

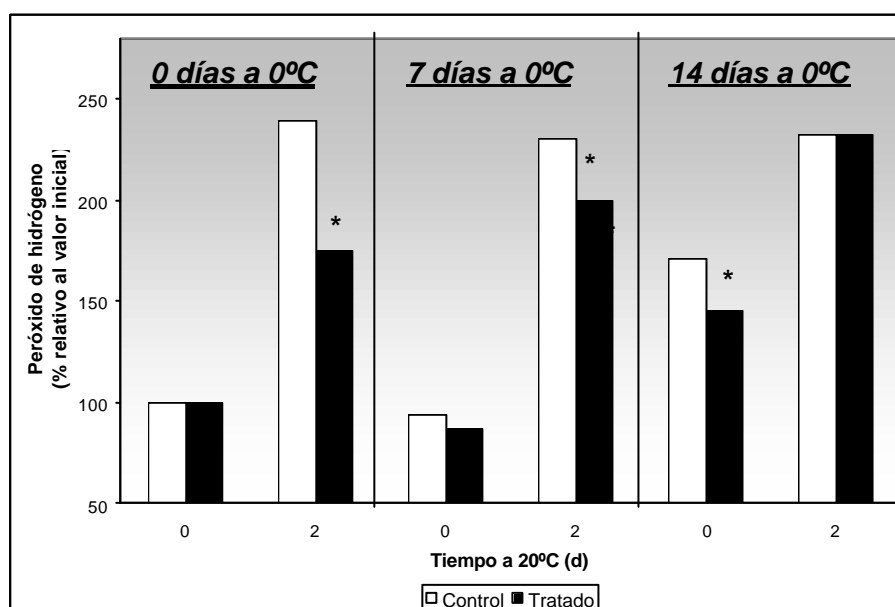


Figura III.18: Contenido de H_2O_2 en frutos controles y tratados térmicamente ($45^\circ C$, 3 h) durante el almacenamiento a $0^\circ C$ y posterior transferencia a $20^\circ C$. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

3.3.5. Poder antioxidante

No se observaron diferencias en el poder antioxidante entre frutos controles y tratados inmediatamente luego del tratamiento, pero luego de 1 d los frutos tratados presentaron mayor poder antioxidante que los controles (Tabla III.1). Cuando los frutos se almacenaron por 7 d a 0°C los tratados térmicamente mostraron un mayor poder antioxidante que los controles, diferencia que se observó después de 1 d a 20°C. Luego de 14 d no se detectaron diferencias significativas.

3.3.6. Ácido ascórbico

En general se observó una reducción en el nivel de ácido ascórbico tanto en los frutos controles como tratados durante el almacenamiento a 20°C, al igual que se ha descrito en otros frutos y vegetales (Lee y Kader, 2000). Finalizado el tratamiento los frutos tratados presentaron un mayor contenido de ácido ascórbico que los controles (Tabla III.1). Sin embargo, las diferencias desaparecieron después de la incubación a 20°C. Luego de 7 d a 0°C los frutos tratados aún presentaron mayor contenido de ácido ascórbico, y la diferencia también se observó luego de 1 d a 20°C. Después de 14 d a 0°C el contenido de ácido ascórbico fue similar en los frutos controles y tratados y sólo se hallaron pequeñas diferencias después de 1 d a 20°C.

Tabla III.1: Capacidad antioxidante y ácido ascórbico en frutos controles (C) y tratados térmicamente (T) durante el almacenamiento a 0°C y 20°C. El asterisco (*) indica que el valor difiere significativamente del correspondiente control a un nivel de significancia de 0,05.

		0 días a 0°C			7 días a 0°C			14 días a 0°C		
		0	1	2	0	1	2	0	1	2
Antioxid. (EC₅₀⁻¹)	C	0,117	0,105	0,122	0,104	0,100	0,122	0,109	0,112	0,136
	T	0,124	0,133*	0,129	0,132*	0,139*	0,123	0,127	0,125	0,144
Ác. Ascórbico (g kg⁻¹)	C	1,170	1,045	1,110	1,056	1,123	0,974	1,083	0,771	0,888
	T	1,425*	1,007	1,090	1,287*	1,211*	0,971	1,118	0,884*	0,936

3.3.7. Actividad superóxido dismutasa(SOD)

De acuerdo a Baker (1976), no se observan cambios importantes en la actividad SOD durante la maduración de diversos frutos. No obstante, en el caso de frutillas se encontró un incremento en la actividad SOD durante el período de almacenamiento a 20°C (Figura III.19). En ausencia de almacenamiento refrigerado los niveles de actividad SOD fueron similares en frutos controles y tratados. Luego de 7 d a 0°C los frutos tratados presentaron una mayor actividad SOD y estas diferencias también se observaron luego de 1 y 2 d a 20°C. Luego de 14 d a 0°C y 2 d a 20°C los frutos tratados también mostraron mayor actividad SOD que los controles. El posible rol de SOD en la protección del daño ocasionado por los radicales superóxido ha sido descrita (Van Breusegem y col., 1999; Halliwell y Gutteridge, 1993). La sobreexpresión de SOD ha provocado incrementos en la tolerancia al estrés (Van Camp y col., 1996, 1994). El rol de esta enzima sería no solo el control de las ERO sino también generar señales apropiadas como las formas reducidas y oxidadas del ascorbato y glutatión (Mittler, 2002). Resulta de interés resaltar que las diferencias en la actividad SOD entre frutos controles y tratados no se observó inmediatamente luego del tratamiento térmico sino durante el almacenamiento.

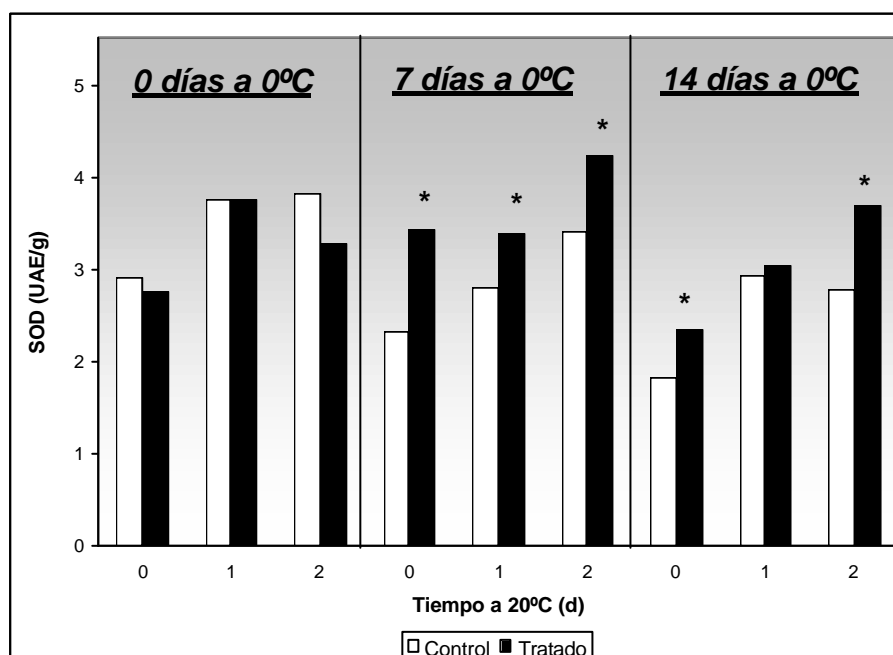


Figura III.19: Actividad SOD en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y 20°C. El asterisco (*) indica que el valor difiere estadísticamente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

Similares resultados fueron encontrados en bananas tratadas con ácido salicílico, ya que inmediatamente luego del tratamiento no se observaron importantes modificaciones en la actividad SOD, pero luego de un período de almacenamiento de 5 d el tratamiento provocó una activación de SOD (Kang y col., 2003).

Los mayores niveles de SOD presentes en los frutos sometidos al estrés térmico podrían contribuir a impedir o reducir la acumulación de radicales superóxido y por lo tanto a disminuir el daño.

3.3.8. Actividad ascorbato peroxidasa (APX)

Luego del tratamiento no se observaron diferencias en la actividad APX entre frutos controles y tratados (Figura III.20). No obstante, los frutos tratados presentaron mayor actividad APX luego de 1 ó 2 d a 20°C. Luego de 7 d a 0°C los frutos tratados presentaron menor actividad APX que los controles, pero esta tendencia se revirtió cuando los frutos se incubaron a 20°C por 1 d. Después de 14 d a 0°C los frutos tratados presentaron mayor actividad APX que los controles, y esta tendencia se mantuvo luego de 1 d a 20°C. Finalmente, cuando los frutos se almacenaron a 20°C por 2 d la actividad APX descendió tanto en los frutos controles como tratados.

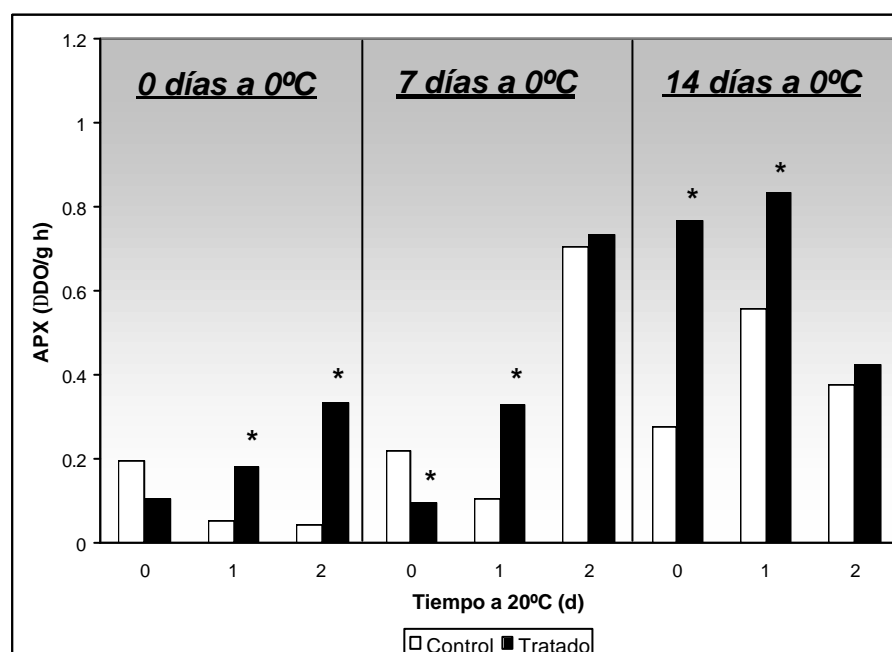


Figura III.20: Actividad APX en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) durante el almacenamiento a 0°C y 20°C. El asterisco (*) indica que el valor es estadísticamente diferente del control correspondiente a un nivel de significancia de 0,05.

La senescencia provoca modificaciones importantes en el metabolismo oxidativo que incluyen una elevada producción de O_2^- y H_2O_2 . La acumulación de especies reactivas del oxígeno es parcialmente controlada por el ciclo del ascorbato-glutatión, donde la actividad APX juega un rol importante (Asada, 1994). Considerando que los tratamientos térmicos condujeron a una mayor actividad APX, ésto podría tener influencia en la protección contra ERO. Trabajos previos han descrito la inducción de APX en respuesta a los tratamientos de alta temperatura. Sato y col., (2001) demostraron que la actividad APX se incrementa en plantas de arroz sometidas a condiciones de estrés por altas temperaturas, mientras que el gen *apx1* de *Arabidopsis* inducido por estrés térmico y estrés oxidativo posee elementos de respuesta a shock térmico en su promotor (Panchuk y col., 2002; Storozhenko y col., 1998). Finalmente, durante los últimos estadios del ataque de patógenos ha sido establecido que APX puede ser suprimida (Durner y Klessing, 1995) y esto podría explicar la disminución en APX hallada al final del período de almacenamiento.

4. CONCLUSIONES

El control de enfermedades de postcosecha producido por los tratamientos térmicos de alta temperatura estaría asociado con diferentes aspectos:

a. Efecto sobre la reducción del inóculo:

-Los tratamientos aplicados no afectan la viabilidad de los conidios fúngicos pero sí la de bacterias mesófilas.

b. Efecto sobre la reducción de la patogenicidad:

-Los tratamientos térmicos de alta temperatura seleccionados reducen la velocidad de germinación de *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea* lo que podría retrasar la iniciación del proceso de patogénesis.

c. Efecto sobre la reducción de la susceptibilidad del fruto:

-Con relación a los efectos indirectos que podrían reducir las infecciones fúngicas, el retraso en la degradación de las paredes celulares (Capítulo II) podría dificultar el proceso de penetración y colonización de los tejidos.

-El metabolismo oxidativo de los frutos es modificado por la aplicación de tratamientos térmicos. Los frutos tratados presentan un menor daño (menor pérdida de electrolitos y potasio, menor actividad respiratoria y menor incremento en la actividad POD) y mantienen menores niveles de peróxido de hidrógeno que los controles. Estos frutos mostraron un mayor nivel de activación de mecanismos de protección enzimáticos y no enzimáticos contra especies reactivas del oxígeno las cuales se incrementan durante la senescencia y el ataque de patógenos. Los principales efectos no se visualizan inmediatamente después del tratamiento sino durante el almacenamiento. El menor daño observado en el caso de los frutos tratados podría asociarse con una mayor protección contra radicales libres generados durante la senescencia o ataque de patógenos.

d. Efecto sobre el incremento de la resistencia del fruto:

-Con respecto a la síntesis de compuestos con propiedades antimicrobianas, los tratamientos no incrementan el contenido de compuestos de naturaleza fenólica, probablemente debido a que una enzima reguladora del metabolismo fenil propanoide como PAL se encuentra altamente inhibida por los mismos.

-La actividad de enzimas vinculadas a procesos de defensa como POD también es reducida por los tratamientos. En el caso de PPO, el incremento provocado por los TAT podría estar relacionado con la reducción hallada en el ataque de patógenos en frutillas. No obstante, resulta necesario realizar más estudios para poder establecer si existe una relación causal entre incremento de PPO e incidencia de patógenos.

-Resulta importante mencionar además que durante el tratamiento térmico se produce un marcado incremento de los niveles de ácido salicílico, cuya participación en la señalización de respuestas de defensa es aceptada.

Los resultados hallados sugieren que el efecto de los tratamientos térmicos sobre la incidencia de enfermedades de postcosecha resultaría de la coexistencia de diferentes mecanismos directos e indirectos conducentes a la reducción del ataque de patógenos.

Capítulo IV

***“Utilización de tratamientos
térmicos de alta temperatura en
combinación con películas de
permeabilidad selectiva a los
gases”***

1. INTRODUCCIÓN

La utilización de atmósferas modificadas y controladas consiste en alterar y mantener una composición atmosférica diferente a la del aire durante el almacenamiento de los productos (Kader, 1992). Las condiciones utilizadas varían notablemente pero usualmente los cambios se realizan a nivel del CO_2 y O_2 , manteniéndose concentraciones menores al 8% O_2 y superiores al 1% de CO_2 . No obstante, existe una infinidad de condiciones que han sido exploradas como la utilización de elevados niveles de oxígeno (>21%) (Kader y Ben Yehoshua, 2000), utilización de CO (Wolfe, 1980) y óxido nitroso (Gouble y col., 1995). La diferencia entre atmósferas controladas (AC) y modificadas (AM) subyace en que en las primeras los frutos se almacenan en ambientes donde se regula exactamente la concentración de los gases, mientras que en el caso de las atmósferas modificadas la utilización de recubrimientos plásticos limita la libre difusión de los gases, produciéndose un enriquecimiento en los niveles de CO_2 y una disminución en el contenido de O_2 . Esta condición se puede alcanzar mediante la inyección exógena de gases (atmósfera modificada activa) o como consecuencia de la actividad respiratoria de los productos (atmósfera modificada pasiva). Cuando una cierta masa de producto se coloca en el interior de una bolsa plástica, éste continúa consumiendo el oxígeno y produciendo CO_2 . A medida que el oxígeno disminuye y el contenido de CO_2 se incrementa, la tasa respiratoria comienza a disminuir. Debido a que la concentración de gases en el interior de la bolsa difiere de la presente en el exterior de la misma, comienza también a producirse un intercambio gaseoso que depende de la diferencia de concentración de gases en el interior y en el exterior, de la superficie expuesta y de la permeabilidad de la película. Luego de un período variable se llega a un estado de equilibrio dinámico en el cual se logran atmósferas enriquecidas en CO_2 y reducidas en O_2 , capaces de modificar profundamente la fisiología de los productos (Kader, 1992). La composición de la atmósfera depende de una serie de factores, que incluye el peso del producto envasado, la temperatura, la tasa respiratoria del producto, cultivar y estadio de madurez, y todos aquellos aspectos que puedan afectar el flujo de gases a través de las bolsas como la permeabilidad de la película seleccionada, la superficie y el espesor de la película (CSIRO, 2000). Resulta importante destacar que la utilización de atmósferas modificadas y controladas debe considerarse como un complemento al manejo correcto de temperatura y humedad relativa para mantener la calidad de los productos frutihortícolas durante la postcosecha (Ke y Saltveit, 1990).

En ciertos casos como manzanas, peras, brócoli y frutillas la extensión de la vida postcosecha mediante el empleo de atmósferas modificadas y controladas suele ser importante, mientras que en otros productos como pimiento y lechuga los beneficios suelen ser menos acusados (Tabla IV.1).

Tabla IV.1: Efecto de la utilización de atmósferas modificadas y controladas sobre la vida postcosecha de productos frutihortícolas. Fuente: CSIRO 2000.

Producto	Temperatura	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	Vida en aire (d)	Vida en AC /AM (d)
Manzana	0-2	2-3	1-5	120	180
Palta	5-13	2-5	3-10	42	84
Banana	13-16	2-5	2-5	28	49
Brócoli	0-1	1-3	5-15	28	56
Lechuga	0-1	2-5	< 1	21	25
Pera	- 1	2-3	0-1	90	180
Pimiento	7-12	2-5	2-5	21	25
Frutilla	-0,5-0	5-10	15-20	10	15

1.1. Base biológica del efecto de las atmósferas modificadas y controladas

La aplicación de atmósferas modificadas y controladas produce una serie de efectos que pueden ser beneficiosos desde el punto de vista del manejo postcosecha ya que, en general, se observa reducción en la velocidad de maduración, disminución en el ataque de patógenos y menor incidencia de alteraciones fisiológicas como el pardeamiento e incidencia de daño por frío (Kader, 1992). Muchos de los cambios en la velocidad de maduración ocasionados por la aplicación de estas tecnologías pueden comprenderse analizando los efectos de las atmósferas ricas en CO₂ y pobres en O₂ sobre el metabolismo respiratorio y la síntesis y acción del etileno.

1.1.1. Metabolismo respiratorio

La respiración es un buen indicador de la tasa metabólica de frutas y hortalizas cosechadas. Por lo tanto, su control puede ser de gran importancia para extender la vida postcosecha de los productos. Esto ocurre en el caso de las atmósferas controladas y modificadas, ya que el enriquecimiento en CO₂ o la reducción en los niveles de oxígeno provoca en general una disminución en la tasa respiratoria (Smock, 1979). Estos cambios en la tasa respiratoria son reversibles y, luego de la remoción del CO₂ y el incremento de O₂ en la atmósfera de almacenamiento, los productos recuperan su tasa respiratoria normal (Mencarelli, 1987).

Considerando que el CO_2 es un producto de la respiración, no resulta extraño que la misma sea disminuida en la medida que se incrementa su concentración en la atmósfera de almacenamiento (Kader, 1986). Esto ha sido demostrado en diversos productos (Kader, 1986; Li y Kader, 1989). La respuesta de las frutas y hortalizas a altas concentraciones de CO_2 incluyen la inducción de la glicólisis y de vías fermentativas, la acumulación de succinato y/o alanina y disminuciones en el pH y en los niveles de ATP (Ke y col., 1995). La acción primaria parecería ubicarse en la reacción reversible catalizada por la succinato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs (SDH, EC 1.3.99.1) (Mathooko, 1996). No obstante, la respuesta de los frutos y vegetales al CO_2 depende de la sensibilidad del producto, de la concentración de gases en la atmósfera, del estado fisiológico del producto, de la temperatura y de la duración del período de exposición (Kader, 1986). Las diferencias en la sensibilidad de los diferentes productos puede asociarse con diferencias en los niveles de CO_2 en el interior de los frutos provocadas por distintas tasas respiratorias, volúmenes gaseosos y anatomía, que determina diferente capacidad de difusión del gas así como distinta sensibilidad de enzimas específicas (Mathooko, 1996). Por otra parte, bajos niveles de oxígeno también pueden reducir la tasa respiratoria de los productos. Este proceso se observa por lo general cuando la concentración de dicho gas es menor al 25% dependiendo del producto analizado. La modificación de los niveles de CO_2 y O_2 resulta una estrategia de interés para el control de la actividad respiratoria y con ello para extender la vida postcosecha. Sin embargo, si las concentraciones de CO_2 se elevan demasiado o la de O_2 es extremadamente baja puede favorecerse el desarrollo de procesos fermentativos en los frutos afectando notablemente su calidad. La activación del metabolismo fermentativo puede dar lugar a la acumulación de acetaldehído y etanol catalizadas por la acción de la piruvato decarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) (Ke y col., 1994). Esto puede ocurrir cuando se utilizan atmósferas de almacenamiento inadecuadas (Kader, 1992). Ke y col. (1993) sugirieron que la acumulación de acetaldehído y etanol puede producirse no sólo por la activación de ADH y PDC sino también por una disminución del pH y un incremento en la concentración de sustratos como piruvato, acetaldehído y NADH. Resulta de interés destacar que la tolerancia a diferentes niveles de O_2 y CO_2 es muy dependiente del tipo de producto que se considere. Mientras que peras y manzanas raramente toleran concentraciones de O_2 menores al 3% y de CO_2 superiores al 3%, las frutillas pueden almacenarse con niveles de 15% CO_2 y 10% O_2 sin problemas.

1.1.2. Síntesis y acción del etileno

Muchos de los efectos de las AM y AC sobre los frutos se encuentran vinculados con modificaciones en la síntesis y acción del etileno. La capacidad de este compuesto para inducir la maduración y senescencia de frutas y hortalizas es conocida (Kader, 1992). Por lo tanto, aquellos tratamientos o tecnologías que afecten tanto la síntesis como su acción afectan al proceso de maduración. Si bien esto es mucho más marcado en el caso de los frutos climatéricos, la remoción del etileno de la atmósfera de almacenamiento en frutos no climatéricos también tiene ciertos efectos favorables, como retrasos moderados en la evolución del color y ablandamiento y una menor susceptibilidad a la incidencia de enfermedades de postcosecha. Atmósferas con concentraciones elevadas de CO₂ reducen la actividad de la enzima ACC sintasa. El oxígeno también juega un rol importante en la biosíntesis de etileno ya que es un co-substrato de ACC oxidasa (Mathooko, 1996) por lo que la actividad de esta enzima es reducida en condiciones de baja concentración de O₂. Por último, no sólo la síntesis sino también la acción del etileno es inhibida en condiciones de elevadas concentraciones de CO₂.

1.2. Efectos beneficiosos de las atmósferas modificadas y controladas

- a. Retardo en la degradación de clorofilas y senescencia.
- b. Reducción en el desarrollo de color al afectar la síntesis de carotenoides y antocianinas.
- c. Retraso en el ablandamiento al afectar la actividad de enzimas asociadas a la degradación de pared celular.
- d. Reducción de la síntesis y acción del etileno en niveles de O₂ menores al 8% y/o superiores al 1% de CO₂.
- e. Reducción de la incidencia de alteraciones fisiológicas como daño por frío y escaldadura superficial en manzana.
- f. Disminución de reacciones de pardeamiento enzimático.

- g. Control de la deshidratación de los productos.
- h. Menor incidencia y severidad de enfermedades de postcosecha. Niveles cercanos al 10% de CO₂ resultan necesarios para observar este tipo de efectos.
- i. Bajas concentraciones de O₂ (< 1%) y/o elevadas de CO₂ (40-60%) pueden ser de utilidad para el control de insectos.
- j. Bajas concentraciones de O₂ o altas de CO₂ influyen las características organolépticas al reducir la pérdida de acidez y azúcares, y retrasar la transformación de almidón a azúcares simples en algunos productos.
- k. Mayor retención de ácido ascórbico y otras vitaminas, resultando en productos con mejores características desde el punto de vista nutricional.

1.3. Efectos negativos de la utilización de atmósferas modificadas y controladas

- a. La exposición de los productos a concentraciones de CO₂, O₂ y etileno inadecuadas o a niveles de humedad relativa (HR) fuera del rango óptimo, puede dar lugar al deterioro de los mismos ya sea por favorecerse la maduración, la incidencia de enfermedades, la producción de metabolitos de origen fermentativo o la aparición de desórdenes fisiológicos como pardeamiento interno.
- b. Se puede observar una maduración irregular en frutos como banana, mango, pera y tomate si se expone los frutos a niveles menores de 2% de O₂ y/o superiores al 5% de CO₂ por períodos prolongados.
- c. Desarrollo de sabor y olor desagradable como consecuencia de la producción excesiva de acetaldehído y etanol.

1.4. Aplicación comercial de atmósferas modificadas y controladas

Se han realizado diversas mejoras en los últimos años en el almacenamiento en AC a fin de mejorar la calidad de frutas y hortalizas y extender su vida postcosecha (Kader, 2000). Algunos puntos importantes son la mejora y simplificación de las instalaciones y equipos necesarios y el desarrollo de métodos rápidos y sensibles para

la medición de gases en forma continua. A pesar de ésto, y de que los beneficios de la utilización de atmósferas controladas suelen ser importantes en muchos productos, su uso no se encuentra ampliamente difundido por diversas razones. En muchos casos, las atmósferas necesarias para lograr un efecto favorable pueden dañar al producto por lo que debe descartarse su uso. Por ejemplo, en el caso de flores el control del ataque de *Botrytis cinerea* (generalmente un factor limitante en la vida postcosecha) no puede realizarse mediante AC ya que los niveles necesarios dañarían a los pétalos, tallos y hojas. En otras situaciones existen alternativas más económicas. Por ejemplo, si bien es conocido que el CO₂ puede inhibir la síntesis y acción del etileno y por lo tanto la utilización de AC podría resultar de utilidad en estos productos, otras alternativas como la utilización de tiosulfato de plata o 1-MCP resultan más económicas y sencillas de utilizar a fin de minimizar los efectos negativos de esta hormona sobre la senescencia (Reid y col., 2001). Acaso la mayor dificultad en la amplia difusión de las AC es que resulta necesario realizar una inversión elevada en instalaciones y equipamiento y contar con personal técnico capacitado en el uso de estas tecnologías a nivel comercial. El uso de las AC es común en el caso de manzanas y peras, y en mucho menor grado en cebolla, kiwi, palta, caqui y nueces. Los desarrollos tecnológicos en el futuro probablemente permitan su aplicación durante el transporte y almacenamiento a un costo razonable con relación a los beneficios a obtener (Kader, 2000).

