



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Evaluación del efecto de los tratamientos de
estrés térmicos aplicados en frutos cítricos para
reducir daño por frío.
Acumulación de proteínas de estrés**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el Área Química Biológica

Silvina M. Guidi