Las atmósferas modificadas resultan mucho menos costosas y su utilización es común en productos mínimamente procesados, brócoli, banana, frutilla, cereza, mango, melón, espárrago, nectarinas, duraznos peras y ciruelas (Beaudry, 1999). La dificultad con el uso de las AM radica en el establecimiento de una atmósfera adecuada en el interior de las bolsas, ya que se trata de un sistema dinámico no controlado (Kader, 2000). En el caso de las atmósferas modificadas activas, la inyección de mezclas gaseosas permite obtener la atmósfera deseada en un corto período, pero esto requiere de equipos especiales para cumplir con este fin, dificultando el proceso. En el caso de las atmósferas modificadas pasivas una de las mayores desventajas estriba en su aplicación en productos con baja tasa respiratoria, debido a que el tiempo necesario para lograr la atmósfera deseada es demasiado prolongado.

1.5. Utilización de métodos físicos combinados

En los últimos años ha comenzado a evaluarse con mayor frecuencia la utilización de métodos combinados a fin de obtener efectos aditivos de las diferentes tecnologías y poder así extender la vida de los productos. Así existen numerosos trabajos que muestran las ventajas de la combinación de atmósferas modificadas y controladas con refrigeración. En el caso particular de frutillas, se han informado efectos beneficiosos de la utilización del CO₂ y refrigeración sobre la vida postcosecha (Gil y col., 1997; Holcroft y Kader, 1999; El-Kazzaz y col., 1983). Así, el almacenamiento refrigerado de frutillas en combinación con atmósferas con 15% CO₂ permite reducir la incidencia de *Botrytis cinerea* y retrasar la maduración de los frutos (Agar y col., 1990). Con respecto a la combinación de TAT con otros métodos, existen trabajos que indican que su utilización en forma conjunta con la refrigeración permite reducir el deterioro, la incidencia de alteraciones fisiológicas y mantener la calidad (ver. Capítulo I). La combinación de tratamientos térmicos con atmósferas controladas ha sido explorada principalmente con el objeto de controlar plagas cuarentenarias. No obstante, algunos trabajos muestran que la vida postcosecha de ciertos frutos como el caqui puede extenderse mediante la combinación de tratamientos térmicos y atmósferas controladas (Burmeister y col., 1997). En estos casos, la modificación de la atmósfera se realizó mediante el uso de cámaras capaces de permitir la inyección de gases para lograr la concentración adecuada, con la consecuente complicación desde el punto de vista práctico.

Considerando que los tratamientos térmicos provocan un incremento muy marcado en la actividad respiratoria de los frutos y que ésto genera una elevada cantidad de CO₂, el objetivo del presente capítulo fue analizar el efecto de la combinación de tratamientos térmicos de alta temperatura en presencia de películas plásticas (a fin de generar una atmósfera modificada en un breve lapso) y refrigeración sobre la calidad y vida postcosecha de frutillas. Dado que la respuesta de los frutos al CO₂ y tratamiento térmico podría ser influenciada por el estadio de madurez, se analizaron frutos en dos estadios diferentes (75 y 100% rojo).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ensayo con fruta 75% roja

Frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch., cv. Selva) producidas en invernadero se cosecharon con 75% de color superficial rojo. Durante la producción se utilizaron fungicidas sólo en los casos estrictamente necesarios y las aplicaciones se realizaron respetando los tiempos de carencia de los productos. Diez frutos, aproximadamente 100 g, se colocaron en bandejas plásticas y se sellaron con PVC (permeabilidad al O₂ 11.232 cm³ m⁻² 24 h⁻¹, permeabilidad al CO₂ 48.552 cm³ m⁻² 24 h⁻¹ y permeabilidad al vapor de H₂O 40 cm³ m⁻² 24 h⁻¹) o PD-961EZ (Cryovac®, W. R. Grace & Co. Conn, USA; permeabilidad al O₂ 7.000 cm³ m⁻² 24 h⁻¹, permeabilidad al CO₂ 21.000 cm³ m⁻² 24 h⁻¹ permeabilidad al vapor de H₂O 13,35-17,05 cm³ m⁻² 24 h⁻¹) y se mantuvieron por 3 h en una estufa a 45°C. Luego del tratamiento las bandejas se colocaron a 0°C por 0, 7 y 14 d y posteriormente se transfirieron a 20°C por 5 d. Los controles correspondientes sin tratamiento térmico se colocaron en bandejas plásticas y se sellaron con PVC o PD-961EZ, se almacenaron a 0°C y luego se transfirieron a 20°C. Se tomaron tres muestras a diferentes tiempos de almacenamiento y luego se utilizaron inmediatamente o se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta la determinación de antocianinas, azúcares, fenoles, pH y acidez titulable.

2.2. Ensayo con fruta 100% roja

Se cosecharon frutos con 100% de color superficial rojo, se colocaron en bandejas plásticas y se cubrieron con película PY8 (1544 perforaciones de 1,7 mm de diámetro por m⁻², Cryovac®) o PD-961EZ y se trataron por 3 h a 45°C en una estufa. Luego del tratamiento, las bandejas se colocaron a 0°C por 0, 7 o 14 d y se transfirieron a 20°C por 4 d. Los controles se cubrieron con película PY8 (1544 perforaciones de 1,7 mm de diámetro m⁻², Cryovac®) o PD-961EZ y se almacenaron directamente a 0 y 20°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de almacenamiento y se analizaron inmediatamente o se congelaron en nitrógeno líquido y mantuvieron a -80°C hasta su uso.

2.3. Determinaciones analíticas

2.3.1. Mediciones de CO₂ y O₂

Muestras de la composición gaseosa en el interior de las bandejas se extrajeron con una jeringa de 1 ml y se midió el contenido de CO₂ y O₂. El análisis se realizó utilizando un cromatógrafo gaseoso (Varian, CX 3400, CA, USA) equipado con una columna Alltech CTR I y un detector de conductividad térmica. Las temperaturas en el inyector, columna y detector fueron de 120, 30 y 120°C respectivamente. Se utilizó helio como gas portador y el flujo de la fase móvil fue de 20 ml min⁻¹. Una solución conteniendo 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ se utilizó como estándar y diferentes cantidades de esta solución se inyectaron para realizar la calibración. Las mediciones se realizaron por triplicado y se calculó el porcentaje de CO₂ y O₂ en el interior de las bandejas.

2.3.2. Ataque de patógenos

La presencia de crecimiento fúngico se evaluó diariamente por 5 (75% R) ó 4 (100% R) d a 20°C luego de 0, 7 ó 14 d de almacenamiento a 0°C. Se utilizaron treinta frutos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento considerado.

2.3.3. Pérdida de peso

La fruta se pesó al comienzo del experimento, luego del tratamiento térmico y durante el almacenamiento. Se utilizaron treinta frutos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento considerado. Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso relativa al valor inicial.

2.3.4. Color superficial

El color superficial se evaluó con un colorímetro (Minolta, Modelo CR-300, Tokio, Japón) midiendo el parámetro L* y el ángulo hue en 6 zonas de cada fruto. Se analizaron treinta frutos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento considerado.

2.3.5. Antocianinas

Frutos congelados se trituraron en un molinillo refrigerado (Tekmar, modelo A-10, Alemania) y 0,25 g del polvo resultante se adicionaron a 10 ml de metanol conteniendo 1% v/v HCl y se mantuvieron a 0°C por 10 min. Luego se centrifugó a

9.000 x g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se utilizó para medir la absorbancia a 515 nm. El contenido de antocianinas se calculó utilizando el coeficiente de absorptividad molar (ϵ) $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ m}^{-1}$ (Woodward, 1972). El contenido de antocianinas se expresó como micromoles de pelargonidín-3-glucósido por kg de fruto fresco. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.6. Firmeza

La firmeza se midió utilizando un analizador de textura (TA.XT2, Stable Micro Systems Texture Technologies, Scarsdale, NY) equipado con una sonda plana. Los frutos se comprimieron 2 mm a una velocidad de $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ y se registró la fuerza máxima desarrollada durante el ensayo. Cada fruto se comprimió dos veces en lados opuestos de la zona ecuatorial y se utilizaron 30 frutos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento considerado.

2.3.7. pH y acidez titulable

Frutos congelados se procesaron en un molinillo refrigerado y 10 g del polvo resultante se suspendieron en 100 ml de agua. Se midió el pH del homogenato y la acidez se determinó titulando con NaOH 0,1 M hasta pH 8,1 (AOAC, 1980). La acidez se expresó como miliequivalentes de ácido por kg de fruto fresco. Dos muestras independientes se analizaron por cada condición analizada y cada una se tituló por duplicado.

2.3.8. Azúcares

Aproximadamente 10 g de fruto congelado se procesaron en un molinillo refrigerado y 1 g del polvo resultante se extrajo por 30 min con 10 ml de etanol a 25°C. La mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 10 min y 3 ml del sobrenadante se llevaron a 100 ml con agua. Los azúcares totales se determinaron según Southgate, (1976). Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como gramos de glucosa por kg de fruto fresco.

2.3.9. Fenoles totales

Aproximadamente 1 g de fruto se procesó en 6 ml de etanol. La mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4°C. Tres mililitros del sobrenadante resultante se llevaron a 100 ml con agua y estos extractos se utilizaron para la determinación de fenoles totales. Doscientos microlitros de extracto se adicionaron a 1,1 ml y 200 μl de

reactivo Folin-Ciocalteu 1 N. Luego de 3 min a 25°C, se agregaron 1,5 ml de solución saturada de Na₂CO₃ y la mezcla de reacción se incubó por 1 h a la misma temperatura. Se midió la absorbancia a 760 nm y se calculó el contenido de fenoles totales utilizando fenol como estándar. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg de fenol por kg de fruto.

2.4. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial. Los datos se analizaron por medio de un análisis ANOVA siendo los factores el tiempo a 0°C, tiempo a 20°C, la película utilizada y el tratamiento. Los efectos principales y las interacciones fueron analizadas y las medias fueron comparadas por un test LSD a un nivel de significancia de 0,05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Ensayo con fruta 75% roja

3.1.1. Composición de la atmósfera de almacenaje

Luego del tratamiento térmico, la concentración de CO₂ en el interior de las bandejas cubiertas con PVC o PD-961 se encontró cerca del 5%, mientras que en las bandejas controles el contenido de CO₂ fue de 0,03% (Figura IV.1). La acumulación de CO₂ en las bandejas tratadas fue consecuencia del incremento en la actividad respiratoria de los frutos durante el tratamiento térmico, que cambió de niveles iniciales de 45 ml kg⁻¹ h⁻¹ a 195 ml kg⁻¹ h⁻¹ al final del tratamiento (ver capítulo I). Después de 1 d a 20°C, la concentración de CO₂ aumentó hasta 6,5% en las bandejas tratadas y cubiertas con PD-961, siendo éste valor superior al hallado en las bandejas controles. La concentración de CO₂ se mantuvo elevada después de 2 d a 20°C a pesar de que se observó una pequeña disminución. Los controles acumularon CO₂ en forma continua durante el almacenamiento a 20°C y luego alcanzaron similares valores que los tratados.

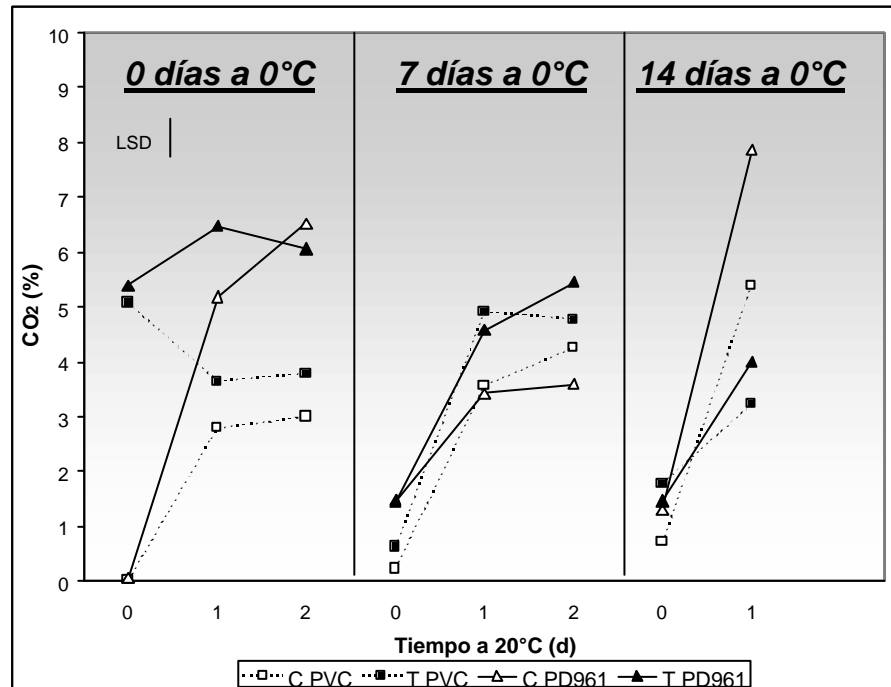


Figura IV.1: CO₂ en bandejas controles y tratadas térmicamente (45°C, 3 h) con película PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Un patrón diferente se encontró cuando se utilizó PVC, cuya permeabilidad al CO₂ es mayor. A pesar de que inmediatamente luego del tratamiento térmico las bandejas acumularon concentraciones de CO₂ similares que aquellas con PD-961, se observó un descenso al cabo de 1 d a 20° hasta valores de 3,6%. Los controles con PVC acumularon CO₂ durante el almacenamiento a 20°C alcanzando similares valores que los tratados térmicamente luego de 1 d a 20°C. Luego de 7 d de almacenamiento refrigerado, la concentración de CO₂ se encontró cerca del 1% tanto en las bandejas controles como tratadas cubiertas con película PVC o PD-961. Durante la incubación a 20°C el nivel de CO₂ continuó incrementándose en los frutos controles y tratados siendo mayor la diferencia en los frutos tratados con PD-961 luego de 2 d. Un comportamiento diferente se observó luego de 14 d de almacenamiento refrigerado ya que el contenido de CO₂ se mantuvo cercano al 1% en todas las bandejas. No obstante, luego de 1 d a 20°C los frutos controles acumularon mayor cantidad de CO₂ que los tratados.

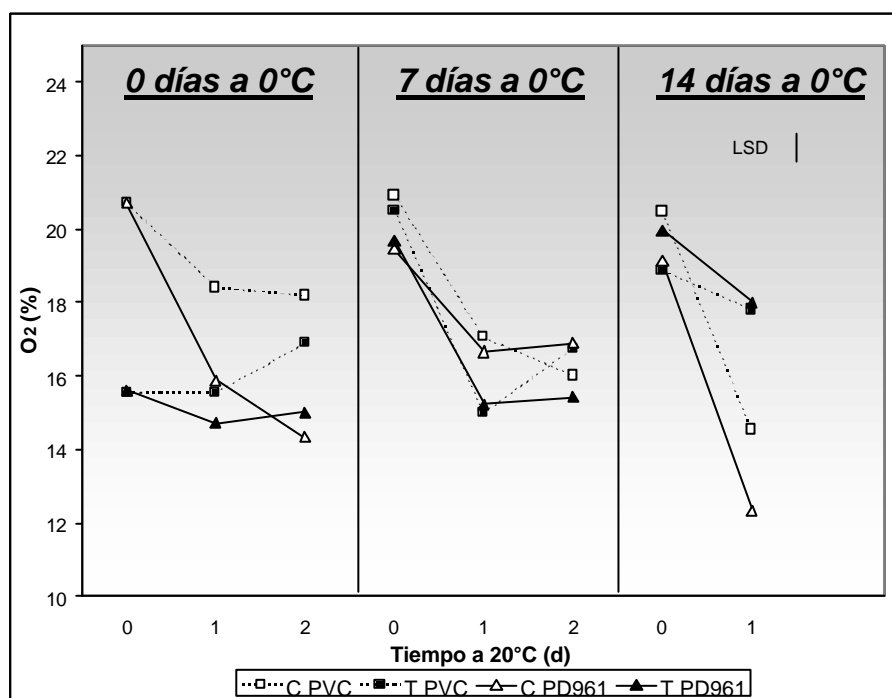


Figura IV.2: Concentración de O₂ en bandejas controles y tratadas térmicamente (45°C, 3 h) con película PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Esta tendencia se observó tanto en los frutos cubiertos con PVC como con PD-961 aunque la diferencia fue mayor en el caso de la película PD-961.

Considerando que los frutos controles sufrieron mayor daño durante el almacenamiento, la acumulación final de CO₂ en los frutos controles podría ser consecuencia del incremento en la actividad respiratoria de los frutos en respuesta al daño, así como de la producción de CO₂ proveniente del metabolismo fúngico. Los niveles de oxígeno descendieron durante el almacenamiento en la medida que aumentó el contenido de CO₂ (Figura IV.2)

3.1.2. Ataque de patógenos

En ausencia de almacenamiento refrigerado los frutos controles cubiertos con PVC comenzaron a mostrar señales del ataque de patógenos luego de 2 d a 20°C, mientras que los frutos controles con PD-961 lo hicieron 1 d después (Figura IV.3). Las diferencias en el ataque de patógenos entre las dos películas analizadas se acentuaron durante el almacenamiento a 20°C y luego de 5 d el 67% de los frutos controles cubiertos con PVC mostraron ataque de hongos y 27% en el caso de los frutos cubiertos con PD-961. Los tratamientos térmicos de alta temperatura han sido descritos como una estrategia para modificar la respuesta a otros tipos de estrés durante el almacenamiento (Mc Donald y col., 1999). En el caso de las dos películas analizadas los frutos tratados térmicamente presentaron menor ataque de hongos que los correspondientes controles. Los resultados más marcados se observaron en el caso de los frutos tratados térmicamente y cubiertos con la película PD-961. Luego de 5 d a 20°C, sólo 7% de los frutos tratados y cubiertos con PD-961 mostraron ataque. Luego de 7 d a 0°C, no se observó ataque fúngico en ninguno de los tratamientos analizados. Cuando los frutos se transfirieron a 20°C el ataque de patógenos se incrementó rápidamente. Considerando el porcentaje de frutos atacados, las tendencias fueron similares a las observadas en ausencia de almacenamiento refrigerado. Luego de 5 d a 20°C, 90% de los frutos controles cubiertos con PVC y 45% de los controles con PD-961 mostraron ataque de patógenos, mientras en el caso de los frutos tratados estos valores ascendieron a 37 y 20% para PVC y PD-961 respectivamente. Nuevamente los mejores resultados se observaron cuando el tratamiento térmico se realizó en presencia de la película PD-961, que permitió una mayor acumulación de CO₂. Luego de 14 d a 0°C no se observaron síntomas de ataque fúngico en ninguno de los tratamientos. No obstante, durante el almacenamiento a 20°C el ataque de patógenos se incrementó sustancialmente, no

encontrándose diferencias entre los frutos controles y tratados cubiertos con PVC.

En el caso de los frutos cubiertos con PD-961, los frutos tratados térmicamente presentaron menor ataque que los respectivos controles luego de 3 d, pero no se encontraron diferencias posteriormente. La reducción en el ataque de hongos descrita anteriormente resultó de la combinación del efecto de los tratamientos térmicos de alta temperatura y del enriquecimiento de la atmósfera en CO₂. La reducción en el ataque de hongos como consecuencia de la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura en frutillas fue descrita anteriormente (ver Capítulo I). La presencia de altos niveles de CO₂ podría tener diversos efectos que contribuirían a disminuir aún más el ataque de patógenos. Ha sido informado que el dióxido de carbono puede retardar la germinación de esporas fúngicas (Agar y col., 1990). La exposición a niveles de CO₂ entre 5% y 20% posee efectos fungistáticos en patógenos postcosecha de frutillas (Couey y col., 1966; Woodward, 1972; El Kazzaz y col., 1983).

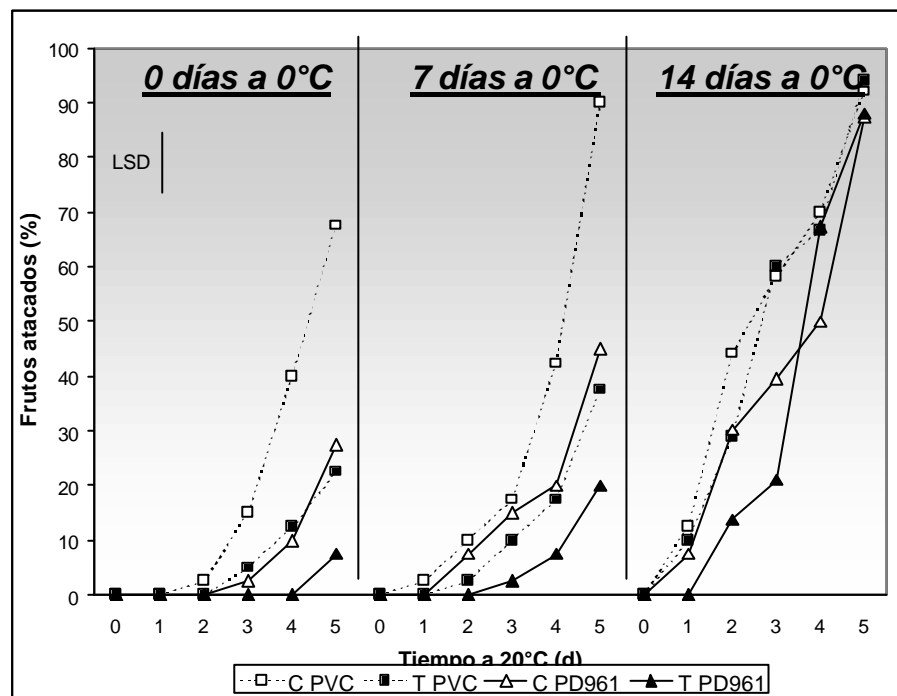


Figura IV.3: Ataque de patógenos en frutos (75%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) envasados con PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.1.3. Pérdida de peso

Inmediatamente luego del tratamiento, los frutos tratados en presencia de PVC mostraron una pérdida de peso de 2,9% mientras que los frutos tratados en presencia de la película PD-961 perdieron 2,3% respecto al peso inicial (Figura IV.4).

Cuando los frutos se transfirieron a 20°C, una mayor pérdida de peso se observó especialmente en los frutos cubiertos con PVC. Luego de 2 d, los frutos tratados con PVC perdieron 6,5% de su peso inicial mientras que un valor similar se halló para los frutos controles. Menor pérdida de peso se observó en los frutos cubiertos con la película PD-961: 4,6% y 3,5% para frutos tratados y controles respectivamente. Similares tendencias se observaron después de 7 ó 14 d de almacenamiento refrigerado y posterior almacenamiento a 20°C por 2 d.

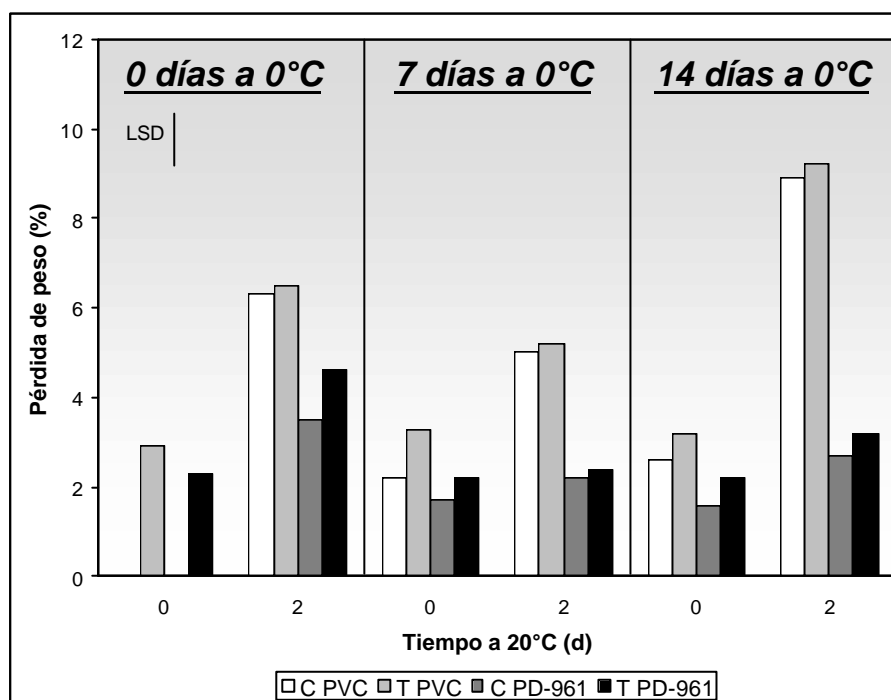


Figura IV.4: Pérdida de peso en frutos (75%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) envasados con PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.1.4. Color superficial y antocianinas

Inmediatamente luego del tratamiento no se encontraron diferencias en el hue entre frutos controles y tratados térmicamente (Figura IV.5). Luego de 2 d a 20°C, todos los frutos mostraron un incremento en el color rojo, verificado a través de la disminución del ángulo hue. No obstante, los frutos tratados en presencia de las películas PD-961 y PVC mostraron valores superiores de hue que los correspondientes controles, confirmando que los tratamientos térmicos provocan un retraso en la evolución del color (ver Capítulo I). El nivel de retraso en el desarrollo de color no fue similar para todos los frutos. Aquellos almacenados con la película PD-961 mantuvieron un nivel de hue más elevado que aquellos en PVC. Luego de 7 d a 0°C los frutos tratados mostraron un retraso en el desarrollo de color respecto a los frutos controles en ambas películas analizadas. El efecto del CO₂ y los tratamientos térmicos de alta temperatura actuando separadamente en el desarrollo de color de frutillas ha sido descrito (Civello y col., 1997; Holcroft y Kader, 1999). El efecto del CO₂ en el desarrollo de color externo de frutillas es dependiente de la concentración de gas presente en la atmósfera de almacenamiento.

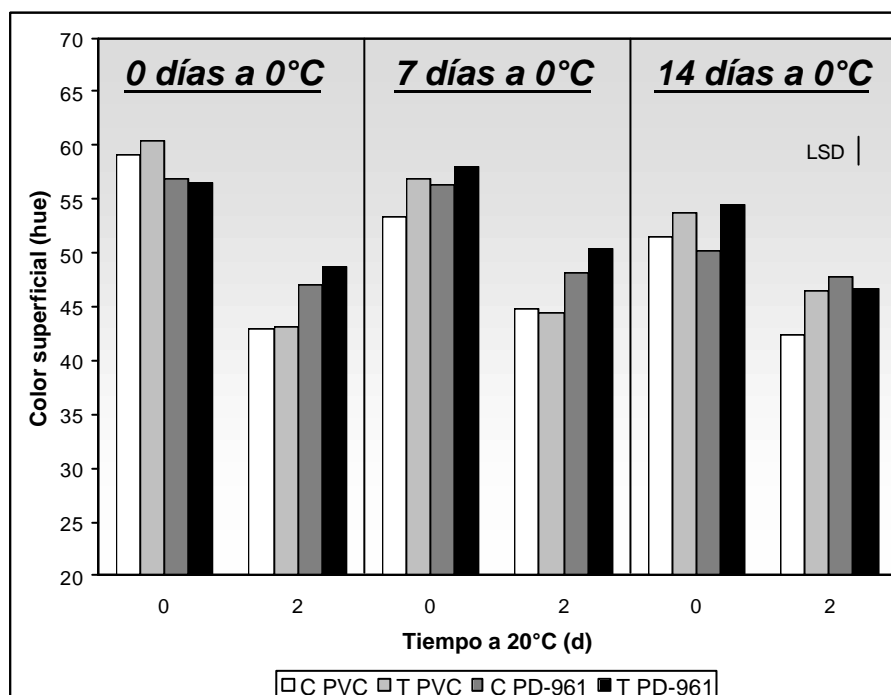


Figura IV.5: Color superficial (hue) en frutos (75%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con película PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. e muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Li y Kader (1989) encontraron que pequeños efectos se observan en niveles de concentraciones de CO₂ moderadas mientras que niveles más altos del gas retrasan la evolución del color. El efecto combinado de ambos factores (tratamiento térmico y acumulación de CO₂) podría explicar el mayor retraso en el desarrollo del color encontrado en el caso de los frutos tratados térmicamente en presencia de la película PD-961.

La aplicación de tratamientos térmicos también afectó la luminosidad de los frutos. Inmediatamente luego del tratamiento los frutos presentaron un menor L* que los controles (Figura IV.6).

Durante el almacenamiento tanto a 0°C como a 20°C, el valor de L* disminuyó y todos los frutos se tornaron más oscuros. Los frutos tratados térmicamente mantuvieron niveles de luminosidad mayores que los controles en ambas películas analizadas. Luego de 7 d a 0°C y 2 d a 20°C, la pérdida de luminosidad fue menos evidente en los frutos tratados térmicamente. Resultados similares se observaron luego de 14 d a 0°C y 2 d a 20°C.

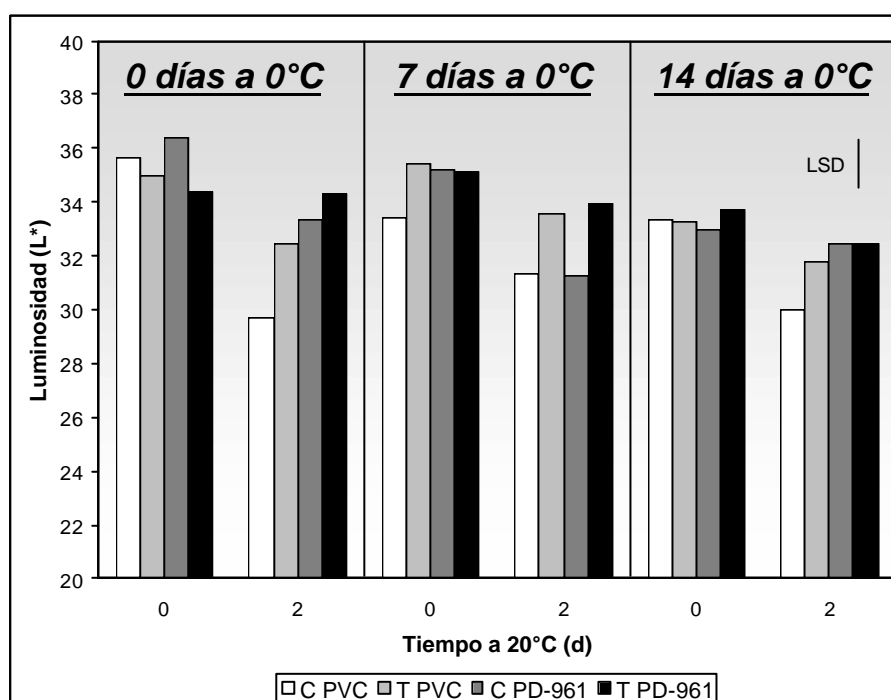


Figura IV.6: Luminosidad (L*) en frutos (75%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con película PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

En el caso de las antocianinas luego del tratamiento térmico no se observaron diferencias entre los frutos tratados y controles. Durante el almacenamiento los frutos tratados presentaron un menor nivel de antocianinas que los controles (Figura IV.7). Los niveles fueron además diferentes para las dos películas analizadas. Los frutos tratados y empacados con PD-961 mostraron una menor acumulación de antocianinas que los empacados con PVC. Es conocido que fenilalanina amonio-liasa (PAL) es una enzima regulatoria que participa en la síntesis de antocianinas (Jones, 1984). Given y col. (1988a, b) demostraron que la acumulación de antocianinas en frutillas requiere una elevada actividad PAL. Holcroft y Kader (1999) hallaron que elevadas concentraciones de CO₂ pueden reducir la síntesis de antocianinas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo podrían explicarse a través del efecto inhibitorio combinado de los tratamientos térmicos y acumulación inicial de CO₂ sobre la síntesis de antocianinas, probablemente a nivel de PAL.

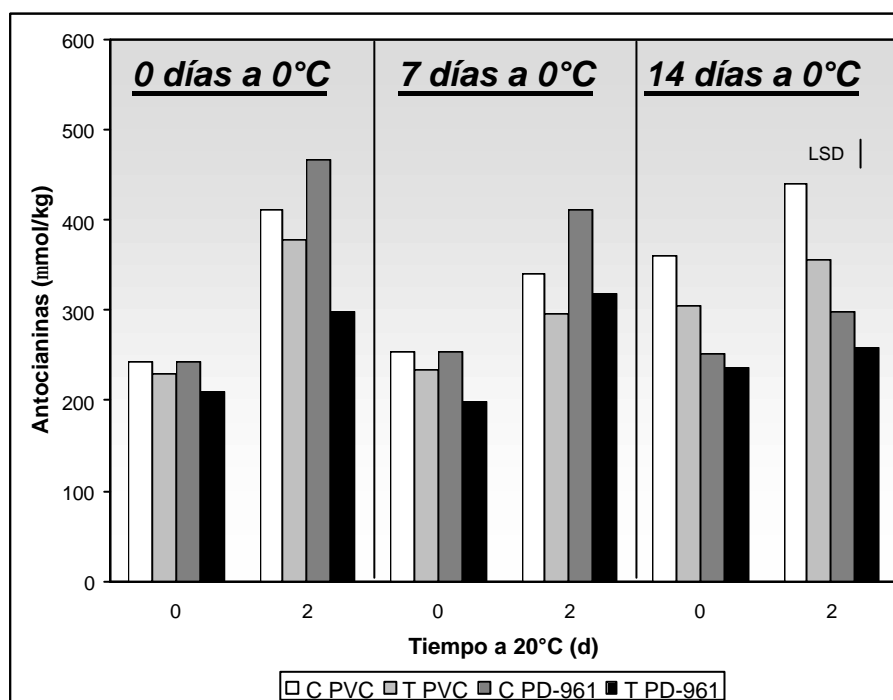


Figura IV.7: Antocianinas en frutos (75%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con película PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.1.5. Firmeza

Inmediatamente luego del tratamiento los frutos tratados presentaron mayor firmeza que los controles independientemente de la película analizada. Cuando los frutos se transfirieron a 20°C la firmeza disminuyó más rápidamente en los frutos controles que en los tratados térmicamente para ambas películas analizadas (Figura IV.8). Cuando los frutos se almacenaron a 0°C por 7 ó 14 d y luego se transfirieron a 20°C, los frutos tratados se mantuvieron más firmes que los respectivos controles.

Los resultados fueron más evidentes en el caso de los frutos empacados con PD-961, donde la firmeza cambió de niveles iniciales de 3,98 a 3,70 N en los frutos tratados y desde 3,75 hasta 2,81 N en los controles. Ha sido descrito que los tratamientos térmicos retrasan algunos procesos metabólicos asociados con la maduración (Lurie, 1998). La exposición de los tejidos vegetales a condiciones de estrés térmico ocasiona la desaparición de un grupo de mRNAs asociados con la maduración. Picton y Grierson (1988) demostraron que las altas temperaturas inhiben la expresión de ciertos genes vinculados con el proceso de maduración.

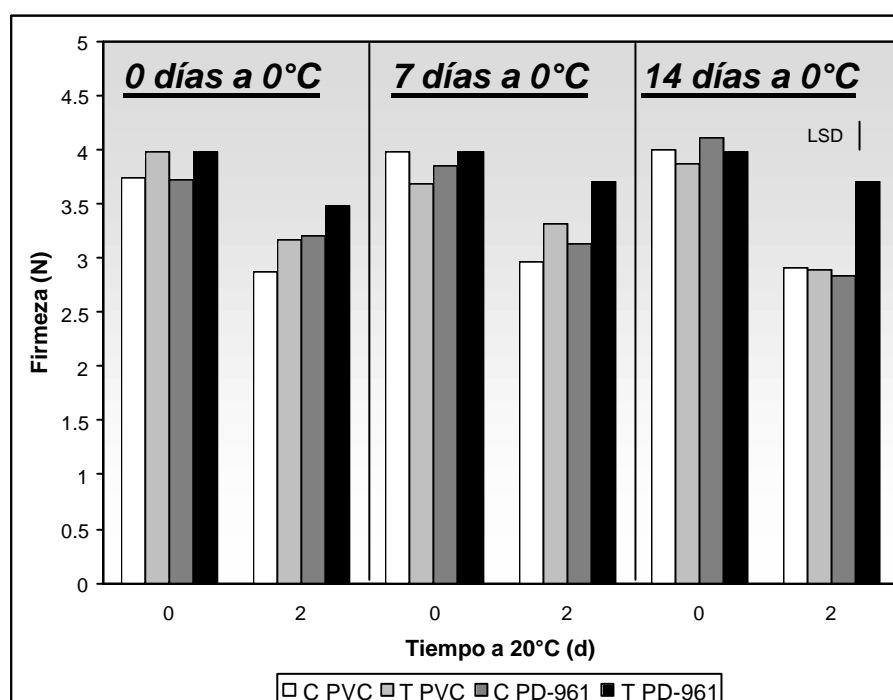


Figura IV.8: Firmeza en frutos (75%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con película PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

La actividad de enzimas que participan en la degradación de la pared celular se incrementa durante la maduración de frutillas (Abeles y Takeda, 1990; Barnes y Patchett, 1976), y la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura reduce su actividad y la degradación de polímeros de la pared celular (ver Capítulo II), lo que podría determinar un menor ablandamiento. Por otra parte, también se observaron diferencias en la velocidad de ablandamiento entre los frutos empacados con las diferentes películas ensayadas, por lo que otros factores vinculados con su uso parecerían contribuir al proceso. Holcroft y Kader (1999) describieron que el uso de atmósferas ricas en CO₂ durante el almacenamiento permite retrasar el proceso de ablandamiento. Otros autores hallaron que la firmeza no sólo es mantenida con el CO₂ sino que también puede incrementarse (Harker y col., 2000). Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que la firmeza es retenida en frutos que fueron tratados térmicamente en presencia de una película con menor permeabilidad al CO₂ como PD-961. Esta combinación permitió adicionar el beneficio de la retención de CO₂ al efecto de los TAT en forma aislada en el retraso del ablandamiento (ver Capítulo I).

3.1.6. pH y acidez titulable

El pH de los frutos no fue significativamente modificado en ninguna de las condiciones analizadas (datos no mostrados). En el caso de la acidez titulable no se encontraron diferencias entre los frutos controles y tratados inmediatamente luego del tratamiento. No obstante, luego de 2 d de almacenamiento a 20°C los frutos controles empacados con PVC mostraron mayores niveles de acidez que los correspondientes frutos tratados (Figura IV.9). Luego de 7 d de almacenamiento a 0°C no se encontró una modificación significativa en la acidez respecto a los valores iniciales, pero cuando los frutos se transfirieron a 20°C la acidez aumentó en los frutos controles.

Luego de 2 d a 20°C los frutos tratados en presencia de ambas películas presentaron una menor acidez que los correspondientes controles. La misma tendencia se observó también luego de 14 d a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Los frutos controles presentaron una tendencia a aumentar la acidez a 20°C en la medida que el daño de tejidos tuvo lugar.

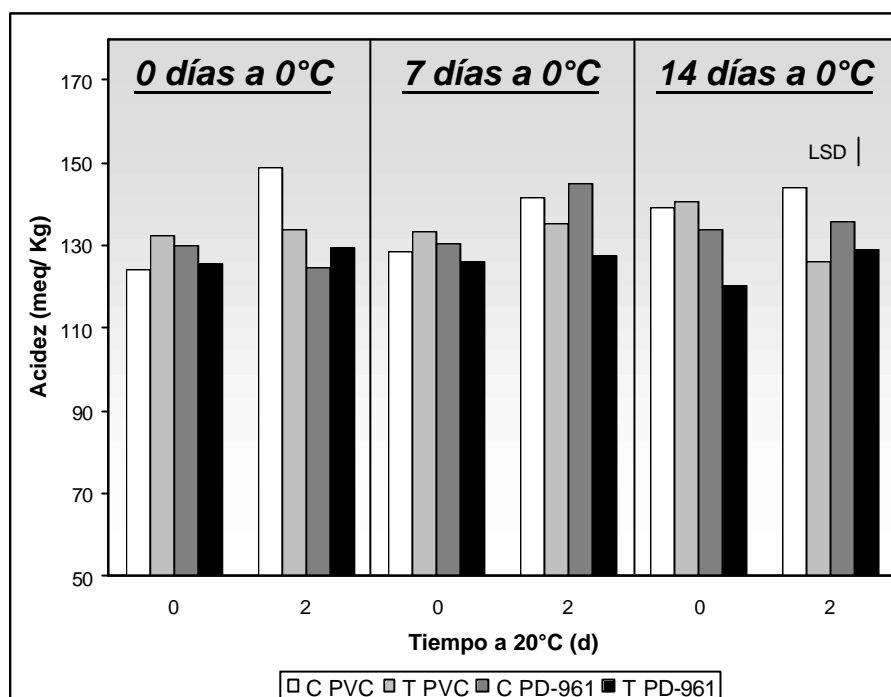


Figura IV.9: Acidez titulable en frutos (75%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con película PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.1.7. Azúcares

Los azúcares totales mostraron una leve reducción luego del tratamiento pero las diferencias no fueron significativas respecto a los controles (Tabla IV.2). Luego de 2 d a 20°C los frutos tratados en presencia de la película PD-961, que inicialmente acumularon más CO₂ que los controles, mantuvieron mayores niveles de azúcares. Luego de 7 y 14 d a 0°C y durante la incubación a 20°C el contenido de azúcares totales continuó disminuyendo y no se encontraron diferencias entre frutos controles y tratados. Resultados diferentes fueron encontrados por García y col. (1995a) quienes describieron que los tratamientos térmicos con agua pueden mejorar el contenido de sólidos solubles en frutillas.

Tabla IV.2: Azúcares totales en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con PVC o PD-961, durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. C: control, T: tratado. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

		DÍAS A 0°C					
		0		7		14	
Días a 20°C		0	2	0	2	0	2
Azúcares totales (g kg⁻¹)	C_{PVC}	37,5	27,2	36,0	28,7	28,7	24,0
	T_{PVC}	35,9	25,7	32,2	26,8	28,0	22,9
	C_{PD-961}	37,5	27,8	33,0	30,1	28,7	25,2
	T_{PD-961}	35,5	32,6	33,0	27,3	30,0	22,9
	LSD = 4,7						

3.8. Fenoles totales

Luego del tratamiento no se encontraron diferencias entre frutos controles y tratados en el contenido de fenoles totales. Cuando los frutos empacados en PVC se almacenaron por 7 ó 14 d a 0°C y luego se transfirieron a 20°C por 2 d se observó un incremento en el contenido de fenoles totales en los frutos controles. El incremento fue mayor en el caso de los frutos empacados en PVC que fueron aquellos que sufrieron mayor daño. Los frutos tratados térmicamente mantuvieron menores niveles de fenoles que los respectivos controles y el efecto fue más marcado en el caso de los frutos tratados en presencia de la película PD-961, que presentaron menor ataque de patógenos. Gil y col. (1997) describieron que dos fenoles (ácido elágico y campferol) aumentan durante el almacenamiento refrigerado de frutillas, y hallaron que este incremento era menor en el caso de atmósferas enriquecidas en CO₂. El incremento en el contenido de fenoles totales en el caso de los frutos controles podría relacionarse con el daño y disrupción de tejidos que tuvo lugar durante el almacenamiento. La síntesis de compuestos de naturaleza fenólica en respuesta al daño ha sido descrita (Saltveit, 2000). La menor variación en el contenido de fenoles en los frutos tratados térmicamente y especialmente en aquellos tratados en presencia de la película PD-961 indicaría un menor daño de los tejidos.

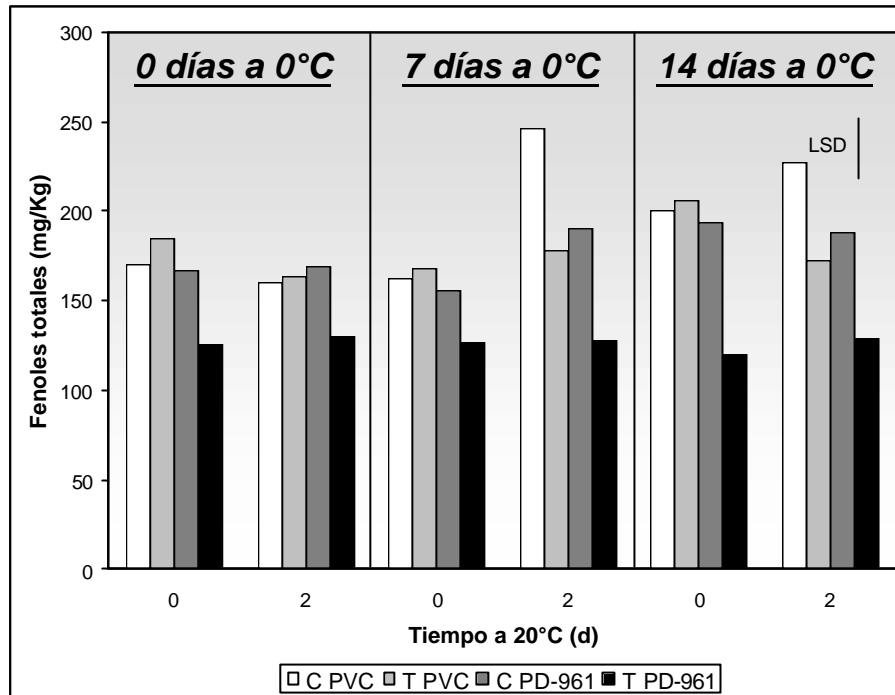


Figura IV.9: Fenoles en frutos (75%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con película PVC o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.2. Ensayo con fruta 100% roja

En otro experimento se utilizaron frutos con mayor grado de madurez (100% rojo) a fin de determinar la influencia de la madurez sobre los efectos de la aplicación de los tratamientos térmicos de alta temperatura. En este caso se utilizó una película perforada (PY8) y una no perforada (PD-961). El nivel de CO₂ en el interior de las bandejas cubiertas con PD-961 fue similar al descrito en el caso del experimento con frutos 75% rojos, mientras que la atmósfera de almacenamiento correspondiente a los frutos empacados con la película no perforada PY8 no fue modificada.

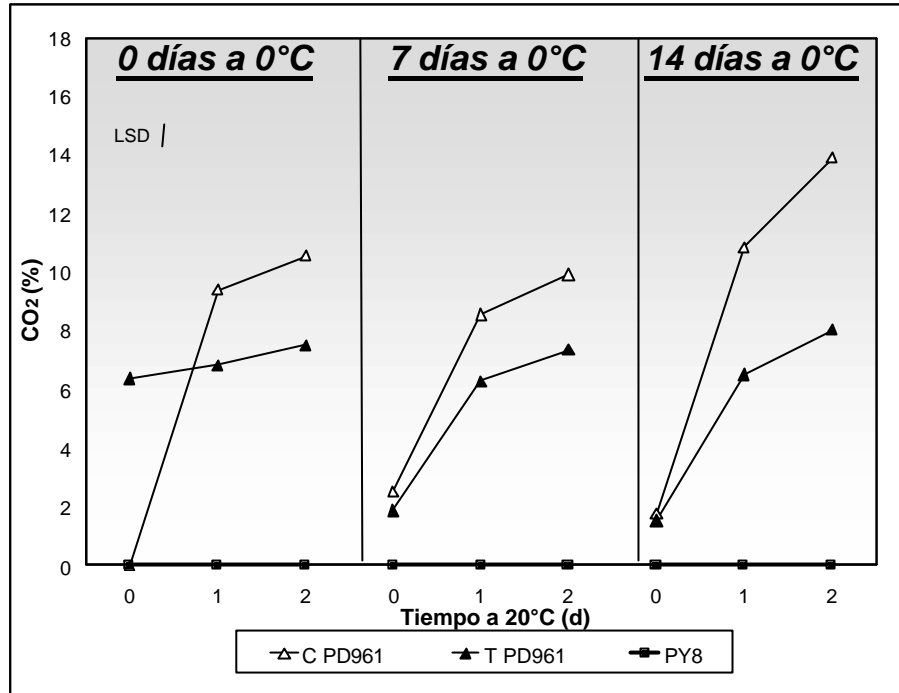


Figura IV.10: CO₂ en bandejas controles y tratadas térmicamente, con película PY8 o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

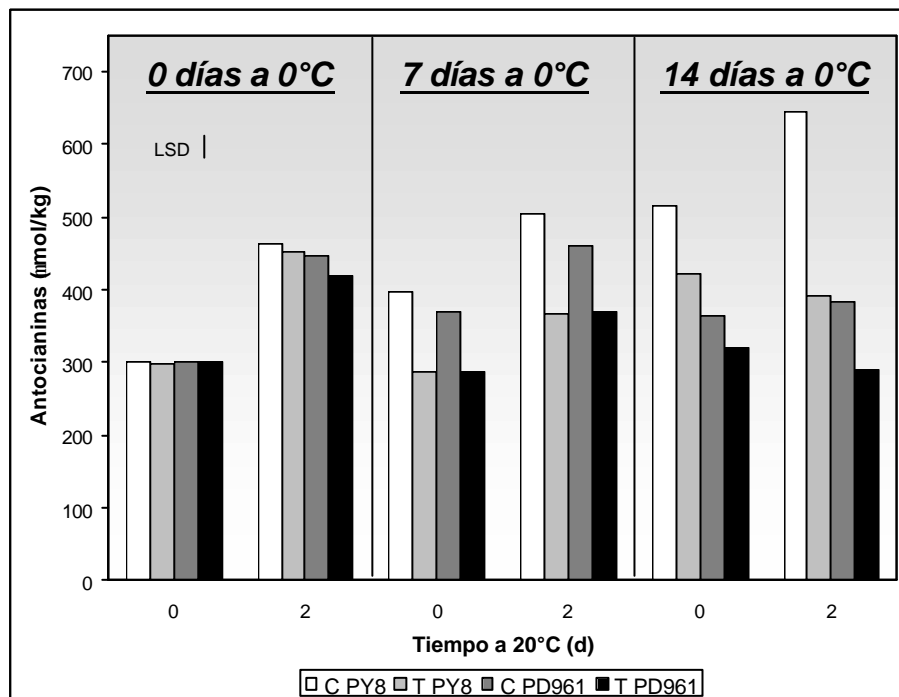


Figura IV.11: Antocianinas en frutos controles y tratados, envasados con película PY8 o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Los resultados hallados en el caso de antocianinas se muestran en la Figura IV.11. Inmediatamente luego del tratamiento térmico no se encontraron diferencias en ninguna de las condiciones analizadas. Cuando los frutos se refrigeraron por 7 ó 14 d a 0°C y luego se transfirieron a 20°C por 2 d, los frutos tratados térmicamente presentaron un menor contenido de antocianinas que los respectivos controles. En el caso del ataque de patógenos ambos grupos de frutos tratados térmicamente mostraron menor porcentaje de frutos atacados que los controles durante el almacenamiento a 20°C (Figura IV.12). Nuevamente se visualizó el efecto beneficioso de realizar los tratamientos en presencia de la película PD-961, ya que luego de 2 d los frutos empacados con PD-961 mostraron un 7,5% de frutos atacados mientras que este valor ascendió a 20% en el caso de los frutos empacados con PY8. Luego de 7 d de almacenamiento refrigerado y subsecuente almacenamiento a 20°C se observó la misma tendencia; los frutos tratados térmicamente en presencia de PD-961 fueron los que presentaron menor porcentaje de frutos atacados. Luego de 14 d a 0°C y 1 d a 20°C se observaron resultados similares a los descritos, pero posteriormente no se encontraron diferencias en el ataque de patógenos entre tratamientos.

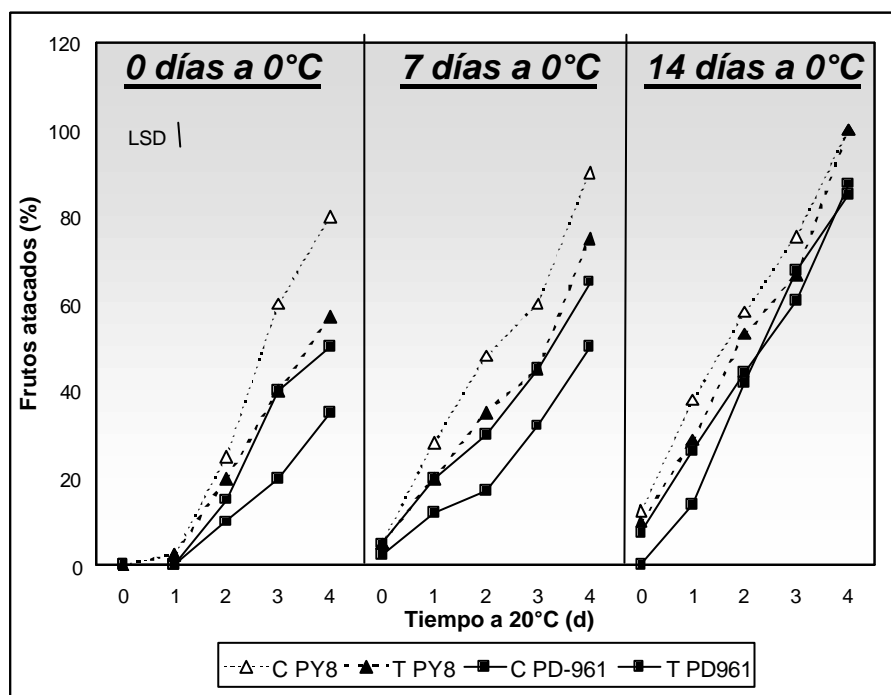


Figura IV.12: Ataque de patógenos en frutos (100%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con película PY8 o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Cuando se analizó la firmeza también se observó que los frutos tratados térmicamente presentaron nuevamente un retraso en el ablandamiento respecto a los controles, siendo el efecto más marcado en el caso de los frutos tratados en presencia de la película PD-961 (Figura IV.13). Considerando que los efectos beneficiosos de la aplicación de los tratamientos térmicos en presencia de películas de permeabilidad selectiva también se observaron cuando los tratamientos se realizaron en frutos más maduros, podría ser posible el retraso de la cosecha de manera de poder obtener fruta con mejor calidad desde el punto de vista organoléptico.

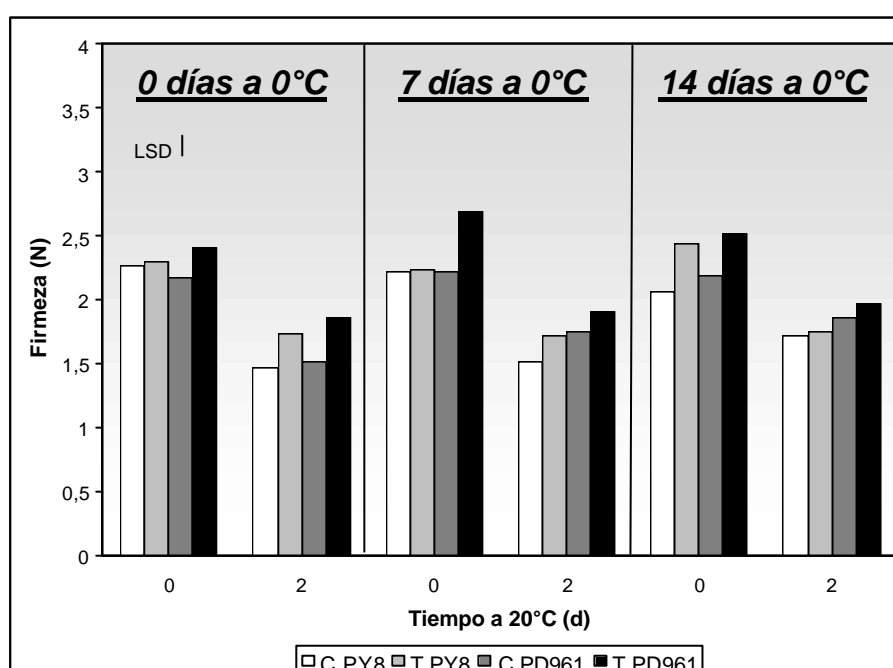


Figura IV.13: Firmeza en frutos (100%R) controles y tratados térmicamente (45°C, 3 h) y envasados con película PY8 o PD-961 durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

4. CONCLUSIONES

Los principales efectos benéficos de la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura en frutillas son el retraso en el ablandamiento y evolución del color así como el control de patógenos de postcosecha. Estos beneficios pueden incrementarse realizando la aplicación de los tratamientos en presencia de películas de permeabilidad selectiva a los gases. Los efectos de este tratamiento combinado también se observaron cuando fueron realizados en frutos más maduros. Por lo tanto, podría ser posible el retraso de la cosecha de manera de poder obtener fruta con mejor calidad desde el punto de vista organoléptico. Los resultados hallados resultan favorables y muestran como una innovación tecnológica la posibilidad de considerar este tipo de tratamiento como una estrategia para la modificación de atmósferas en forma rápida (debido a la elevada tasa respiratoria de los frutos durante el tratamiento), sencilla (no resulta necesaria la utilización de equipos de inyección de gases) y económica (el fruto como fuente de CO₂).

Capítulo V

***“Extensión de la aplicación de
tratamientos térmicos de alta
temperatura a otros frutos”
blandos”***

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Clasificación

Por más de 2.000 años las diferentes especies del género *Rubus* han sido producidas con propósitos medicinales, como cercos de protección y principalmente para obtener fruta comestible (Paglietta, 1986). Las zarzamoras, frambuesas y sus híbridos constituyen un grupo diverso perteneciente al género *Rubus*. Son miembros de la familia Rosáceas, subfamilia Rosoideas. El género *Rubus* es uno de los más diversos dentro de las Angiospermas, consistiendo en doce subgéneros que incluyen en algunos casos más de cien especies. Su distribución geográfica se encuentra desde el Ártico hasta los trópicos en todos los continentes con excepción de la Antártida. Tres de los subgéneros poseen plantas con frutos comestibles:

1. Subgenero Eubatus: Zarzamoras.

2. Subgénero Idaebatus: Frambuesas (200 especies).

3. Subgénero Cylactis: Frutos del Ártico (*R. arcticus* y *R. stellatus*). Los cultivares comerciales que existen son híbridos entre estas dos especies y se cultivan en Finlandia y Suecia para la elaboración de licores.

1.2. Origen e historia del cultivo

Las tres especies de mayor importancia comercial dentro de este género son:

a. Zarzamoras: *Rubus ursinus* Cham. (Figura V.1). Son nativas de Asia, Europa, y América, y se han naturalizado en Australia. Han sido utilizadas en Europa por más de 2000 años con fines de alimentación, medicinales y ornamentales.



Figura V.1: Frutos de zarzamora (*Rubus ursinus*).

2. Frambuesa roja: *R. idaeus* L. (Figura V.2). Las subespecies europeas de este grupo se designan como *R. idaeus subsp. vulgatus* Arrhen., mientras que las de Norteamérica se conocen como *R. idaeus subsp. strigosus* Michx. Es indígena de Asia menor y Norteamérica, el nombre específico se debe al monte Ida en el Cáucaso. Existen informes de su domesticación en el siglo IV. Los romanos probablemente extendieron su cultivo en toda Europa, y los británicos popularizaron su cultivo y exportaron plantas a Nueva York en 1771.

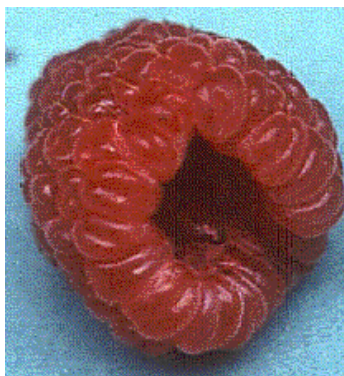


Figura V.2: Frutos de frambuesa (*Rubus idaeus*).

3. Frambuesa negra: *R. occidentalis* L. (Figura V.3). Esta es una especie indígena de Norteamérica. La domesticación parece haberse retrasado hasta el siglo XIX debido a la popularidad de las frambuesas rojas y a la alta disponibilidad de frutos silvestres. En 1880 ya existían en Estados Unidos por lo menos 17 cultivares y un elevado número de hectáreas cultivadas con frambuesa negra. La distinción entre zarzamoras y frambuesas se asocia con características de los frutos.



Figura V.3: Frutos de frambuesa negra (*Rubus occidentalis*).

Todos los frutos del género *Rubus* son agregados, pero en el caso de las frambuesas las drupeolas se separan del receptáculo mientras que en el caso de las zarzamoras éstas permanecen unidas a este luego de la cosecha. Por otra parte, las frambuesas presentan pelos mientras que las zarzamoras son glabras.

1.3. Producción

Tabla V.1: Principales productores mundiales de frambuesa. Fuente: FAOSTAT 2004.

País	Producción (Tn)
Mundo	353.346
Rusia	95.000
Polonia	44.845
Estados Unidos	37.240
Alemania	32.000
Ucrania	18.652
Hungría	18.135
Canadá	16.050
Gran Bretaña	9.000
Francia	7.200

1.4. Descripción botánica del género *Rubus*

Planta: Las especies de *Rubus* son, desde postradas hasta erectas, arbustos que producen renovales desde la raíz (Paglietta, 1986). Son perennes debido a cañas bianuales que se superponen en edad. Las raíces son perennes, dotadas de una densa cabellera. Las cañas crecen vegetativamente por un año, inician la diferenciación en verano, fructifican en el verano siguiente y mueren. La corteza de los retoños en la mayoría de los casos se encuentra cubierta de espinas más o menos rígidas según el cultivar. No obstante, pueden existir variedades de corteza inermes. Las hojas poseen 3-5 folíolos (generalmente 5), siendo el del medio el más largo. El haz de las hojas es verde intenso, surcado por nervaduras que le dan un carácter arrugado y el envés gris plateado. Poseen márgenes aserrados o dentados.

Flores: Pequeñas (1-1,5 cm), blancas o rosadas, nacen en racimos (10-20 flores por racimo para zarzamora, 10 para dewberry). En el dewberry y algunas zarzamoras las inflorescencias son cimosas. La diferenciación se produce a fines de verano en tipos bianuales y a mediados de verano en tipo primocane. Las flores poseen 5 pétalos poco vistosos y un grueso cáliz de color verdoso (Paglietta, 1986). El gineceo posee 60-80 ovarios, cada uno de los cuales desarrolla en una drupa. Existen 60-90 estámenes. Las moras y frambuesas producen una gran cantidad de néctar y atraen abejas.

Polinización: La mayor parte de los cultivares de moras y frambuesas no requieren polinizadores. No obstante, los dewberries son autoestériles por lo que deben colocarse polinizadores para mejorar la formación de frutos.

Frutos: En todos los casos se trata de drupas agregadas. En zarzamoras, las semillas son de mayor tamaño. La producción comienza en el segundo año y continúa por 10 años si se maneja correctamente. Los rendimientos, en condiciones de buen manejo, se ubican en 5.000-10.000 kg ha⁻¹.

1.5. Generalidades de cultivo

1.5.1. Suelo

No toleran encharcamiento ni suelos pesados, pero tampoco requieren alta fertilidad. Es ideal un suelo arenoso o limoso con pH 4,5 a 7,0. Las zarzamoras son tolerantes a la sequía pero los rendimientos se incrementan bajo irrigación. En cambio las frambuesas no toleran la sequía y el exceso de calor. Las raíces de frambueso no requieren un suelo profundo ya que ocupan unos 25 cm. Es deseable un buen contenido de materia orgánica en los suelos (Fisher, 2003).

1.5.2. Clima

Las frambuesas rojas y negras requieren veranos más frescos que las zarzamoras. En general poseen mayor requerimiento de horas de frío. La resistencia al frío no es en general un problema, salvo en cultivares adaptados a zonas templadas. Las heladas en general no son un problema debido a que la floración es tardía. Los requerimientos de horas de frío se ubican en 800-1.600 para frambuesas y 200-800 para zarzamoras.

En cuanto a las precipitaciones, necesita 700-900 mm anuales. Días relativamente cálidos durante el reposo invernal pueden despertar el crecimiento vegetativo y necrosar las yemas que son muy sensibles en este estado (Fisher, 2003).

Cultivo de primocane: En los primocanes o plantas que fructifican en otoño, la fruta se ubica en las zonas terminales de cañas de un año. Esto permite a los productores podar todas las cañas cada año sin pérdida de rendimiento, reduciendo la incidencia de insectos y enfermedades y simplificando las labores culturales. Es necesario un sistema de tutorado ya que las plantas con frutos tienden a volcarse. Las frambuesas primocane maduran en forma despareja y por un período prolongado respecto a los tipos bianuales. Es necesario cosechar cada 1 o 2 d ya que las altas temperaturas estivales provocan una rápida maduración de la fruta.

Podas: Consiste en aclareos, eliminación de cañas muertas y corte del ápice en verano. Esto último es para favorecer la ramificación en primocanes y mantener la altura adecuada para la cosecha (Fisher, 2003). La eliminación de cañas muertas permite reducir problemas sanitarios y facilita las labores culturales. Se dejan 1-5 cañas por metro lineal de surco.

1.6. Rubus híbridos

Existen numerosos híbridos entre especies del género *Rubus* que se utilizan para la producción de fruta comestible. Dentro de ellos podemos mencionar:

Loganberry: Son similares de aspecto a las zarzamoras. De tamaño grande, fruta púrpura, bajo rendimiento y crecimiento vigoroso. Producidas por Judge J.H. Logan en California en 1880.

Youngberry: Más dulce que el loganberry pero sensible al frío.

Tayberry: Más largos, 50% más grandes, menos brillante que el Loganberry.

Boysenberry: El boysenberry (*Rubus hybrid*), es una planta decidua que crece en forma más apropiada en climas templados. Al igual que frambuesas y zarzamoras, se caracteriza por poseer un sistema radical perenne y cañas aéreas bianuales. Las cañas generadas durante la primera estación de crecimiento (primocanes) producen

fruta en el verano siguiente. Generalmente las producciones aéreas poseen espinas, aunque existen cultivares inermes. Los frutos consisten en híbridos entre zarzamoras y frambuesas (Torre y Barrit, 1977). El horticultor Ralph Boysen las descubrió en California en 1920. Consiste en un fruto agregado desarrollado a partir de una única flor con numerosos ovarios, que producen una serie de drupeolas carnosas con semillas duras en su interior.



Figura V.4: Frutos de boysenberry
(*Rubus hybrid*).

El receptáculo permanece unido a la fracción comestible luego de la cosecha lo que marca una diferencia con frambuesas, donde el receptáculo permanece en la caña y da origen a un fruto hueco. Los boysenberries se asemejan a frambuesas de gran tamaño, con un color rojo-púrpura y sabor dulce pero algo ácido. Han sido clasificados como frutos no-climatéricos (Lipe, 1978; Kader, 1992). No obstante, aún existe debate acerca de esta clasificación. Los frutos muestran una baja producción de etileno (menos que $1 \mu\text{l C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), pero se observa un incremento durante la maduración (Walsh y col., 1983; Burdon y Sexton, 1993; Perkins-Veazie y col., 2000).

El proceso de maduración involucra un programa de desarrollo complejo. En un principio las drupeolas son verdes (10 d luego de la antesis), posteriormente desarrollan color rojo (20-40 d luego de la antesis), y finalmente adquieren color púrpura (aproximadamente 45-50 d luego de la antesis, dependiendo del genotipo y las condiciones ambientales). Modificaciones importantes en las características organolépticas y en la textura de los frutos también tienen lugar durante esta etapa. Debido a que estos cambios influyen las propiedades de postcosecha (vida postcosecha, aceptación por los consumidores), su importancia desde el punto de vista comercial es muy elevada.

Existen numerosos estudios que analizan los cambios durante el desarrollo y maduración en frutillas (Abeles y Takeda, 1990; Given y col., 1988a,b; Barnes y Patchett, 1976; Woodward, 1972; Cheng y Breen, 1991; Aharoni y col., 2002), zarzamoras (Abeles y Takeda, 1989; Perkins Veazie y col., 2000; Plowman, 1991; Walsh y col., 1983; Burdon y Sexton, 1993) y frambuesas (Perkins Veazie y Nonnecke, 1992; Stewart y col., 2000; Iannetta y col., 1999; Kumar y Ellis, 2001; Plowman, 1991), pero la información es limitada en el caso de boysenberries (Given y col., 1986; Monro y Lee, 1987). Los frutos maduros se dañan muy fácilmente durante la cosecha, transporte y operaciones comerciales (Joles y col., 1994) y su vida postcosecha bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas (0°C, 95% HR) es de sólo 2-3 d (Thompson, 2000; Kader, 1992). Este corto período determina que la comercialización como producto fresco sea altamente dificultosa, y que gran parte de la producción se destine finalmente al procesado por lo que algunos daños durante las operaciones de cosecha y postcosecha no poseen graves consecuencias. Las pastas obtenidas a partir de los frutos por lo común se congelan y se comercializan para la elaboración de jugo, mermelada, puré, salsa y saborizante. No obstante, existe un mercado estable y en franca expansión para los boysenberries frescos y el aprovechamiento de este mercado dependerá de la continuidad y calidad de los frutos disponibles. La extensión de la vida postcosecha de boysenberry ha sido un desafío ya que un alto porcentaje de los frutos no logra llegar a los consumidores en condiciones satisfactorias y deben ser descartados. El desarrollo de *Botrytis cinerea* (moho gris) puede ocasionar significativas pérdidas (Salunkhe y Desai, 1984). Los frutos deben almacenarse a temperaturas entre 0-1°C a fin de retrasar el crecimiento fúngico. Sin embargo, la pérdida de integridad de tejidos (usualmente indicada por la presencia de exudado), puede favorecer notablemente el ataque de *Botrytis*.

Con el objetivo de obtener mayor información básica acerca de la maduración y desarrollo de boysenberry, se midieron los cambios en el color, firmeza, tamaño, composición (azúcares, antioxidantes, compuestos fenólicos, clorofila, antocianinas, acidez y pH) y la actividad de diversas enzimas involucradas en la degradación de pared celular (endo- β -1,4-D-glucanasa, β -galactosidasa, poligalacturonasa y pectin metilesterasa), y degradación de clorofilas (clorofilasa, Mg-dequelatasa y clorofila peroxidasa). Dado que es poco probable que una única técnica (refrigeración) pueda controlar las pérdidas de postcosecha de boysenberry, se evaluó el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura en combinación con el almacenamiento refrigerado sobre su calidad y vida postcosecha.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Material vegetal

Se cosecharon muestras de frutos de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Los floricanos (cañas fructíferas de 2 años) se manejaron en trelises para facilitar el manejo y cosecha. Los rebrotes tempranos se eliminaron pero cerca de la cosecha se dejaron a fin de permitirles lograr un buen crecimiento antes del invierno. Se utilizaron prácticas culturales tradicionales, excepto que durante la estación de crecimiento no se utilizaron fungicidas.

2.2. Análisis de cambios durante el desarrollo y maduración de boysenberries

Se cosecharon por la mañana boysenberries en diferentes estadios de desarrollo (verde, virado, rosado, rojo y púrpura). Los frutos se manipularon cuidadosamente para evitar daños, se colocaron en contenedores de poca profundidad a fin de evitar el daño por compresión y se transportaron inmediatamente al laboratorio. Las determinaciones se realizaron en fresco, o los frutos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2.3. Utilización de tratamientos térmicos de alta temperatura en postcosecha de boysenberries

2.3.1. Selección de tratamientos térmicos apropiados para boysenberry

A fin de seleccionar un tratamiento térmico de alta temperatura adecuado para boysenberries, se cosecharon frutos en estadio de madurez comercial (color superficial púrpura), se colocaron en bandejas plásticas, se cubrieron con PVC (15 µm de espesor) y se llevaron a estufa a 45°C por 1 ó 3 h. Finalizado el tratamiento se almacenaron a 20°C por 2 d. Los controles correspondientes sin tratamiento térmico se colocaron directamente a 20°C. El efecto de los tratamientos se evaluó observando el desarrollo de heridas y la presencia de exudado.

2.3.2. Combinación de tratamientos térmicos y almacenamiento a 0 y 20°C

Frutos en estadio de madurez comercial se trataron térmicamente (45°C, 1h), se almacenaron a 20°C por 1 d ó a 0°C por 4 d y luego se transfirieron a 20°C. Correspondientes controles sin tratamiento térmico se almacenaron directamente a 20 °C por 1 d o a 0°C por 4 d y luego se transfirieron a 20°C. Las muestras se analizaron

inmediatamente o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.4. Determinaciones analíticas

2.4.1. Peso de los frutos

Se pesaron los frutos en diferentes estadios de madurez (verde, virado, rosa, rojo y púrpura). Se utilizaron 60 frutos para cada estadio analizado.

2.4.2. Daño de los frutos

Treinta frutos se utilizaron para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado. Se evaluó el número de drupeolas dañadas por fruto y la presencia de exudado.

2.4.3. Pérdida de antocianinas

Cinco frutos se incubaron en 25 ml de agua. Luego de 2 h de incubación se tomaron alícuotas de 3 ml, se adicionaron 2 ml de HCl 25% p/v y se midió la absorbancia de la solución a 525 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como DO_{525} por gramo de fruto.

2.4.4. Firmeza

La firmeza se midió utilizando un equipo analizador de textura (TA.XT2, Stable Micro Systems Texture Technologies, Scarsdale, NY) equipado con una sonda plana de 2 mm. Cada fruto se comprimió 1 mm, en el caso de los diferentes estadios de desarrollo, y 2 mm en la evaluación de efecto de los tratamiento térmicos. La velocidad de avance de la sonda fue de 0,5 mm s⁻¹, y se registró la fuerza máxima desarrollada durante el ensayo. Cada fruto se comprimió en 3 drupeolas diferentes y se utilizaron 20 frutos para cada estadio analizado.

2.4.5. Azúcares totales y reductores

Frutos congelados se procesaron en un molinillo y 1 g del polvo resultante se extrajo con 10 ml de etanol por 30 min a 25°C. La mezcla se centrifugó a 2.300 x g por 10 min y diferentes alícuotas del sobrenadante obtenido se llevaron a 50 ml con agua. El contenido de azúcares reductores se determinó por espectrofotometría a 520 nm empleando una modificación del método de Somogyi-Nelson (Southgate., 1976). En el

caso de azúcares totales, las muestras fueron primero hidrolizadas con HCl 0,1 M por 10 min a 100°C y luego se procesaron como se describió anteriormente. Los resultados se expresaron como g de glucosa por kg de fruto. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4.6. pH y acidez titulable

Frutos congelados se procesaron en un molinillo y 10 g del polvo obtenido se resuspendieron en 100 ml de agua. El pH y acidez de la muestra se determinaron con un pHmetro y por titulación con NaOH 0,1 M (AOAC, 1980). Los resultados se expresaron como miliequivalentes de H⁺ por kilogramo de fruto fresco (meq. kg⁻¹). Se analizaron dos muestras independientes por condición analizada y cada muestra se tituló por duplicado.

2.4.7. Fenoles totales

Frutos congelados se procesaron en un molinillo y 1 g del polvo obtenido se extrajo con 6 ml de etanol. La mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4°C. Tres mililitros del sobrenadante resultante se llevaron a 100 ml con agua y estos extractos se utilizaron para la determinación de fenoles totales. Doscientos microlitros de extracto se adicionaron a 1,11 ml y 200 µl de reactivo Folin-Ciocalteu 1 N. Luego de 3 min a 25°C, se agregaron, 1,5 ml de una solución conteniendo NaOH 0,1 M y Na₂CO₃ 2% y la mezcla de reacción se incubó por 1 h a la misma temperatura. Se midió la absorbancia a 760 nm y se calculó el contenido de fenoles totales utilizando fenol como estándar. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como g de fenol por kg de fruto.

2.4.8. Antioxidantes

La capacidad para neutralizar radicales libres de los frutos se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Brand Williams y col. (1995). Muestras de 1 g de fruto se procesaron en 6 ml de etanol y la mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4°C. Tres mililitros del sobrenadante resultante se llevaron a 100 ml con agua. Alícuotas del extracto etanólico (5, 10, 20, 40, 80 y 120 µL) se adicionaron a tubos conteniendo 3,9 ml de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{*}) 0,025 g l⁻¹ en metanol preparado diariamente. Se midió la absorbancia a 515 nm a diferentes tiempos con un espectrofotómetro (Modelo DU650, Beckman Instruments Inc., Berkeley, CA, USA) hasta que no se observaron variaciones en la absorbancia. Se graficó el porcentaje de

DPPH* remanente contra el volumen de extracto adicionado y se determinó la cantidad de extracto necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH* en un 50%, cantidad que se definió como EC₅₀. Las determinaciones se realizaron por triplicado. El poder antioxidante se expresó como EC₅₀⁻¹.

2.4.9. Color superficial

El color superficial se evaluó con un colorímetro (Minolta, Modelo CR-300, Tokio, Japón) midiendo el parámetro L* y el ángulo hue en seis zonas de cada fruto. Se analizaron treinta frutos para condición analizada.

2.4.10. Antocianinas

Frutos congelados se trituraron en un molinillo refrigerado (Tekmar, modelo A-10, Alemania) y a 0,1 g del polvo resultante se adicionaron a 10 ml de metanol conteniendo HCl 1% v/v y se mantuvieron a 4°C por 10 min. Luego se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se utilizó para medir la absorbancia a 525 nm. El contenido de antocianinas se calculó utilizando el coeficiente de absorptividad molar $\epsilon = 29.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron como g de cianidín-glucósido por kg de fruto.

2.4.11. Extracción y dosaje de clorofila

Frutos congelados se trituraron en un molinillo y una porción de aproximadamente 0,5 g se colocaron en 5 ml de acetona-H₂O (80:20) a 0°C, se agitaron y centrifugaron a 9.000 x g por 15 min a 4°C. El contenido de clorofila se determinó en el sobrenadante por el método de Lichtenthaler (1987). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg de clorofila por kg de fruto.

2.4.12. Extracción de clorofilasa, Mg-dequelatasa y clorofila peroxidasa

Frutos congelados se procesaron en un molinillo y aproximadamente 5 g se colocaron en 15 ml del siguiente buffer de extracción: Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 0,1 M, Triton X-100, 0,2%, polivinilpolipirrolidona (PVPP) 30 g l⁻¹, PMSF 1mM, cisteína 5 mM, pH 6,0. La mezcla se agitó por 1 h a 4°C, se centrifugó a 9.000 x g por 20 min a 4°C, el sobrenadante se separó, filtró por vacío y utilizó para el análisis de las actividades enzimáticas. Se realizaron dos extractos por cada estadio analizado y las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.4.13. Clorofilasa

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7 conteniendo Triton X-100 0,15%, Cls 10 μ M, acetona 16% v/v y 2 ml de extracto enzimático en un volumen de 13 ml. La mezcla se incubó a 40°C y se tomaron alícuotas cada 5 min hasta 20 min y se colocaron en 5 ml de hexano-acetona (7:3 v/v) enfriada en agua-hielo. Los tubos se agitaron vigorosamente hasta la formación de la emulsión y se mantuvieron en la oscuridad a 4°C. Luego se centrifugaron a 6.000 x g por 5 min a 4°C. La clorofila remanente (fase superior) y el clorofílido (fase inferior) se midieron a 663 nm a fin de seguir la desaparición de Cls y la aparición de clorofílido. Los resultados se expresaron como el cambio en la DO por gramo de fruto en una hora, bajo las condiciones de ensayo.

2.4.14. Mg-dequelatasa

Se preparó la siguiente mezcla de reacción: buffer Tris-tricina 50 mM pH 8,8, 50 μ l de clorofilina y 150 μ l de extracto crudo en un volumen total de 500 μ l a fin de lograr una DO (686 nm) inicial cercana a 0,2. La mezcla se incubó a 37°C y la reacción se evaluó siguiendo el incremento en absorbancia a 686 nm. Los resultados se expresaron como el cambio en la DO por gramo de fruto en una hora, bajo las condiciones de ensayo.

2.4.15. Clorofila peroxidasa

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: buffer fosfato de sodio 0,02 M pH 5,0, Triton X-100 0,2% v/v, ácido p-cumárico 5 mM H₂O₂ 60 mM, 25 μ l extracto enzimático y 10 μ l clorofila para lograr una absorbancia inicial cercana a 0,7. La mezcla se incubó a 35°C y la reacción se inició adicionando H₂O₂. La decoloración de la clorofila se evaluó midiendo el cambio en la absorbancia a 669 nm. Los resultados se expresaron como el cambio en la DO por gramo de fruto en una hora, bajo las condiciones de ensayo.

2.4.16. Endo-1,4-b-D-glucanasa

Frutos congelados se procesaron en un molinillo refrigerado y 5 g del polvo obtenido se extrajeron con 15 ml de buffer (ácido acético-acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, PVPP 10 g l⁻¹). La suspensión obtenida se centrifugó a 10.000 x g por 30 min y el sobrenadante se descartó. La operación se repitió dos oportunidades. Luego el pellet obtenido se resuspendió en 15 ml de buffer (ácido acético-acetato de sodio 50 mM, pH

6,0, NaCl 1 M, PVPP 10 g l⁻¹) y se agitó por 2 h a 4°C. El homogenato se centrifugó a 10.000 x g por 30 min y el sobrenadante se utilizó para ensayar la actividad enzimática. Todos los pasos durante la preparación de los extractos se realizaron a 4°C. La actividad enzimática se midió en una mezcla de reacción conteniendo buffer ácido acético-acetato de sodio 50 mM pH 6,0, NaCl 1 M, carboxi-metil celulosa 0,5% (p/v) y 1,5 ml de extracto enzimático en un volumen total de 2 ml. La mezcla se incubó a 37 °C, y se tomaron alícuotas luego de 0, 2, 5, 8 y 24 h y se congelaron en nitrógeno líquido hasta la determinación de azúcares. Los azúcares se midieron con ácido dinitrosalicílico (DNS) midiendo la absorbancia a 550 nm (Miller, 1959). Se prepararon dos extractos para cada estadio de desarrollo analizado y cada extracto se midió por duplicado. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica en una hora bajo las condiciones del ensayo, por gramo de fruto.

2.4.17. b-galactosidasa

Aproximadamente 5 g de fruto se procesaron en un Omnimixer con 15 ml de buffer (ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 6,0, NaCl 1 M, PVPP 10 g l⁻¹). La suspensión obtenida se agitó por 2 h y luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 min. Todos los pasos durante la preparación del extracto se realizaron a 0-4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de la actividad β-galactosidasa. Se prepararon dos extractos para cada estadio de desarrollo analizado y cada extracto se midió por duplicado. La actividad se midió en una mezcla conteniendo buffer ácido acético/acetato de sodio 0,05 M pH 4,5 y p-nitrofenil β-D-galactopiranosido 3 mM. La mezcla de reacción se incubó a 40°C y alícuotas de 150 μl se tomaron a diferentes tiempos y se mezclaron con 500 μl de Na₂CO₃ 0,4 M. Se midió la absorbancia a 410 nm y los resultados se expresaron como la variación en la densidad óptica por hora bajo las condiciones de ensayo, por gramo de fruto.

2.4.18. Poligalacturonasa

Aproximadamente 5 g de fruto se procesaron en un Omnimixer con 15 ml de buffer de extracción (ácido acético-acetato de sodio 50 mM pH 6,0, NaCl 1 M, PVPP 10 g l⁻¹). La suspensión obtenida se agitó por 2 h y luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 min. El sobrenadante obtenido se dializó por 12 h en buffer ácido acético/acetato de sodio pH 4,5. El extracto se utilizó para la determinación de la actividad PG. Todos los pasos durante la preparación de los extractos se realizaron a 0-4°C. Se prepararon dos extractos para cada estadio de desarrollo analizado y cada

extracto se midió por duplicado. La actividad se ensayó en una mezcla de reacción conteniendo ácido acético/acetato de sodio 50 mM pH 6,0, ácido poligalacturónico 0,15% p/v y extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 40°C y alícuotas de 300 µl se tomaron a diferentes tiempos y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El ácido galacturónico liberado se midió con 2-ciano acetamida de acuerdo a Gross (1982). Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica en una hora bajo las condiciones de ensayo, por gramo de fruto.

2.4.19. Pectin metilesterasa

Aproximadamente 5 g de fruto se procesaron en un Omnimixer con 15 ml de NaCl 1 M y PVPP 10 g l⁻¹). La suspensión obtenida se agitó por 4 h y luego se centrifugó a 10.000 x g por 30 min. El sobrenadante se ajustó a pH 7,5 con NaOH y se utilizó para ensayar la actividad PME. Todos los pasos durante la preparación de los extractos se realizaron a 0-4°C. Se prepararon dos extractos para cada estadio de desarrollo analizado y cada extracto se midió por duplicado. La actividad se ensayó en una mezcla de reacción conteniendo 600 µl de pectina 0,5% p/v, 150 µl de azul de bromotimol 0,01% p/v en buffer fosfato 0,003 M pH 7,5, 100 µl de agua pH 7,5 y 100 µl de extracto enzimático. Se midió la reducción de la densidad óptica a 620 nm a 37°C. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica en una hora bajo las condiciones de ensayo, por gramo de fruto.

2.5. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial. Los datos se analizaron por medio de un análisis ANOVA. Los efectos principales y las interacciones se analizaron y las medias fueron comparadas mediante un test LSD a un nivel de significancia de 0,05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cambios durante el desarrollo y maduración de boysenberry

3.1.1. Peso de los frutos y firmeza

El peso de los frutos se incrementó desde 0,77 gramos en el estadio verde hasta 5,20 g en el estadio púrpura (Figura V.5). En los estadios virado, rosado y rojo los frutos presentaron un peso promedio de 0,92; 2,00 y 3,10 g respectivamente.

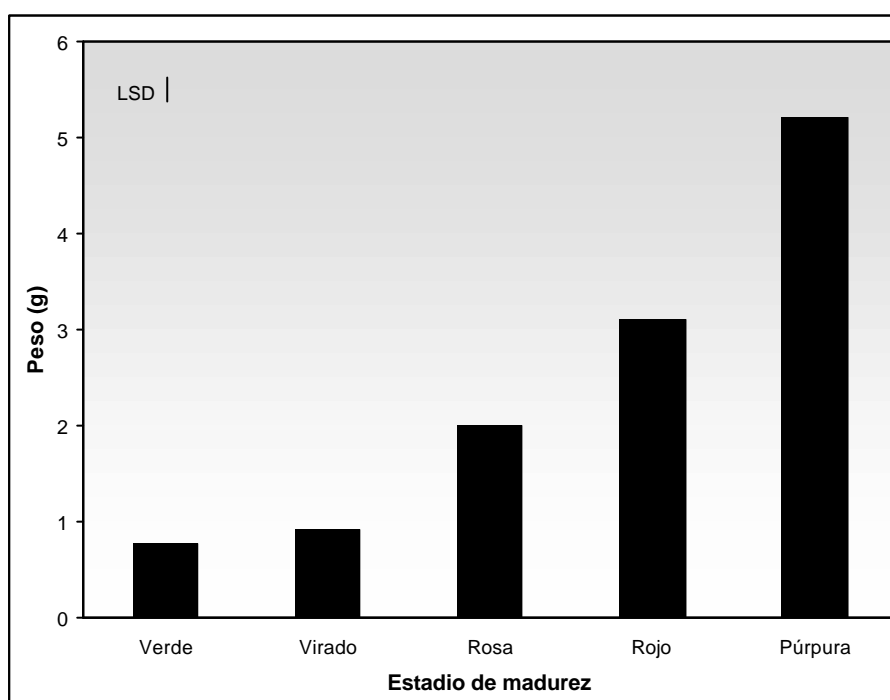


Figura V.5: *Peso promedio de boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.*

La firmeza fue de 10,87 N en los frutos verdes y disminuyó en la medida que el proceso de maduración tuvo lugar (Figura V.6). Los frutos virados y rosados presentaron valores de firmeza de 7,11 y 3,83. La reducción relativa más importante se produjo entre los frutos rosados y rojos (600%). Luego el proceso de ablandamiento continuó hasta el estadio púrpura, donde los frutos presentaron valores de firmeza de 0,29 N, determinando una alta susceptibilidad de los mismos al daño físico.

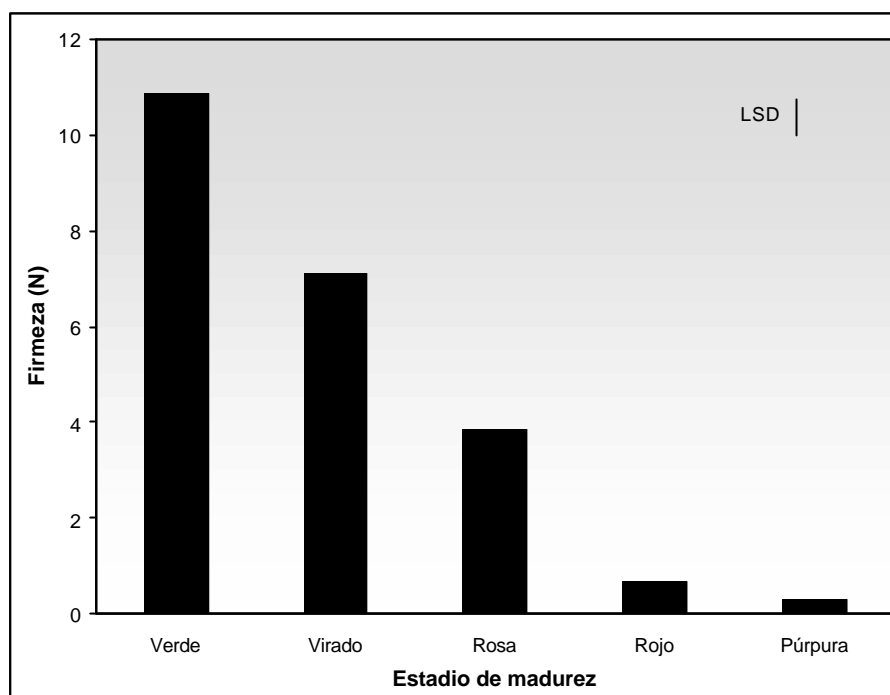
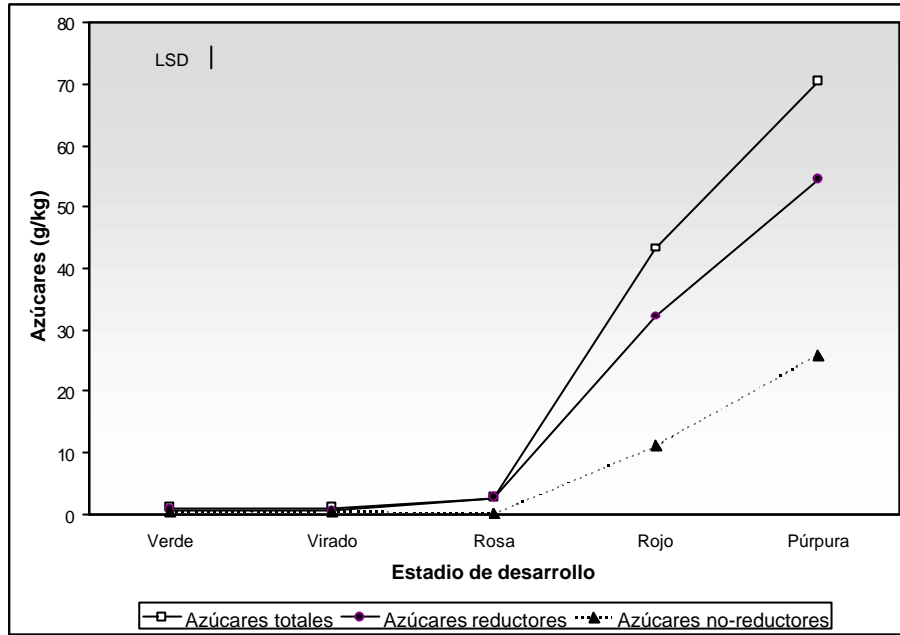


Figura V.6: Firmeza de boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.1.2. Azúcares, pH, acidez, antioxidantes y fenoles totales

El contenido de azúcares totales mostró niveles muy bajos en los estadios verde, virado y rosa (1,0; 1,0; y 2,6 g kg⁻¹ respectivamente) y se incrementó marcadamente hacia el estadio rojo (Figura V.7). La acumulación de azúcares continuó conforme progresó el proceso de maduración, alcanzando un valor de 70,5 g kg⁻¹ de azúcares totales en el estadio púrpura. Estos niveles de azúcares son intermedios entre los descritos por Monro y Lee (1987) y Plowman (1991). No obstante, los cambios en el contenido de azúcares totales son diferentes de los hallados por Monro y Lee (1987) quienes encontraron una reducción en el contenido de azúcares en los últimos estadios de la maduración de boysenberry. El incremento encontrado en el presente trabajo en el contenido de azúcares hasta la finalización del proceso de maduración elimina la posibilidad de una cosecha temprana (aún en el estadio rojo) como estrategia para la extensión de la vida postcosecha de boysenberry ya que las características organolépticas se verían notablemente afectadas.

El incremento en el contenido de azúcares se atribuyó no sólo a mayores niveles de azúcares reductores en los últimos estadios sino también a una acumulación en el contenido de azúcares no-reductores (Figura V.7).



Figural V.7: Azúcares boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

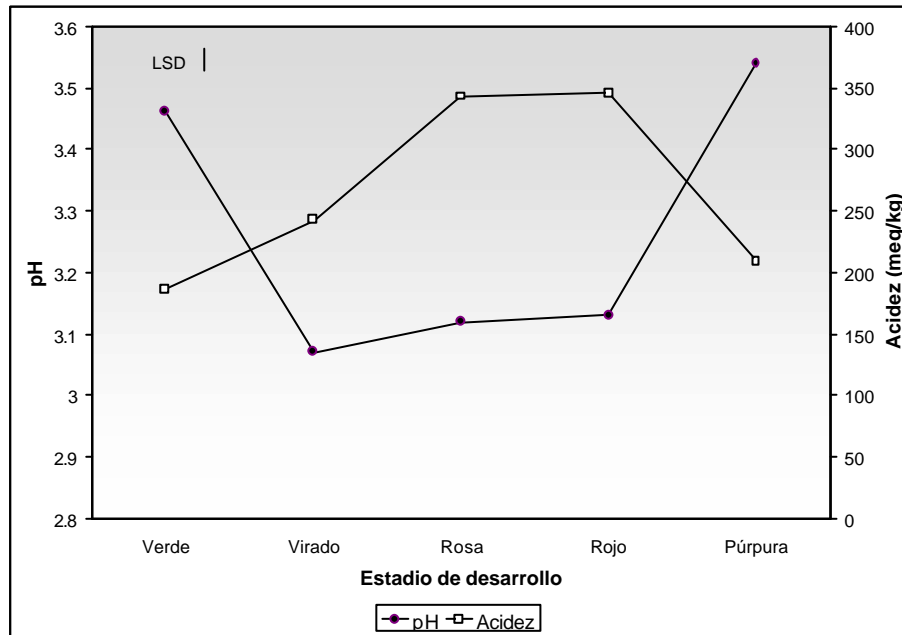


Figura V.8: Acidez y pH en boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Los azúcares no-reductores representaron un 35% de los azúcares totales en los frutos completamente maduros. Diferentes resultados fueron hallados por Plowman (1991), quién encontró que la sacarosa sólo representaba un 10% en boysenberries maduros. Valores cercanos al 25-30% son más comunes en frambuesas que en zarzamoras (Plowman, 1991).

En el caso de la acidez, los menores niveles ($186,4 \text{ meq. kg}^{-1}$) se encontraron en los frutos verdes (Figura V.8). En los frutos virados y rosados la acidez se incrementó a valores de $242,4$ y $342,7 \text{ meq. kg}^{-1}$, respectivamente. Finalmente, en el estadio púrpura la acidez disminuyó a valores de $208,8 \text{ meq. kg}^{-1}$. Los resultados encontrados en frutos en estado de desarrollo intermedio son similares a los encontrados por Monro y Lee (1987) y Plowman (1991). No obstante, en este estudio se encontraron menores niveles de acidez en los frutos verdes y púrpuras que los hallados por Monro y Lee, (1987). El pH de los frutos alcanzó los valores más elevados en los frutos verdes y púrpuras ($3,46$ y $3,54$) y menores niveles en los frutos virados, rosados y rojos (Figura V.8).

El contenido de fenoles totales fue más elevado en frutos verdes y virados ($3,57$ y $3,40 \text{ mg g}^{-1}$) (Tabla V.2). En los estadios rosado y rojo se encontró una reducción en el contenido de fenoles totales. La presencia de altos niveles de compuestos fenólicos es común en frutos jóvenes (Hyodo, 1971) y la reducción durante el proceso de maduración ha sido descrita en otros frutos blandos (Cheng y Breen, 1991). En el estadio púrpura el contenido de fenoles totales aumentó, pero los niveles encontrados fueron menores que en el caso de frutos verdes. Este incremento podría estar asociado con el aumento de antocianinas que podría compensar la disminución de fenoles simples.

Tabla V.2: Fenoles totales y capacidad antioxidante en boysenberries durante el desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) al 0,05.

ESTADIO DE DESARROLLO						
	Verde	Virado	Rosa	Rojo	Púrpura	LSD
Fenoles totales (g kg^{-1})	3,57	3,4	2,54	2,49	3,01	0,28
Antioxidantes EC_{50}^{-1} (mg^{-1})	580	561	343	398	409	58

La capacidad antioxidante de los frutos presentó una tendencia similar a la observada en los niveles de fenoles (Tabla V.2). Este resultado, junto con la baja velocidad encontrada en las cinéticas entre el radical DPPH• y los extractos (datos no mostrados), sugiere que los fenoles son uno de los antioxidantes presentes en boysenberries (Brand Williams y col., 1995).

3.1.3. Color superficial, antocianinas, clorofilas y enzimas asociadas a su degradación

Durante el desarrollo de los frutos se observó una reducción en su luminosidad (L^*) y en el ángulo hue (Tabla V.3). Los niveles de antocianinas fueron muy bajos durante los dos primeros estadios pero se incrementaron más de 10 veces en los frutos virados y rosas (Tabla V.4). Posteriormente las antocianinas continuaron aumentando y se hallaron valores de 321,3 y 1462,1 mg de cianidín-glucósido en los estadios rojo y púrpura respectivamente. Estos valores son similares a los descritos en frambuesas (Torre y Barrit, 1977).

Tabla V.3: Color superficial ($^{\circ}$ hue) y luminosidad (L^*) en boysenberries durante el desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) al 0,05.

ESTADÍO DE DESARROLLO						
	Verde	Virado	Rosa	Rojo	Púrpura	LSD
Luminosidad (L^*)	52,85	50,21	41,70	29,78	20,12	2,41
Color ($^{\circ}$hue)	115,3	95,74	35,37	23,16	15,11	3,82

En el caso de la clorofila, se encontraron 112,7 mg kg⁻¹ en los frutos verdes (Tabla V.4), siendo estos valores superiores a los medidos en otros frutos blandos (Cheng y Breen., 1991). Luego el contenido de clorofila disminuyó a 72 y 35 mg kg⁻¹ en los frutos virados y rosados respectivamente. La mayor tasa de degradación de clorofila se observó entre los estadios verde y rosado, encontrándose sólo trazas en los frutos rojos y púrpuras. La relación de clorofila a: clorofila b fue cercana a 1,5 en los frutos verdes y virados, lo que coincide con lo descrito para frutillas verdes y blancas (Costa y col., 2002).

Tabla V.4: Antocianinas y clorofila en boysenberries durante el desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) al 0,05.

ESTADIO DE DESARROLLO						
	Verde	Virado	Rosa	Rojo	Púrpura	LSD
Antocianinas (g kg⁻¹)	10,3	15,9	177,1	321,3	1462,1	47,3
Clorofila total (mg kg⁻¹)	112,7	72,8	35,4	13,6	13,6	10,1
Clorofila a (mg kg⁻¹)	67,2	43,5	27,6	10,7	7,5	6,6
Clorofila b (mg kg⁻¹)	45,4	29,2	7,8	2,9	6,1	4,1

Cuando se analizaron las enzimas asociadas a la degradación de clorofila, se encontró que la actividad clorofilasa (Figura V.9) y MDS (Figura V.10) presentaron mayor actividad en los frutos verdes y virados. Posteriormente, la actividad de ambas enzimas disminuyó pero se visualizó un aumento en los frutos púrpuras. Incrementos en la actividad MDS han sido mencionados en los últimos estadios de desarrollo de frutillas (Costa y col., 2002). A pesar de que este incremento fue menor en boysenberry que el descrito para frutillas, el resultado es llamativo ya que el nivel de clorofilas luego del estadio rosado es extremadamente bajo. Es conocido que las actividades de clorofilasa y MDS aumentan en respuesta al etileno. Por otra parte, ha sido descrito que la producción de etileno, si bien es baja, aumenta en boysenberry en los últimos estadios, por lo que el aumento de actividad enzimática hallado podría estar asociado con respuestas a la mayor producción de etileno de los frutos. Asimismo, resulta interesante comprender aspectos vinculados a la regulación de estas enzimas en frutos no climatéricos en los primeros estadios de desarrollo.

En el caso de clorofila peroxidasa, los mayores niveles de actividad se encontraron en frutos verdes. La actividad disminuyó en el estadio rosado y luego no se observaron cambios (Figura V.11). Los resultados encontrados en el proceso de degradación de clorofila en boysenberries muestran un patrón similar al hallado en el caso de frutillas (Civello y col., 1995; Costa y col., 2002; Martínez y col., 1996).

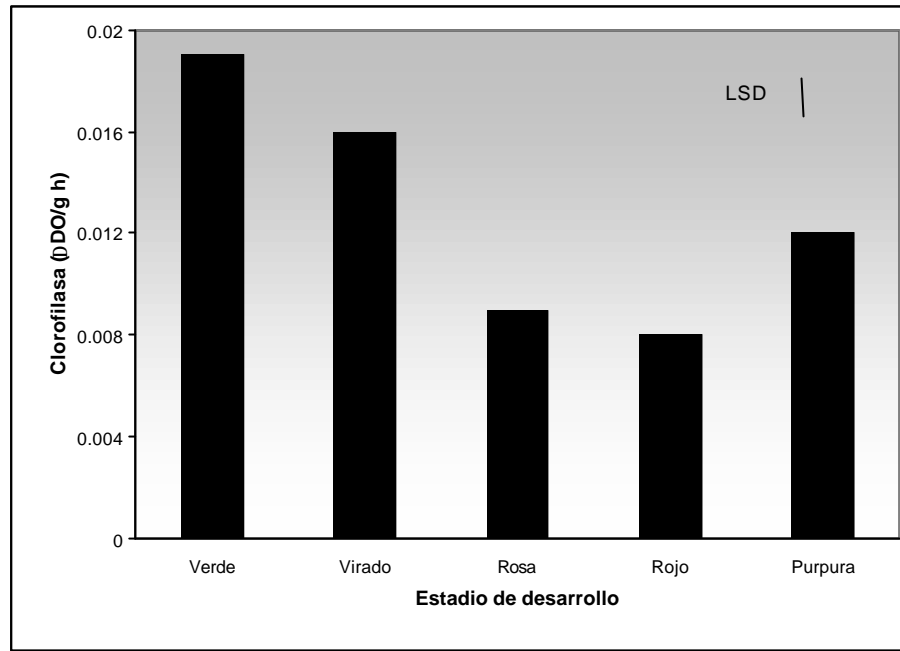


Figura V.9: Actividad clorofilasa en boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

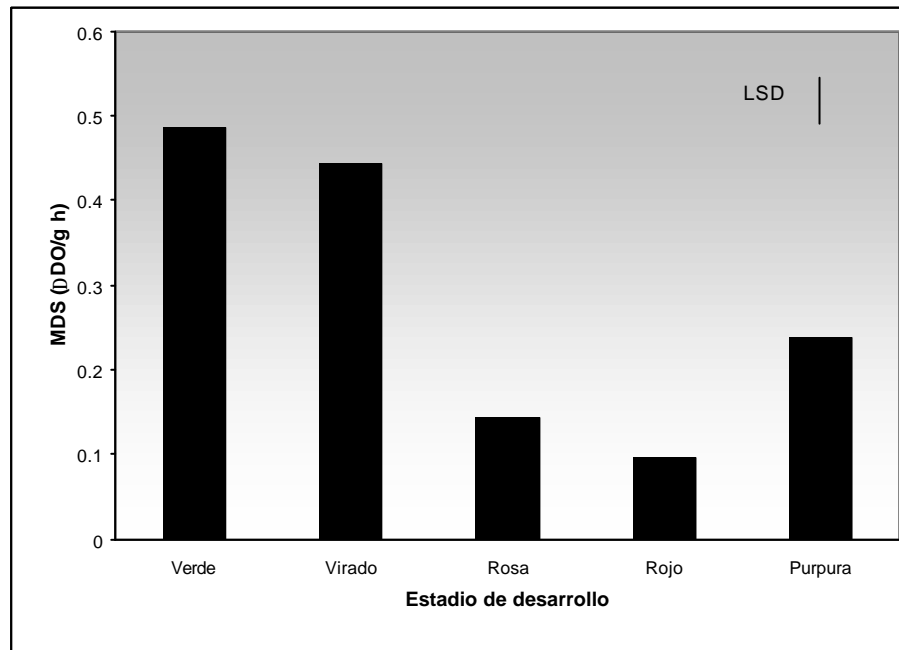


Figura V.10: Actividad Mg-dequelatasa en boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

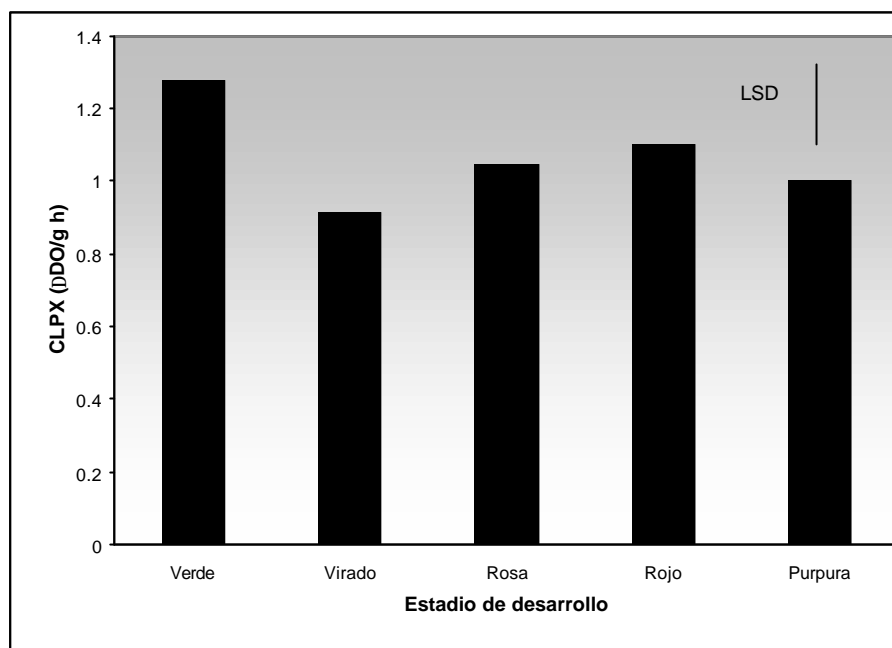


Figura V.11: Actividad clorofila peroxidasa en boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.1.4. Enzimas asociadas a la degradación de pared celular

La participación de enzimas de degradación de paredes celulares y su participación en el proceso de ablandamiento ha sido estudiada en numerosos frutos (Fisher y Bennett, 1991). No obstante, los cambios durante el proceso de maduración de boysenberries no han sido documentados (Stewart y col, 2000).

Los resultados encontrados muestran que la actividad EGasa (Figura V.12), β -gal (Tabla V.6) y PG (Figura V.13) es baja en los estadios verde virado y rosado. Entre los estadios rosado y rojo las actividades β -gal y PG se duplican, mientras que la actividad EGasa aumenta cuatro veces. Finalmente, en el estadio púrpura las actividades PG, β -gal y EGasa aumentan un 25, 350 y 100% respectivamente. lanetta y col. (1999) y Burdon y Sexton (1993) informaron un incremento en la actividad de estas enzimas durante la maduración de frambuesas. Aumentos en la actividad EGasa han sido descritos también en el caso de otros berries como zarzamoras (Abeles y Takeda, 1989) y frutillas (Abeles y Takeda, 1990; Harpster y col., 1998).

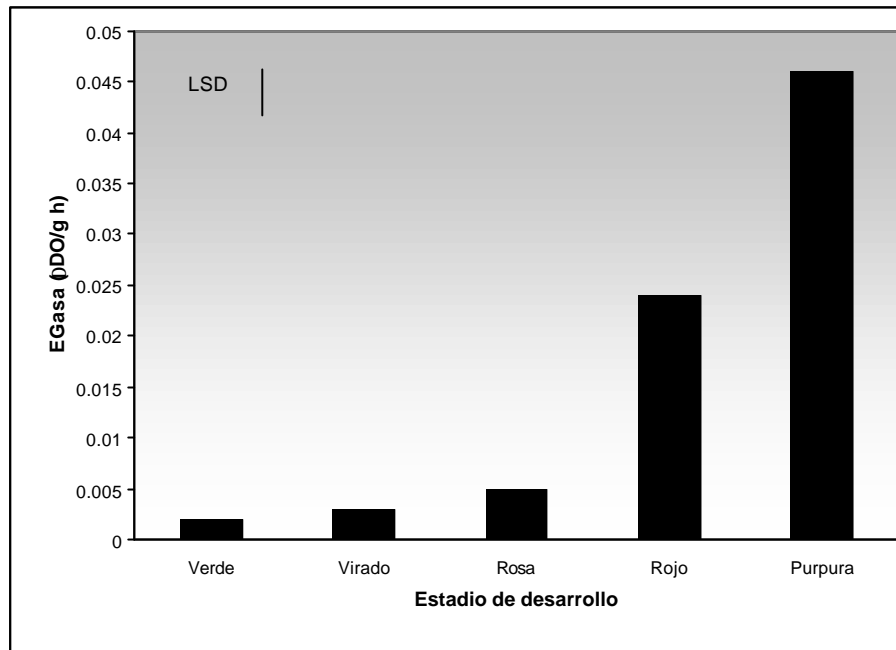


Figura V.12: Actividad endo *b*-1,4-endoglucanasa en boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

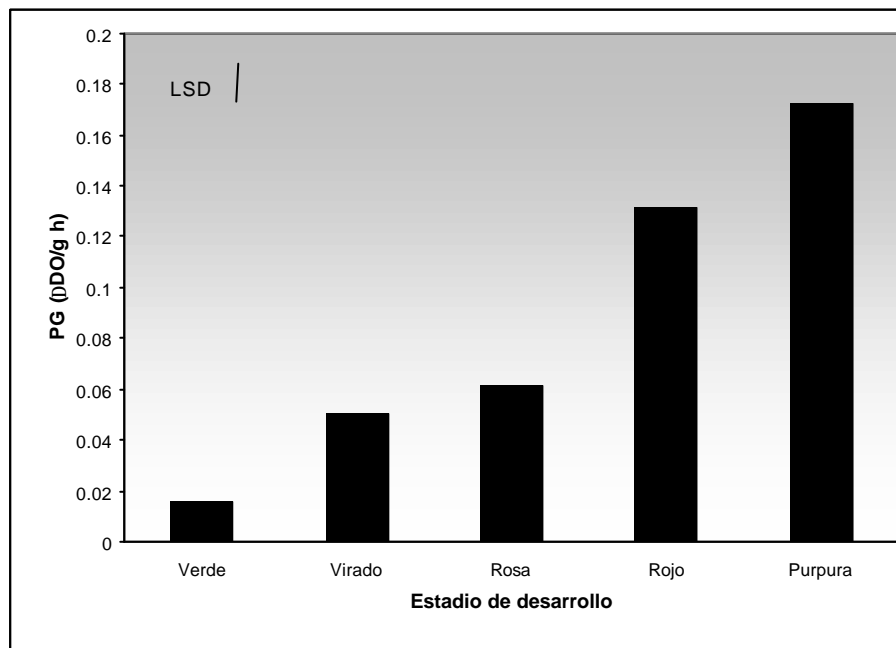


Figura V.13: Actividad poligalacturonasa en boysenberries en diferentes estadios de desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Tabla V.5: Actividad *b*-galactosidasa y pectin metilesterasa en boysenberries durante el desarrollo. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) al 0,05.

ESTADIO DE DESARROLLO						
	Verde	Virado	Rosa	Rojo	Púrpura	LSD
<i>b</i>-gal (DDO g⁻¹ h⁻¹)	0,218	0,229	0,209	0,422	1,400	0,081
PME (DDO g⁻¹ h⁻¹)	0,739	0,891	1,384	1,308	1,032	0,174

Por último, en el caso de PME se encontró un incremento desde el estadio verde al rosado y luego un descenso hasta el final de la maduración (Tabla V.5). Diferentes resultados fueron descritos por Iannetta y col. (1999), quienes encontraron un incremento sostenido de PME a lo largo del proceso de maduración.

3.2. Efecto de TAT sobre calidad y vida postcosecha de boysenberries

3.2.1. Selección de tratamientos

Luego de 2 d de incubación a 20°C se encontraron 7,15 drupeolas dañadas por fruto en los controles (Figura V.14).

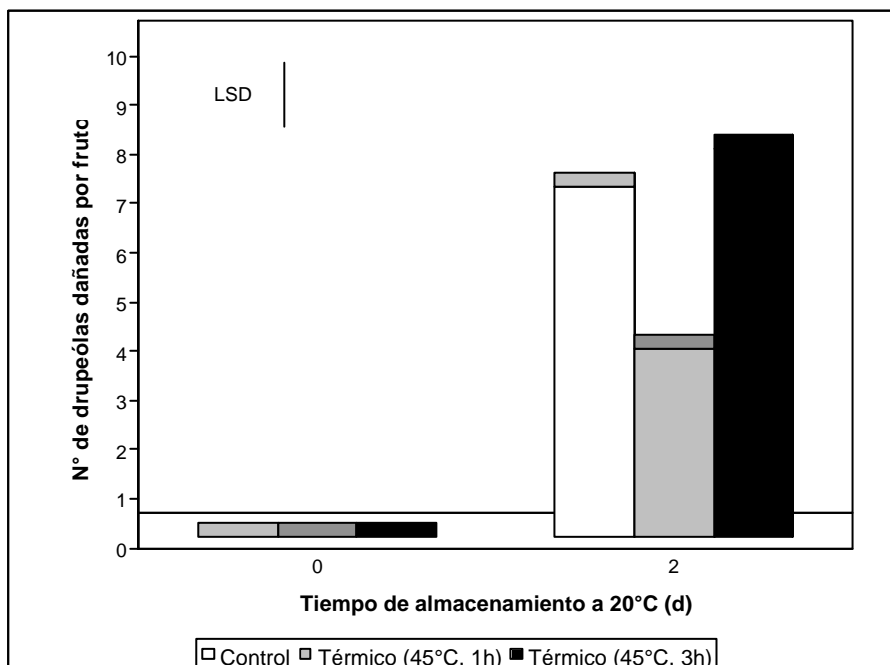


Figura V.14: Efecto de diferentes tratamientos térmicos de alta temperatura sobre el daño en boysenberries. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

A diferencia de lo observado en el caso de frutillas (Capítulo I), no se observaron diferencias significativas en el número de drupeolas dañadas respecto a los controles cuando se realizaron tratamientos térmicos a 45°C por 3 h. Las diferencias podrían explicarse teniendo en cuenta que los boysenberries son frutos aún más delicados que frutillas, por lo que se dañarían con este tipo de tratamiento. Tratamientos a 42°C por 1 ó 3 h tampoco lograron reducir el daño de los frutos (datos no mostrados), pero cuando se realizaron tratamientos a 45°C por 1 h, los frutos mostraron un menor número de drupeolas dañadas que los controles luego de 2 d a 20°C.

Cuando se analizó la firmeza se observó que el tratamiento térmico a 45°C por 1 h resultó la mejor condición (Figura V.15), manteniendo niveles de firmeza más elevados que los controles luego de 2 d a 20°C. Por lo tanto, éste fue el tratamiento utilizado para los experimentos donde se combinaron los tratamientos térmicos con almacenamiento a 0°C y 20°C.

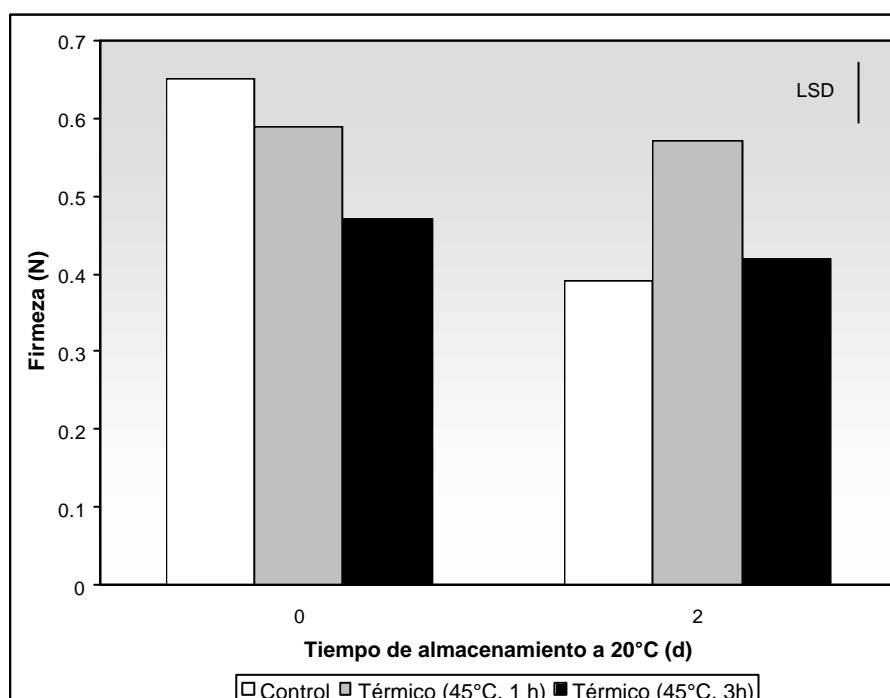


Figura V.15: Efecto de diferentes tratamientos térmicos de alta temperatura sobre la firmeza de boysenberries. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.2. Combinación de tratamientos térmicos de alta temperatura y almacenamiento a 0 y 20°C

3.2.2.1. Daño de los frutos

Luego de 1 d de almacenamiento 20°C, el número de drupeolas dañadas fue menor en los frutos tratados que en los controles (Figura V.16). La misma tendencia se observó luego de 4 d a 0°C y 1 d a 20°C, presentando los frutos controles 14,2 drupeolas dañadas por fruto y 9,4 los frutos tratados. Considerando el número de frutos que presentaron al menos una drupeola dañada, también se encontraron menores valores en los frutos tratados térmicamente que en los controles. Luego de 1 d a 20°C, 60% de los controles mostraron al menos una drupeola dañada, mientras que este valor fue de 35% para los frutos tratados térmicamente (datos no mostrados).

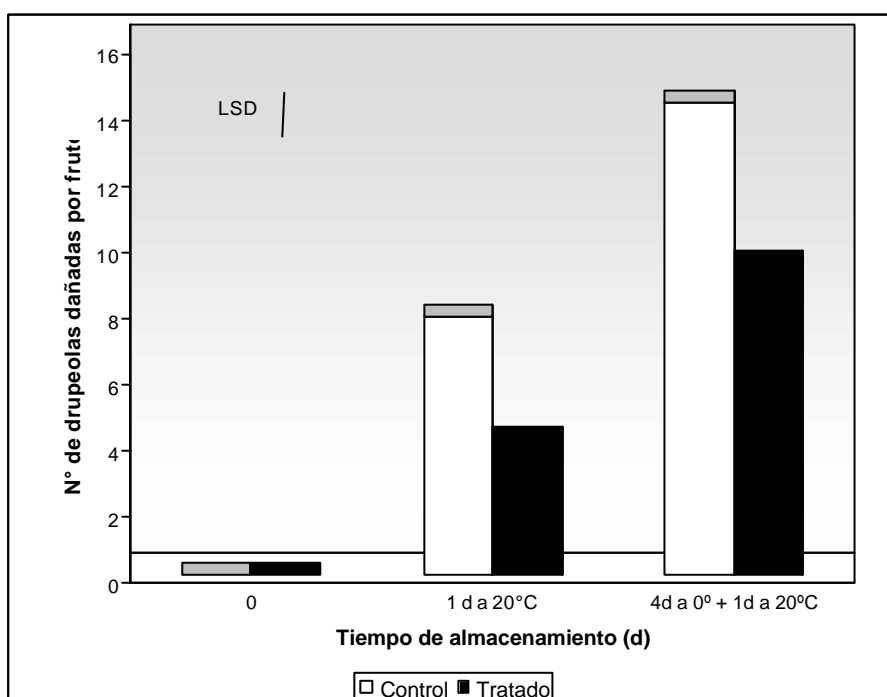


Figura V.16: Daño en boysenberries controles y tratados térmicamente (45°C, 1h) y almacenados a 0° y 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Por otra parte, la pérdida de antocianinas (un indicador del daño de tejidos) se incrementó durante el almacenamiento, siendo mayor en el caso de los frutos controles (Figura V.17). Luego de 1 d a 20°C, los frutos tratados presentaron una menor pérdida de antocianinas que los controles. La misma tendencia se observó luego de 4 d a 0°C y 1 d a 20°C. Estos resultados indican que los tratamientos térmicos permitieron reducir el daño postcosecha de los frutos.

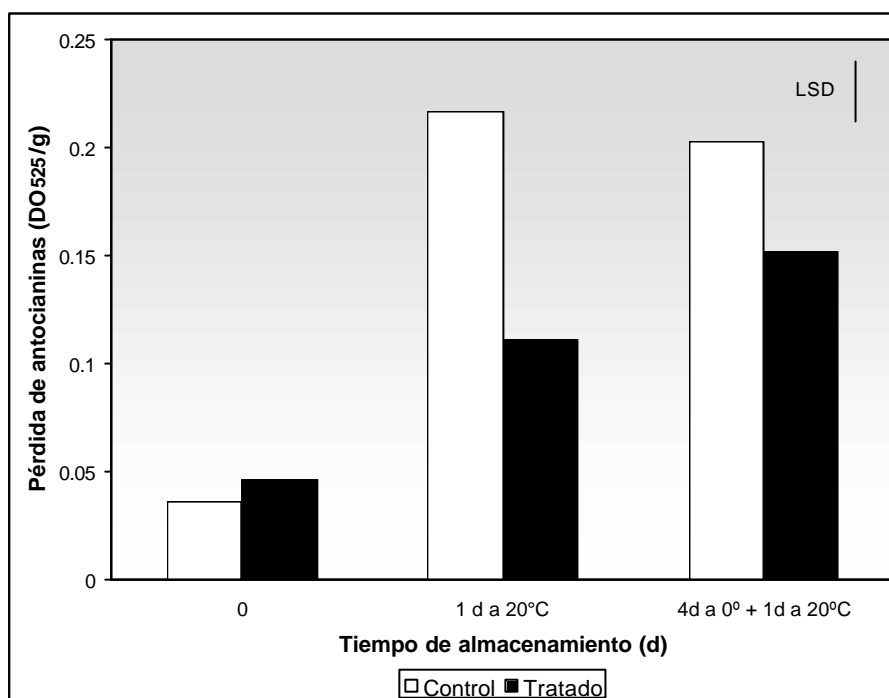


Figura V.17: Pérdida de antocianinas en boysenberries controles y tratados térmicamente (45°C, 1h) y almacenados a 0° y 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

Con respecto a la tasa respiratoria, se observó un incremento durante el almacenamiento (Figura V.18). Esto podría estar asociado con respuestas al daño que tuvieron lugar a medida que los frutos se deterioraron. Inmediatamente luego del tratamiento, los frutos tratados presentaron una menor actividad respiratoria que los controles. Cuando los frutos se almacenaron a 20°C por 1 d ó 4 d a 0°C y 1 d a 20°C, los frutos tratados también mantuvieron una menor tasa respiratoria que los controles, sugiriendo un menor deterioro y disrupción de tejidos. Los resultados hallados son coincidentes con los observados en el caso de frutillas (Capítulo III). Existen numerosos trabajos que documentan la reducción del deterioro y ataque de patógenos por la aplicación de tratamientos térmicos de postcosecha (Lurie, 1998).

Este efecto parecería estar mediado por diferentes procesos, incluyendo la inactivación de patógenos (Falik, 1995), la producción de fitoalexinas (Ben Yehoshua y col., 1992), la inducción de enzimas de defensa como peroxidasa (Lurie, 1997a), quitinasas y glucanasas (Schirra y col., 2000) o el retraso de la degradación de paredes celulares (Paull y Chen, 2000).

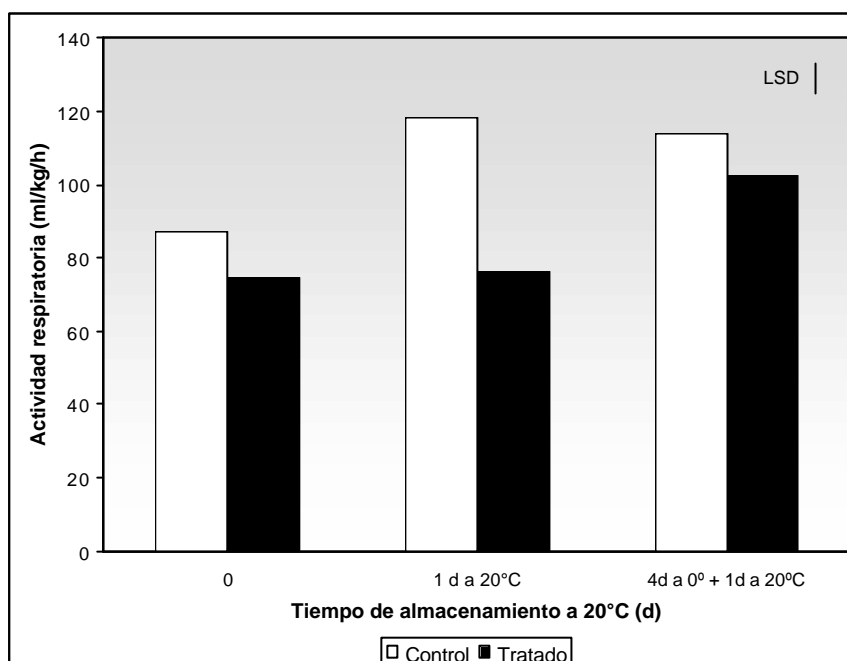


Figura V.18: Actividad respiratoria en boysenberries controles y tratados térmicamente (45°C, 1h) y almacenados a 0° y 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.2.2. Firmeza

Los valores de firmeza inmediatamente luego de la cosecha fueron de 0,56 N (Figura V.18), observándose una disminución durante el período de almacenamiento. Luego de 1 d a 20°C, la firmeza disminuyó en los controles a 0,43 N mientras que no se observaron cambios en los frutos tratados térmicamente. Cuando se realizó el almacenamiento a 0°C por 4 d y 1 d a 20°C, nuevamente los frutos tratados se mantuvieron más firmes que los controles. Los resultados encontrados son coincidentes con los mostrados en el Capítulo I en frutillas, donde se observó un retraso en el proceso de ablandamiento debido a la aplicación de un tratamiento térmico. Al igual que en frutillas, es posible que el tratamiento haya afectado el

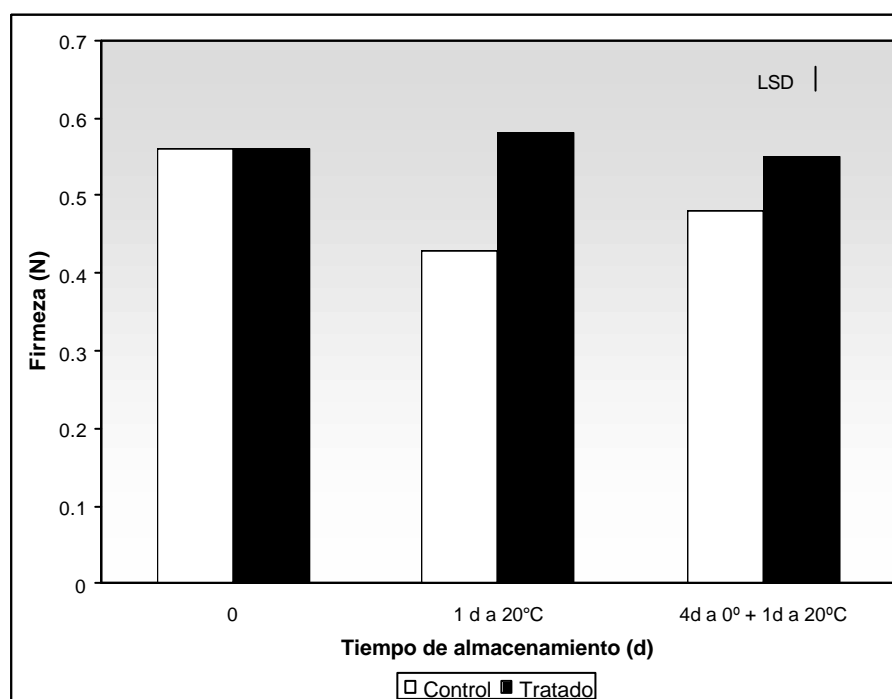
desensamblaje de la pared celular del fruto. Sin embargo, es necesario realizar un estudio análogo al realizado en frutilla para probar esta hipótesis. Considerando que la elevada tasa de ablandamiento es uno de los principales factores que afecta la vida postcosecha de boysenberries, resulta de interés el hecho de contar con tratamientos de postcosecha que permitan retrasarlo.

3.2.2.3. Azúcares, pH y acidez titulable

El contenido de azúcares disminuyó durante el almacenamiento y no se encontraron diferencias entre frutos controles y tratados (Tabla V.6).

En el caso de la acidez se observó también una disminución durante el período de almacenamiento (Tabla V.6). Luego de 1 d a 20°C los frutos controles presentaron menor acidez que los tratados térmicamente. No obstante, cuando los frutos se almacenaron a 0°C por 4 d y 1 d a 20°C no se encontraron diferencias significativas.

Cuando se analizó el pH de los frutos, se observó un incremento durante el almacenamiento. Luego de 1 d a 20°C el pH de los controles fue superior al de los tratados, pero las diferencias desaparecieron cuando los frutos se almacenaron a 0°C y luego se transfirieron a 20°C (Tabla V.6).



Figural V.18: Firmeza en boysenberries controles y tratados térmicamente (45°C, 1h) y almacenados a 0° y 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.4. Color superficial y antocianinas

Los frutos tratados no presentaron diferencias con los controles en la evolución del color superficial (datos no mostrados). En el caso del contenido de antocianinas se observó un incremento del 20% en todos los tratamientos, no encontrándose diferencias significativas (Tabla V.6).

Tabla V.6: Acidez titulable, pH, azúcares y contenido de antocianinas en frutos controles y tratados térmicamente (45°C, 1 h) durante el almacenamiento a 0°C y posterior transferencia a 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) al 0,05.

		TIEMPO DE ALMACENAMIENTO			
		0	1 d a 20°C	4 d a 0°C + 1 d a 20°C	LSD
Acidez (meq. kg⁻¹)	Control Tratado	212,02	178,52 214,87	180,37 173,87	20
pH	Control Tratado	3,33	3,52 3,42	3,65 3,59	0,08
Azúcares (g kg⁻¹)	Control Tratado	48,8	42,4 45,8	37,9 40,1	2,4
Antocianinas (DO₅₂₅)	Control Tratado	3,13	3,81 3,71	3,26 3,43	0,27

3.2.2.5. Antioxidantes

La capacidad antioxidante de los frutos disminuyó durante el almacenamiento. Este descenso fue más marcado en el caso de los frutos sin tratamiento térmico, que luego de 1 d a 20°C presentaron menor capacidad antioxidante que los frutos tratados térmicamente. Después de 4 d a 0°C y 1 d a 20°C ó 4 d a 0° y 1 d a 20°C no se observaron diferencias (Figura V.19).

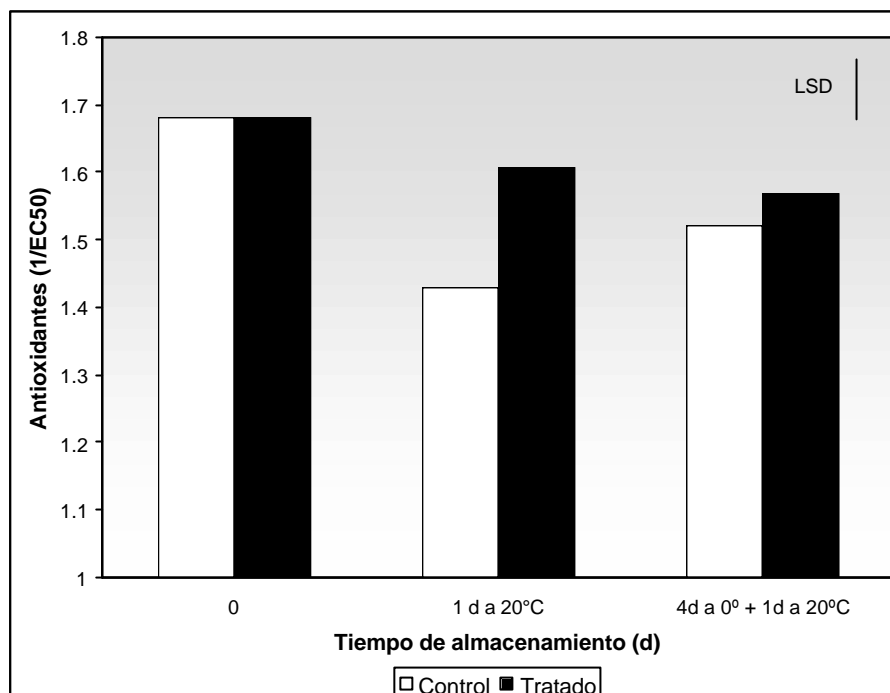


Figura V.19: Capacidad antioxidante en boysenberries controles y tratados térmicamente (45°C, 1h) y almacenados a 0° y 20°C. Se muestra la diferencia mínima significativa (LSD) a un nivel de significancia de 0,05.

3.2.2.6. Pérdida de peso

Los tratamientos provocaron una pérdida de peso cercana al 1%. No obstante, durante el almacenamiento la pérdida de peso fue mayor en los frutos controles y luego de 1 d a 20°C ó 4 d a 0° y 1 d a 20°C la pérdida de peso fue similar en los frutos controles y tratados (datos no mostrados).

4. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permitieron realizar una caracterización del proceso de desarrollo y maduración de boysenberries y realizaron un aporte al conocimiento de la maduración de este fruto poco estudiado. El ablandamiento de los frutos tiene lugar en forma sostenida a lo largo del proceso de maduración, lo que correlaciona con marcados incrementos en la actividad de enzimas asociadas a la degradación de pared celular como EGasa, PG y β -gal. En el caso de PME se observa una mayor actividad en estadios intermedios de desarrollo. Por otra parte, se determinaron los cambios en el contenido de antocianinas y se realizó una caracterización del proceso de degradación de clorofilas, pudiéndose determinar la actividad de clorofila peroxidasa, Mg dequelatasa y clorofilasa, las cuales no se encontraban trabajos previos en boysenberries, resultando los patrones obtenidos similares a los descritos en otros frutos blandos como frutillas. Los resultados encontrados en el aumento de peso de los frutos durante el desarrollo así como en la evolución del contenido de azúcares, permiten concluir que la realización de una cosecha anticipada en el caso de boysenberries (aún en el estado rojo) como estrategia de extensión de su vida postcosecha no resulta conveniente, ya que determinaría una reducción de la cantidad (menor tamaño de frutos) y calidad (mayor acidez y menor contenido de azúcares) de fruta comercializable. Por último, se seleccionó un tratamiento térmico adecuado para boysenberries (45°C, 1h) que redujo el daño de los frutos y el ablandamiento. Los tratamientos provocaron menores cambios en el contenido de azúcares y acidez y mantuvieron un mayor poder antioxidante que los controles. Los resultados sugieren que la combinación de TAT y almacenamiento refrigerado podría ser una alternativa no química para extender la vida postcosecha de boysenberries.

Conclusiones finales

La realización del presente trabajo de tesis doctoral permitió seleccionar un tratamiento térmico de alta temperatura (TAT) adecuado para frutillas (45°C, 3 h con aire) y evaluar el efecto de dichos tratamientos sobre la calidad y vida postcosecha de un fruto altamente perecedero como frutilla. Los tratamientos provocan un retraso en la maduración disminuyendo el ablandamiento y reducen significativamente el ataque de patógenos. Por otra parte, la realización de TAT en presencia de películas con permeabilidad selectiva podría extender los efectos residuales de los tratamientos debido a la retención parcial del CO₂ producido por la actividad respiratoria de los frutos en un corto período.

Se analizó además el efecto de los TAT sobre frutos no-climatéricos donde la información existente no es abundante, analizándose el proceso de ablandamiento y ataque de patógenos, principales problemas de postcosecha de frutillas. Los TAT retrasan el ablandamiento en la zona interna y externa del receptáculo y provocan una reducción en la actividad endo-1,4-β-D-glucanasa y β-xilosidasa y disminuyendo la degradación de hemicelulosas. Las actividades de poligalacturonasa y β-galactosidasa también son reducidas por los tratamientos, provocando un retraso en la solubilización de pectinas. Por otra parte, PME es incrementada lo que podría generar un mayor número de sitios putativos para la formación de puentes de calcio y contribuir a retrasar el desensamblaje de los compuestos pécticos.

La reducción en la incidencia de enfermedades en los frutos tratados térmicamente resultaría de la coexistencia de efectos directos e indirectos. Los TAT afectan directamente a los hongos al reducir la velocidad de germinación de conidios de *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*. Se observan además efectos indirectos mediados por cambios en la fisiología de los frutos como consecuencia de los tratamientos: aumento en la actividad PPO, retraso en la degradación de las paredes celulares e incremento en la protección contra especies reactivas del oxígeno. Resulta además de interés mencionar que durante el TAT se produce un marcado incremento en los niveles de ácido salicílico cuya participación en la señalización de respuestas de defensa en plantas es aceptada. Finalmente se evaluó el efecto de la aplicación de TAT en boysenberries, frutos aún más perecederos que la frutilla, observándose que la combinación de TAT (45°C, 1h) y almacenamiento refrigerado podría ser también de utilidad. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral muestran que la combinación de los tratamientos térmicos de alta temperatura con refrigeración podría ser una estrategia no química beneficiosa para mantener la calidad y extender la vida postcosecha de las frutillas y los boysenberries.

Resulta de interés desde el punto de vista tecnológico procurar avanzar con trabajos a escala comercial para poder lograr su transferencia. Por último, aún persisten interrogantes respecto a algunas respuestas de los frutos ante condiciones de estrés moderadas y resultan necesarios más trabajos a fin de evaluar la posibilidad de la utilización de los tratamientos térmicos de alta temperatura como una estrategia de aclimatación a situaciones de estrés más severas, comunes durante el almacenamiento postcosecha de productos frutihortícolas.

Referencias

Abeles, F.B., Takeda, F., 1989. Increased cellulase activity during blackberry ripening. Hort Science 24, 851-852.

Abeles, F.B., Takeda, F., 1990. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. Scientia Horticulturae 42, 269-275.

Agar, T., García, J.M., Streif, J., 1990. Effect of high CO₂ and low O₂ concentration on the growth of *Botrytis cinerea* at different temperatures. Gartenbauwissenschaft 55, 219-222.

Agrios, G.N., 1999. Fitopatología. Editorial Limusa. México.

Aharoni, A., Keizer, L.C., Van Den Broeck, H.C., Blanco-Portales, R., Munoz-Blanco, J., Bois, G., Smit, P., De Vos, R.C., O'Connell, A.P., 2002. Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. Plant Physiol. 129, 1019-1031.

Ahmed, A.E.R., Labavitch, J.M., 1980. Cell wall metabolism in ripening fruit II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening "Bartlett" pears, Plant Physiol. 65, 1014-1016.

Allen, R., 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiol. 107, 1049-1054.

Almeida, D.P.F., Huber, D.J., 1999. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. Physiol. Plant. 105, 506-512.

AOAC, 1980. Methods of Analysis, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

APHIS, 1998. Plant protection and quarantine manual. Animal and Plant Health Inspection Service. USDA, Hyattsville.

Archbold, D.D., Dennis, F.G., 1984. Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109, 330-335.

Armstrong, J., Hu, B., Brown, S., 1995. Single-temperature forced hot-air quarantine treatment to control fruit flies (Diptera: Tephritidae) in papaya. *J. Econ. Entomol.* 88, 678-682.

Asada, K., 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Eds, *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 77-104.

Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639.

Aydiushko, S.A., Ye, X.S., Kuc, J., 1993. Detection of several enzymatic activities in leaf prints cucumber plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42, 441-454.

Baka, M., Mercier, J., Corcuff, F., Castaigne., F., Arul, J., 1999. Photochemical treatment to improve storability of fresh strawberries. *J. Food Sci.* 64, 1068-1072.

Baker, A.G., 1952. The vapor-heat process. *USDA Yearbook*, U.S. Gov. Print. Off., Wash. DC.

Baker, J.E., 1976. Superoxide dismutase in ripening fruits. *Plant Physiol.* 58, 644-647.

Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S.P., 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276, 726-733.

Barkai-Golan, R., Phillips, D.J., 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Dis.* 75, 1085-1089.

Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Pellerin, P., 2000. Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 289-300.

Barnes, M.F., Patchett, B.J., 1976. Cell wall degrading enzymes and the softening of senescent strawberry fruit. *J. Food Sci.* 41, 1392-1395.

Baron-Epel, O., Gharyal, P.K., Schindler, M., 1988. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175, 389-395.

Beaudry, R.M., 1999. Effect of O₂ and CO₂ partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharv. Biol. Technol.* 15, 293-303.

Beldman, G., Schols, H.A., Pitson, S.M., Searle-van Leeuwen, M.J.F., Voragen, A.G.J., 1997. Arabinans and arabinan degrading enzymes. In R.J. Sturgeon, ed. *Advances in Macromolecular Carbohydrate Research*, Vol. 1. Jai Press, Greenwich, CT, pp 1-64.

Ben Shalom, N., Hanzon, J., Klein, J., Lurie, S., 1993. A postharvest heat treatment inhibits cell wall degradation in apples during storage. *Phytochemistry* 34, 955-958.

Ben-Yehoshua, S., Barak, S., Shapiro, B., 1987. Postharvest curing at high temperature reduces decay of individual sealed lemons, pomelos, and other citrus fruits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112, 658-663.

Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J.J., Carmeli, S., 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1217-1221.

Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D.Q., Kim, J.J., 1995. Preformed antifungal compounds of citrus fruit: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1062-1066.

Biggs, M.S., Woodson, W.R., Handa, A.K., 1988. Biochemical basis of high-temperature inhibition of ethylene biosynthesis in ripening tomato fruits. *Physiol. Plant.* 72, 572-578.

Biles, C.L, Martin, R.D., 1993. Peroxidase polyphenol oxidase and shikimate dehydrogenase isoenzymes in relation to tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 31, 499-506.

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484-489.

Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A., 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant. Physiol.* 126, 1024-1030.

Bowler, C., Montagu, M.V., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116.

Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J., 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline rich plant cell wall protein: a novel, rapid defence response. *Cell* 70, 21-30.

Brady, C.J., McGlasson, W.B., Pearson, J.A., Meldrum, S.K., Kopeliovitch, E., 1985. Interactions between the amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium, and firmness in tomato fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110, 254-258.

Brand Williams, W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 28, 25-30.

Branzanti, E.C., 1989. *La Fresa*. Ediciones Mundi-Prensa Madrid.

Brodl, M.R., 1989. Regulation of the synthesis of normal cellular proteins during heat shock. *Physiol. Plant.* 75, 439-443.

Brummell, D.A., Lashbrook, C.C., Bennett, A.B., 1994. Plant endo-1,4- β -D-glucanases: structure, properties and physiological function. In: M.E. Himmel, J.O. Baker and R.P. Overend (Eds.) *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production* (American Chemical Society Symposium Series 566), American Chemical Society, pp. 100-129.

Brummell, D.A., Labavitch, J.M., 1997. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiol.* 115, 717-725.

Brummell, D.A., Harpster, M.H., Civello, P.M., Palys, J.M., Bennett, A.B., Dunsmuir, P., 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11, 2203-2216.

Brummell D.A., Harpster M.H., 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47, 311-340.

Burdon, J.N., Sexton, R., 1993. Fruit abscission and ethylene production of four blackberry cultivars (*Rubus* sp.). *Ann. Appl. Biol.* 123, 121-123.

Burmeister, D.M., Ball, S., Green, S., Woolf, A.B., 1997. Interaction of hot water treatments and controlled atmosphere storage on quality of "Fuyu" persimmons. *Postharv. Biol. Technol.* 12, 71-81.

Carpita, N., Mc Cann, M., 2000. The cell wall. In: *Biochemistry & molecular biology of plants*. Buchanan, Gruissem, Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists. Maryland. USA.

Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3, 1-30.

Chan, H.T., Linse, E., 1989. Conditioning cucumbers for quarantine heat treatments. *HortScience* 24, 985-989.

Chan, H.T., Tam, S.Y.T., Seo, S.T., 1981. Papaya polygalacturonase and its role in thermally injured ripening fruit. *J. Food. Sci.* 46, 190-197.

Chen, Z., Silva, H., Klessig, R.F., 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by SA. *Science* 262, 1883-1886.

Cheng, G.W., Breen, P.J., 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolic compounds in developing strawberry fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116, 865-869.

Chun, J.P., Huber, D.J., 2000. Reduced levels of β -subunit protein influence tomato fruit firmness, cell-wall ultrastructure, and PG2-mediated pectin hydrolysis in excised pericarp tissue. *J. Plant Physiol.* 157, 153-160.

Civello, P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R., Añón, M.C., 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.): partial purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2596-2601.

Civello P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R., Añón, M.C., 1997. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4589-4594.

Civello, P.M., Powell, A.L.T., Sabehat, A., Bennett, A.B., 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* 121, 1273-1279.

Cleenput, G., Hessing, M., Van Oort, M., Deconynck, M., de Cour, J.A., 1997. Purification and characterization of a β -xylosidase and an endo-xylanase from wheat flour. *Plant Physiol.* 113, 377-386.

Conklin, P.L., Williams, E.H., Last, R.L., 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9970-9974.

Conway, W.S., Sams, C.E., Wang, C.Y., Abbott, J.A., 1994. Additive effects of postharvest calcium and heat treatment on reducing decay and maintaining quality in apples. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119, 49-53.

Costa, M.L., Civello, P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R., 2002. Characterization of Mg-dechelatase activity obtained from *Fragaria x ananassa* fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 111-118.

Couey, H.M., Follstad, M.N., 1966. Heat pasteurisation for control of postharvest decay in fresh strawberries. *Phytopathology* 56, 1345-1347.

Couey, H.M., Alvarez, A.M., Nelson, M.G., 1984. Comparison of hot water spray and hot immersion treatments for control of postharvest decay of papaya. *Plant. Dis.* 68, 436-437.

Couey, H.M., 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. *HortScience*. 24, 198-201.

Crookes, P.R., Grierson, D., 1983. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isozymes in cell wall degradation. *Plant Physiol.* 72, 1088-1093.

CSIRO 2000, *Controlled Atmosphere Handbook and Optimal Fresh* (2000). CSIRO Publishing.

d'Amour J., Gosselin C., Arul J., Castaigne F., Willemot C., 1993. Gamma-radiation affects cell wall composition of strawberries. *J. Food Sci.* 58, 182-185.

Darvill, A.G., Albersheim, P., 1984. Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 243-275.

Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., Scott, I.M., 1998. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 116, 1351-1357.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernoij, B., Friedrich, L., Weyman, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J., 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.

Dixon, R.A., 2001. Natural products and disease resistance. *Nature* 411, 843-847.

Durner, D., Klessig, D.F., 1995 Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 11312-11316.

Edlich, W., Lorenz, G., Lyr, H., Nega, E., Pommer, E.H., 1989 New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. Neth. J. Pl. Path. 95, 53-62.

El-Kazzaz, M.K., Sommer, N.F., Fortlage, R.J., 1983. Effect of different atmospheres on postharvest decay and quality of fresh strawberries. Phytopatology 73, 282-287

Espelie, K.E., Franceschi, V.R., Kolattukudy, P.E., 1986. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound healing potato tuber tissue, Plant Physiol. 81, 487-492.

Fallik, E., Klein, J.D., Grinberg, S., Lomaniec, E., Lurie, S., Lalazar, A., 1993. Effect of postharvest heat treatment of tomatoes on fruit ripening and decay caused by *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 77, 985-988.

Fallik, E., 1995. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. Plant pathol. 45, 92-97.

Fallik, E., Aharoni, Y., Yekutieli, O., Wiseblum, A., Regev, R., Beres, H., Bar Lev, E., 1996a. A method for simultaneously cleaning and disinfecting agricultural produce. Israel Patent Application No. 116965.

Fallik, E., Grinberg, S., Alkalai, S., Lurie, S., 1996b. The effectiveness of postharvest hot water dips on the control of gray and black moulds in sweet red pepper (*Capsicum annuum*). Plant Pathol. 45, 644-649.

Fallik, E., Grinberg, S., Gambourg, M., Klein, J.D., Lurie, S., 1996c. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. Plant Pathol. 45, 92-97.

Fallik, E., Aharoni, Y., Copel, A., Rodov, R., Tuvia-Alkalai, S., Horev, B., Yekutieli, O., Wiseblum, A., Regev, R., 2000. A short hot water rinse reduces postharvest losses of Galia melon. Plant Pathol. 49, 333-338.

Fallik, E., 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). Postharv. Biol. Technol. 32, 125-134.

FAOSTAT, 2004. En: <http://apps.fao.org/faostat/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=EN>

Ferguson, I.B., Lurie, S., Bowen, J.H., 1994. Protein synthesis and breakdown during heat shock of cultured pear (*Pyrus communis* L.) cells. *Plant Physiol.* 1994 104, 1429-1437.

Fischer, R.L., Bennett, A.B., 1991. Role of wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 675-703.

Fisher, P., 2003. Berry Production Basics. Ministry of Agriculture and Food. Ontario. In: <http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/facts/berrybasics.htm>

Forney, C.F., Breen, P.J., 1985. Growth of strawberry fruit and sugar uptake of fruit discs at different inflorescence positions. *Sci. Hort.* 27, 55-62.

Furusawa, K., Sugimoto, T., Gaja, T., 1984. The effectiveness of vapor heat treatment against the melon fly *Dacus cucurbitae* Coquillett in eggplant and fruit tolerance to the treatment. *Research Bulletin of the plant protection service, Japan* N° 20, 17-24.

García, J.M., Aguilera, C., Albi, M.A., 1995a. Postharvest heat treatment on Spanish strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Tudla). *J. Agric. Food Chem.* 43, 1489-1492.

García, J.M., Ballesteros, J.M., Albi, M.A., 1995b. Effect of foliar applications of CaCl₂ on tomato stored at different temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 43, 9-12.

Gil, M.I., Holcroft, D.L., Kader, A.A., 1997. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1662-1667.

Given, N.K., Given, H.M., Pringle, R.M., 1986. Boysenberries: preliminary studies on effect of ripening on composition. *New Zeal. J. Exp. Agric.* 14, 319-325.

Given, N. K., Venis, M.A., Grierson, D., 1988a. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *J. Plant Physiol.* 133, 25-30.

Given, N.K., Venis, M.A., Grierson, D., 1988b. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from strawberry fruit and its synthesis during ripening. *J. Plant Physiol.* 133, 31-37.

Given N.K., Venis, M.A., Grierson, D., 1988c. Hormonal regulation of the ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, 174, 402-406.

Gouble, B., Fath, D., Soudain, P., 1995. Nitrous oxide inhibition of ethylene production in ripening and senescing climacteric fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 5, 311-321.

Goujon, T., Minic, Z., El Amrani, A., Lerouxel, O., Aletti, E., Lapierre, C., Joselau, J., Jouanin, L., 2003. AtBXL1, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. *Plant J.* 33, 677-690.

Greve, L.C., Labavitch, J.M., 1991. Cell wall metabolism in ripening fruit. V. Analysis of cell wall synthesis in ripening tomato pericarp tissue using a D-[U-13C] glucose tracer and gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* 97, 1456-1461.

Grondeau, C., Samson, R., 1994. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens: especially seeds from bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 57-75.

Gross, K.C., 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyano-acetamide. *HortScience* 17, 933-934.

Gross, K.C., Sams, C.E., 1984. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* 23, 2457-2461.

Hadfield, K.A., Bennett, A.B., 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiol.* 117, 337-343.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1993. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, pp. 86-187.

Harker, R.F., Redgwell, R.J., Hallett, I.C., Murray, S.H., Carter, G., 1997. Texture of fresh fruit. Hort. Rev. 20, 121-124.

Harker, R.F., Elgar, J.H., Watkins, C.B., Jackson, P.J., Hallett, I.C., 2000. Physical and mechanical changes in strawberry fruit after high carbon dioxide treatments. Postharv. Biol. Technol. 19, 139-146.

Harpster, M.H., Brummell, D.A., Dunsmuir, P., 1998. Expression analysis of a ripening specific, auxin repressed endo-1,4- β -glucanase gene in strawberry fruit. Plant Physiol. 118, 1317-1316.

Harrison, E.P., McQueen-Mason, S.J., Manning, K., 2001. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. J. Exp. Bot. 360, 1437-1446.

Hawkins, L.A., 1932. Sterilization of citrus fruit by heat. Citriculture 9, 7-22.

He, X.Z., Dixon, R.A., 2000. Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances the biosynthesis of 4-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. Plant Cell 12, 1689-1702.

Henrissat, B., Heffron, S.E., Yoder, M.D., Lietzke, S.E., Journak, F., 1995. Functional implication of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. Plant Physiol. 107, 963-976.

Holcroft, D.M., Kader, A.A., 1999. Controlled atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. Postharv. Biol. Technol. 10, 99-105.

Huber, D.J., O'Donoghue, E.M. 1993. Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. Plant Physiol. 102, 473-480.

Huber, D.J., 1984. Strawberry fruit softening: the potential role of polyuronides and hemicelluloses. Journal of Food Sci. 49, 1310-1315.

Huelin, F.E., Coggiola, J.M., 1970a. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. V. Oxidation of α -farnesene and its inhibition by diphenylamine. J. Sci. Food Agric. 21, 44-48.

Huelin, F.E., Coggiola, J.M., 1970b. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. VII. Effect of applied α -farnesene, temperature and diphenylamine on scald and the concentration and oxidation of farnesene in the fruit. J. Sci. Food Agric. 21, 584-589.

Hulme, A.C., 1971. The Biochemistry of Fruits and Their Products, vol II, Academic press, New York.

Hyodo, H., 1971. Phenylalanine ammonia-lyase in strawberry fruits. Plant Cell Physiol. 12, 989-991.

Iannetta, P.P.M., Van den Berg, J., Wheatley, R., Mc Millan, G., Mc Nicoll, R.J., Davies, H.V., 1999. The role of ethylene and cell wall modifying enzymes in raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening. Physiol. Plant. 105, 338-347.

Ismail, M.A., Brown, G.E., 1975. Phenolic content during healing of 'Valencia' orange peel under high humidity. J. Am. Soc. Hort. Sci. 100, 249-251.

Jaeck, E., Dumas, B., Geoy, P., Favet, N., Inze, D., Van Montagu, M., Fritig, B., Legrand, M., 1992. Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of O-methyltransferase mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. Mol. Plant-Microbe Interact. 5, 294-300.

Jarvis, M.C., 1984. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. Plant Cell Envir. 7, 153-164.

Jiménez Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., López-Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiol. 128, 751-759.

Joles, D.W., Cameron, A.G., Shirazi, A., Petracek, P.D., Beaudry, R.M., 1994. Modified atmosphere packaging of Heritage red raspberry fruit: respiratory response to reduced oxygen, enhanced carbon dioxide and temperature. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 119, 545-550.

Jones, D.H., 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry* 23, 1349-1359.

Kader, A.A., 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technol.* 40, 99-104.

Kader, A.A., 1992. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3311: California, USA. 296 pp.

Kader, A.A., Ben-Yehoshua, S., 2000. Effects of superatmospheric oxygen levels on postharvest physiology and quality of fresh fruits and vegetables. *Postharv. Biol. Technol.* 20, 1-13.

Kader, A.A., 2000. Advances in CA/MA applications. *Perishables Handling Quarterly* Issue No. 104, 8-9.

Kahl, G., 1974. Metabolism in plant storage tissue slices. *Bot. Rev.* 40, 263-314.

Kanellis, A.K., Kalaitzis, P., 1992. Cellulase occurs in multiple active forms in ripe avocado fruit mesocarp. *Plant Physiol.* 98, 530-534.

Kang, G., Wang, C., Sun, G., Wang, Z., 2003. Salicylic acid changes activities of H₂O₂-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Env. Exp. Bot.* 50, 9-15.

Ke, D., Saltveit, M.E., 1990. Carbon dioxide induced brown stain development as related to phenolic metabolism in iceberg lettuce. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114, 789-794.

Ke, D., El-Sheikh, T., Mateos, M., Kader, A.A., 1993. Anaerobic metabolism of strawberries under elevated CO₂ and reduced O₂ atmospheres. *Acta Hort.* 343, 93-99.

Ke, D., Yahía, E., Mateos, M., Kader, A.A., 1994. Ethanolic fermentation of Bartlett pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119, 976-982.

Ke, D., Yahía, E., Hess, B., Zhou, L., Kader, A.A., 1995. Regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbon dioxide stresses. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120, 481-490.

Kim, J.J., Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Henis, Y., Carmeli, S., 1991. Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiol.* 97, 880-885.

Kirschbaum D.S., Hancock J.F., 2000. The strawberry industry in South America. *HortScience* 35, 807-811.

Kirschbaum D.S., 2003. Economías regionales: el mercado de las frutillas. Un negocio que está al rojo vivo. Suplemento Clarín Rural.

Klein, J.D., Lurie, S., 1990. Prestorage heat treatment as a means of improving poststorage quality of apples. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115, 255-259.

Klein, J.D., Lurie, S., Ben-Arie, R., 1990. Quality and cell wall components of "Anna" and "Granny Smith" apples treated with heat, calcium and ethylene. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115, 954-958.

Klein, J.D., Lurie, S., 1991. Postharvest heat treatment and fruit quality. *Postharv. News Info.* 2, 15-19.

Klein, J.D., Lurie, S., 1992. Prestorage heating of apple fruit for enhanced postharvest quality: interaction of time and temperature. *HortScience* 27, 326-328.

Klein, J.D., Hanzon, J., Irwin, P.L., Ben Shalom, N., Lurie, S., 1995. Pectin esterase activity and pectin methyl esterification in heated golden delicious apples. *Phytochemistry*. 39, 491-494.

Klein, J.D., Conway, W.S., Whitaker, B.D., Sams, C.E., 1997. *Botrytis cinerea* decay in apples is inhibited by postharvest heat and calcium treatments. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122, 91-94.

Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 8849-8855.

Knee, M., Sargent JA., Osborne, D.J., 1977. Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* 28, 377-396.

Koch, J.L., Nevins, D.J., 1989. Tomato fruit cell wall. 1. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. *Plant Physiol.* 91, 816-822.

Koh, T., Melton, L., 2002. Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharv. Biol. Technol.* 26, 23-33.

Kumar, A., Ellis, B.E., 2001. The phenylalanine ammonia-lyase gene in raspberry. Structure, expression and evolution. *Plant Physiol.* 127, 230-239.

Lagrimini, M.L., Burkhart, W., Moyer, M., Rothstein, S., 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7542-7546.

Lagrimini, M.L., 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96, 577-583.

Larkindale, J., Knight, M.R., 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. 128, 682-695.

Lay-Yee, M., Rose, K.J., 1994. Quality of 'Fantasia' Nectarines following forced air heat treatments for insect disinfestations. *HortScience* 29, 663-666.

Lay-Yee, M., Ball, S., Forbes, S.K., Woolf, A.B., 1997. Hot water treatment for insect disinfestation and reduction of chilling sensitivity of 'Fuyu' persimmon. *Postharv. Biol. Technol.* 10, 81-89.

Lee, S.K., Kader, A.A., 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharv. Biol. Technol.* 20, 207-220.

Lee, H., Leon, J., Raskin, I., 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4076-4079.

Li, C., Kader, A.A., 1989. Residual effects of controlled atmospheres on postharvest physiology and quality of strawberries. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114, 629-634.

Li, L., Steffens, J.C., 2002. Overexpression of polyphenol oxidase gene in transgenic tomato plants results in enhanced plant disease resistance. *Planta* 215, 239-247.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods Enzymol.* 148, 350-382.

Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-91.

Lipe, J.A., 1978. Ethylene in fruits of blackberry and rabbiteye blueberry. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103, 76-77.

Liu, F.W., 1978. Modification of apple quality by high temperature. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103, 730-732.

Liu X., Thiele, D.J., 1996. Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev.* 10, 592-603.

Llop-Tous, I., Dominguez-Puigjaner, E., Palomer, X., Vendrell, M., 1999. Characterization of two divergent Endo-1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiol.* 119, 1415-1422.

Loaiza-Velarde, J.G., Tomás-Barberá, F.A., Saltveit, M.E., 1997. Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on wound-induced phenolic metabolism in iceberg lettuce. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122, 873-877.

Lurie, S., 1990. Heat treatment of ripening apples: Differential effects on physiology and biochemistry. *Physiol. Plant.* 78, 181-186.

Lurie, S. Klein, J.D., 1991. Acquisition of low temperature tolerance in tomatoes by exposure to high temperature stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116,1007-1012.

Lurie, S., Klein, J.D., 1992. Calcium and heat treatments to improve storability of "Anna apple". *HortScience* 27, 36-39.

Lurie, S., Othman, S., Borochoy, A., 1995. Effects of heat treatment on plasma membrane of apple fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 5, 29-38.

Lurie, S., Fallik, E., Handros, A. and Shapira, R. 1997. The involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated fruit. *Physiological Mol. Plant Pathol.* 50, 141-159.

Lurie, S., Sabehat, A., 1997. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. *Postharv. Biol. Technol.* 11, 57-62.

Lurie, S., 1998. Postharvest heat treatments. *Postharv. Biol. Technol.* 14, 257-269.

Lyons, J.M., 1973. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24, 445-466.

Maas, J.L., 1992. Compendium of strawberry diseases. APS Press Minnesota. USA.

Machinandiarena, M.F., Olivieri, F.P., Daleo, G.R., Oliva, C.R., 2001. Isolation and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from potato leaves. Accumulation in response to salicylic acid, wounding and infection. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 129-136

Mäder, M., Fussi, 1982. Role of peroxidase on lignification of tobacco cells II. Regulation by phenolic compounds. *Plant Physiol.* 70, 1132-1134.

Maher, E.A., Bate, N.J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.J., 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7802-7806.

Makinen, K.K., Söderling, E., 1980. A quantitative study of mannitol, sorbitol, xylitol and xylose in wild strawberries and commercial fruits. *J. Food Sci.* 45, 367-371.

Manning, K., 1993. Soft fruit. In: *Biochemistry of fruit ripening*. Edited by Seymour, G.B., Taylor, J.E., and Tucker, G.A, Chapman and Hall, pp. 347-377.

Martínez, G.A., Chaves, A.R., Añon, M.C., 1996. Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit. *J. Plant Growth Reg.* 15, 139-146.

Martínez, G.A., Chaves, A.R., Civello, P.M., 2004. β -xylosidase activity and expression of a β -xylosidase gene during strawberry fruit ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 89-96.

Mathooko, F.M., 1996. Regulation of respiratory metabolism in fruits and vegetables by carbon dioxide. *Postharv. Biol. Technol.* 9, 247-264.

Maxie, E., Mitchell, G., Sommer, N., Snyder, G., Rae, H., 1974. Effect of elevated temperature on ripening of "Bartlett pear. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 99, 344-349.

McCollum, T.G., D'Aquino, S., McDonald, R.E., 1993. Heat treatment inhibits mango chilling injury. *HortScience* 28, 197-198.

McCollum, G., Doostdar, H., Mayer, R., McDonald, R., 1995. Immersion of cucumber in heated water alters chilling-induced physiological changes. *Postharv. Biol. Technol.* 6, 55-64.

Mc Donald , R.E., Mc Collumn, T.G., Baldwin, E.A., 1999. Temperature of water treatments influences tomato fruit quality following low temperature storage. *Postharv. Biol. Technol.* 16, 147-155.

McDuffee, A.T., Senisterra, G., Huntley, S., Lepock, J.R., Sekhar, K.R., Meredith, M.J., Borrelli, M.J., Morrow, J.D., Freeman, M.L., 1997. Proteins containing non-native disulfide bonds generated by oxidative stress can act as signals for the induction of the heat shock response. *J Cell Physiol* 171, 143-151.

McQueen-Mason, S.J., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4, 1425-1433.

McQueen-Mason, S.J., Fry, S.C., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1993. The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. *Planta* 190, 327-331.

McQueen-Mason, S.J., Cosgrove, D.J., 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6574-6578.

McQueen-Mason, S.J., Cosgrove, D.J., 1995. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107, 87-100.

Mencarelli, F., B., Ceccantoni, A., Bolini Anelli, G., 1993. Influence of heat treatment on the physiological response of sweet pepper kept at chilling temperature. *Acta Hort.* 343, 238-243.

Mencarelli, F., 1987. Effects of CO₂ atmospheres on stored zucchini squash. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112, 985-988.

Merino, S.R., Eugenio, M.M., Ramos, A.U., Hernandez, S.U., 1985. Fruit fly disinfestation of mangoes (*Mangifera indica* L.) Var. "Manila Super" by vapor heat treatment. Manila. Philippines, Ministry of Agriculture and Food, Bureau of Plant Industry.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426.

Miller, A.R., Dalmaso, J.P., Kretchman, D.W., 1987. Mechanical stress, storage time, and temperature influence cell wall degrading enzymes, firmness, and ethylene production by cucumbers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112, 666-671.

Mitcham E.J., Gross, K.C., Ng, T.J., 1989. Tomato fruit cell wall synthesis during development and senescence. In vivo radiolabeling of wall fractions using [¹⁴C] sucrose. *Plant Physiol.* 89, 477-481.

Mitcham, E.J., McDonald, R.E., 1992. Effect of high temperature on cell wall modifications associated with tomato fruit ripening. *Postharv. Biol. Technol.* 1, 257-264.

Mitcham, E.J., Mc Donald, R.E., 1993. Respiration rate, internal atmosphere, ethanol and acetaldehyde in heat treatment of mango fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 3, 77-86.

Mitcham, E., 1996. Quality assurance of strawberries: a case study. *Perishables Handling Newsletters.* N° 85.

Mitchell, F.G., 1992. Cooling horticultural commodities. In: Kader, A.A (Ed.), *Postharvest technologies of horticultural crops*, Univ. Of. Calif. Berkeley. Spec. Publ. 3311, pp. 53-68.

Mitchell, F.G., Mitcham, E., Thompson, J.F., Welch, N., 1996. *Handling Strawberries for Fresh Market*. Oakland, CA: Univ. Calif. Agr. Nat. Resources, Special Publ. 2442, 14 pp.

Mitchell, F.G., Rumsey, T.R., Kasmire, R.F., Crisosto, C.H. 2000. Commercial Cooling of Fruits, Vegetables, and Flowers. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 21567. 61 pp.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance Trends Plant Sci. 7, 405-410.

Monro, J.A., Lee, J., 1987. Changes in elements, pectic substances and organic acids during development of boysenberry fruit. J. Sci. Food Agric. 38, 195-207.

Moore, J.N., Brown, G.R., Brown, E.D., 1970. Comparison of factors influencing fruit size in large-fruited and small-fruited clones of strawberry. J. Am. Soc. Hort. Sci. 95, 827-831.

Morgan R.W., Christman, M.F., Jacobson, F.S., Storz, G., Ames, B.N., 1986. Hydrogen-peroxide induced proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. Proc. Natl. Acad. USA. 83, 8059-8063.

Mujer, C.V., Miller, A.R., 1991. Purification and properties of β -xylosidase isozymes from cucumber seeds. Physiol. Plant. 82, 367-376.

Nara K., Kato Y., Motomura, Y., 2001. Involvement of terminal arabinose and galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage, Postharv. Biol. Technol. 22, 141-150.

Noctor, G., Foyer, C., 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 249-279.

Nogata Y., Ohta H., Voragen A.G.J., 1993. Polygalacturonase in strawberry fruit, Phytochemistry 34, 617-620.

Nogata, Y., Yoza., K., Kusumoto, K., Ohta, H., 1996. Changes in molecular weight and carbohydrate composition of cell wall polyuronide and hemicellulose during ripening in strawberry fruit. In: Pectins and pectinases. 1996. Elsevier Science.

Nonogaki, H., Gee, O.H., Bradford, K.J., 2000. A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiol.* 123, 1235-1245.

Nover L., Scharf, K.D., Neumann D., 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1298-1308.

Nover, L., 1991. Heat shock response. CRC Press, Boca Raton, FL.

Olías, J.M., Sanz, C., Pérez, A.G., 1998. Postcosecha de la fresa de Huelva. Principios básicos y tecnología. Instituto de la Grasa. CSIC. Sevilla. España.

Paglietta, R., 1986. El Frambueso. Edic. Mundi. Prensa. España.

Pan, J., Vicente, A.R., Martínez, G.A., Chaves, A.R., Civello, P.M., 2004. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *J. Sci. Food. Agric.* In Press.

Panchuk, I.I., Volkov, R.A., Schöffl, F., 2002. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 838-853.

Paull, R.E., 1990. Postharvest heat treatments and fruit ripening. *Postharv. News Info.* 1, 355-363.

Paull, R.E., Chen, N.J., 2000. Heat treatment and fruit ripening. *Postharv. Biol. Technol.* 21, 21-37.

Paull, R.E., 1994. Response of tropical horticultural commodities to insect disinfestation treatments. *HortScience* 29, 988-996.

Pellegrini, L., Georoy, P., Fritig, B., Legrand, M., 1993. Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O-methyltransferases induced in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by infection or elicitor treatment. *Plant Physiol.* 103, 509–517.

Perkins-Veazie, P., Huber, D.J., 1987. Growth and ripening of strawberry fruit under field conditions. *Proceedings of Florida State Horticultural Society.* 100, 253-256.

Perkins-Veazie, P., Nonnecke, G., 1992. Physiological changes during ripening of raspberry fruit. *Hort Science* 27, 331-333.

Perkins-Veazie, P., Clark, J.R., Huber, D.J., and Baldwin, E.A., 2000. Ripening physiology in 'Navaho' thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening, and compositional changes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 125, 357-363.

Picton, S., Grierson, D., 1988. Inhibition of expression of tomato ripening genes at high temperatures. *Plant Cell Envir.* 11, 265-272.

Plowman, J.E., 1991. Sugars and acids of raspberries, blackberries and others brambles. *Lebensm. Wiss. Technol.* 24, 113-115.

Porrit, S.W., Lidster, P.D., 1978. The effect of prestorage heating on ripening and senescence of apples during cold storage. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103, 584-587.

Pressey, R., 1983. β -Galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 71, 132-135.

Pressey, R., 1989. endo- β -Mannanase in tomato fruit, *Phytochemistry* 28, 3277-3280.

PROEXANT 2004. Manual de la frutilla. En:www.proexant.org.ec/ManualFrutilla.html

Prusky, D., Fuchs, Y., Kobilier, I., Roth, I., Weksler, I., Shalom, Y., Fallik, E., Zauberman, G., Pesis, E., Akerman, E., Ykutiely, O., Weisblum, A., Regev, R., Artes, L., 1999. Effect of hot water brushing, prochloraz treatment and waxing on incidence of black spot decay caused by *Alternaria alternata* in mango fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 15, 165-174.

Ranwala, A.P., Suematsu, C., Masuda, H., 1992a. The role of β -galactosidases in the modification of cell wall components during muskmelon fruit ripening. *Plant Physiol.* 100, 1318-1325.

Ranwala, A.P., Suematsu, C., Masuda, H., 1992b. Soluble and wall-bound invertases in strawberry fruit. *Plant Sci.* 84, 59-64.

Ray, H., Douches, D.S., Hammerschmidt, R., 1998. Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 93-103.

Redgwell, R.J., MacRae, E., Hallett, I., Fisher, M., Perry, J., Harker, R., 1997. In vitro and in vivo swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203, 162-173.

Redondo-Nevado, J., Moyano, E., Medina-Escobar, N., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., 2001. A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *J. Exp. Bot.* 52, 1941-1945.

Reid, M., Celikel, F., McKay, A., Hunter, D., 2001. Use of 1-MCP on Floral Products. *Perishables Handling Quarterly*. UC Davis. 108, 7-9.

Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Albagli, R., Fang, D.Q., 1995. Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. *Postharv. Biol. Technol.* 5, 119-127.

Rodov, V., Burns, P., Ben-Yehoshua, S., Fluhr, R., Ben Shalom, N., 1996. Induced local disease resistance in citrus mesocarp (albedo): accumulation of phytoalexins and PR proteins. *Proc. VIII Int. Citrus Congress*, 12–17 May, 1996. Sun City Resort, South Africa. Vol. 2, pp.

Rosli, H., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2004. Cultivar and ripening effects on strawberry (*Fragaria x ananasa*) fruit texture and cell wall polysaccharide composition. Plant Physiol. Biochem. In press.

Roy, S., Conway, W.S., Watada, A.E., Sams, C.I., Erbe, E.F., Wergin, W.P., 1994. Heat treatment affects epicuticular wax structure and postharvest calcium uptake in 'Golden delicious' apples. HortScience 29, 1056-1058.

Sabehat, A., Weiss, D., Lurie, S., 1998. Heat shock proteins and cross-tolerance in plants. Physiol. Plant. 103, 437-441.

SAGPYA, 1998. Reglamento Técnico del Mercado Común del Sur (MERCOSUR) para la Fijación de Identidad y Calidad de Frutilla. Resolución 85/98.

SAGPYA, 2004. Frutilla Fresca de tucumán. Apoyo a los exportadores Newsletter. En: www.exportapymes.com/doc/apoyo_exportadores_sagpya/informe_sagpya_13.htm

Saha, B.C., 2000. L-Arabinofuranosidasas: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. Biotechnol. Adv. 18, 403-423.

Saltveit, M.E., 1991. Prior temperature exposure affects subsequent chilling sensitivity. Physiol. Plant. 82, 529-536.

Saltveit, M.E., 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shocks. Postharv. Biol. Technol. 21, 61-69.

Salunkhe, D.K., Desai, B.B., 1984. Soft fruit. In: Postharvest biotechnology of fruits. Volume I. CRC press Inc. USA. pp 111-115.

Sasaki, I., Nagayama, H., 1994. Glucosidase from *Botrytis cinerea*: its relation to the pathogenicity of this fungus. Biosci. Biotech. Biochem. 58, 616-620.

Sato, Y., Murakami, T., Funatsuki, H., Matsuba, S., Saruyama, H., Tanida, M., 2001. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. J. Exp. Bot. 52, 145-151.

Schirra, M., D'hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E., 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharv. Biol. Technol.* 21, 71-85.

Schirra, M., D'hallewin, G., 1997. Storage performance of Fortune mandarins following hot water dips. *Postharv. Biol. Technol.* 10, 229-237.

Schirra, M., D'hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E., 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharv. Biol. Technol.* 21, 71-85.

Scott, I.M., Yamamoto, H., 1994. Mass spectrometric quantification of salicylic acid in plant tissues. *Phytochemistry* 37, 335-336.

Seo, S.T., Hu, B., Komura, M., Lee, C., Harris, E., 1974. *Dacus dorsalis* and vapor heat in papaya. *Journal of Economic. Entomol.* 67, 240-242.

Shackel, K.A., Greve, C., Labavitch, J.M., Ahmadi, H., 1991. Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiol.* 97, 814-816.

Shadle, G.L., Wesley, S.B., Korth, K.L., Chen, F., Lamb, C., Dixon, R.A., 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of l-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64, 153-161.

Sharma, Y.K., Raskin, L.J., Davis, K.R., 1996. Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*-the role of salicylic acid in the accumulation of defence-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5099-5104.

Shellie, K.C., Mangan, R.L., 1994. Postharvest quality of 'Valencia' orange after exposure to hot, moist forced air for fruit fly disinfestations. *HortScience* 29, 1524-1527.

Smith, W.L., 1971. Control of brown rot and *Rhizopus* rot on inoculated peaches with hot water or hot chemical suspensions. *Plant Disease Reporter* 55, 228-230.

Smith, D.L., Starret, D.A., Gross, K.C., 1998. A gene encoding for tomato fruit β -galactosidase II is expressed during fruit ripening. *Plant Physiol.* 117, 417-423.

- Smock, R.M., 1979. Controlled atmosphere of fruits. *Hortic. Rev.* 1, 301-336.
- Somssich, I., Hahlbrock, K., 1998. Pathogen defense in plants-a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90.
- Southgate, D.A.T., 1976. Determination of Food Carbohydrates, Applied Science: London, pp 105-106.
- Sozzi, G.O., Cascone, O., Frascina, A.A., 1996. Effect of a high temperature stress on endo- β -mannanase and α and β -galactosidase activities during tomato fruit ripening. *Postharv. Biol. Technol.* 9, 49-63.
- Sozzi, G.O., Greve, L.C., Prody, G.A., Labavitch J.M., 2002. Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate -L-Arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs. *Plant Physiol.* 129, 1330-1340.
- Spotts, R., Chen, P.M., 1987. Prestorage heat treatments for control of decay of pear fruit. *Phytopathology* 77, 1578-1582.
- Staples, R.C., Mayer, A.M., 1995. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* as a wound pathogen. *FEMS Microbiol. Letters* 134, 1-7.
- Stewart, D., Iannetta, P.P.M., Davies, H.V., 2000. Ripening-related changes in raspberry cell wall composition and structure. *Phytochemistry* 56, 423-428.
- Storozhenko, S., De Pauw, P., Van Montagu, M., Inzé, D., Kushnir, S., 1998. The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* APX1 gene promoter. *Plant Physiol.* 118, 1005-1014.
- Stutte, G.W., Darnell, R.L., 1987. A non destructive developmental index for strawberry. *HortScience* 22, 218-221.

Sugimoto, T., Furusawa, K., Mizobuchi, M., 1983. The effectiveness of vapor heat treatment against the oriental fruit fly *Dacus dorsalis* Hendel, in green pepper and fruit tolerance to the treatment. Research Bulletin of the plant protection service, Japan. N° 19, 81-88.

Thompson, J.E., Fry, S.C., 2000. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211, 275–286.

Tieman, D.M., Harriman, R.W., Ramamohan, G., Handa, A.K., 1992. An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell* 4, 667-679.

Tieman, D.M., Handa, A.K., 1994. Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. *Plant Physiol.* 106, 429-436.

Tong, C.B.S., Gross, K.C., 1988. Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening. *Physiol. Plant.* 74, 365-370.

Torre, L.C., Barritt, B.H., 1977. Quantitative evaluation of *Rubus* fruit anthocyanin pigments. *J. Food Sci.* 42, 488-490.

Touzani, A., Muna, J.P., Doneche, B., 1994. Effet du pool enzymatique exocellulaire de *Botrytis cinerea* sur les cellules de *Vitis vinifera*. Application a la pellicule du raisin. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 28, 19-31.

Trainotti, L., Spolaore, S., Pavanello, A., Baldan, B., Casadoro, G., 1999. A novel E type endo- β -1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Mol. Biol.* 40, 323-332.

Trainotti, L., Spinello, R., Piovan, A., Spolaore, S., Casadoro, G., 2001. β -galactosidases with a lectin like domain are expressed in strawberry. *J. Exp. Bot.* 52, 1635-1645.

Tucker, G.A., Robertson, N.G., Grierson, D., 1982. Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isoenzymes. *J. Sci. Food Agric.* 33, 396-400.

Valderrama, P., Marangoni, F., Clemente, E., 2001. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO) em maca (*Mallus comunis*). *Cienc. Technol. Aliment.* 21, 321-325.

Van Breusegem, F., Slooten, L., Stassart, J.M., Botterman, J., Moens, T., Van Montagu, M., Inzé, D., 1999. Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *J Exp. Bot.* 50, 71-78.

Van Camp W., Wilklwens H., Bowler C., Van Montagu M., Inzé D., 1994. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Biotechnology* 12, 165-168.

Van Camp W., Willekens H., Bowler C., Van Montagu M., Inzé D., Slooten L., 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol.* 112, 1703-1714.

Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L.R., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E., 2000. Effect of temperature and/or pressure on tomato pectinesterase activity. *J. Agric. Food Chem.* 48, 551-558.

Van Loon, L.C., 1997. Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 753-765.

Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado Blanco, J., Linthorst, H.J.M., 2000. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnol.* 18, 779-783.

Vierling, E., 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 579-620.

Vierling, E., 1997. The small heat shock protein in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19, 539-547.

Viterbo, A., Staples, R.C., Yagen, B., Mayer, A.M., 1994. Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of lactase formation in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 35, 1137-1142.

Wakamatsu, K., Takahama, U., 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isoenzymes in carrot callus. *Physiol. Plant.* 88, 167-171.

Walsh, C.S., Popenoe, J., and Solomos, T., 1983. Thornless blackberry is a climacteric fruit. *HortScience* 18, 482-483.

Wang, C.Y., 1994. Combined treatment of heat shock and low temperature conditioning reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharv. Biol. Technol.* 4, 65-73.

Warm, E., Laties, G.G., 1982. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry* 21, 827-831.

Whitaker, B.D., Klein, J.D., Conway, W.S., Sams, C.E., 1997. Influence of prestorage heat and calcium treatments on lipid metabolism in 'Golden Delicious' apples. *Phytochemistry* 45, 465-472.

Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-565.

Woodward, J.R., 1972. Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *J. Sci. Food Agric.* 23, 465-473.

Woolley L.C., James D.J., Manning K., 2001. Purification and properties of an endo- β -1,4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, *cel*. *Planta* 214, 11-21.

Wolf, A.B., 1995. Reducing external chilling injury in stored "Hass" avocados with dry heat treatments. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120, 1050-1056.

Wolf, A.B., MacRae, E.A., Spooner, K.J., Redgwell, R.J., 1997. Changes to physical properties of the cell wall and polyuronides in response to heat treatment of "Fuyu" persimmon that alleviate chilling injury. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122, 698-702.

Wolfe, S.K., 1980. Use of CO and CO₂-enriched atmospheres for meats, fish, and produce. *Food Technol.* 34, 55-58.

Wozniowski, T., Blaschek, W., Franz, G., 1992. Isolation and characterization of an endo- β -mannanase of *Lilium testaceum* bulbs. *Phytochemistry* 31, 3365-3370.

Wrolstad, R.E., Shallenberger, R.S., 1981. Free sugars and sorbitol in fruits: a compilation from the literature. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64, 91-103.

Yahía, E.M., Higuera Ciapara, I., 1992. Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas. Editorial Limusa. México.

Yalpani, N., Enyedi, A.J., Leon, J., Raskin, I., 1994. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193, 372-376.

Yoshida, O., Nakagawa, H., Ogura, N., Sato, T., 1984. Effect of heat treatment on the development of polygalacturonase activity in tomato fruit during ripening. *Plant Cell Physiol.* 25, 505-509.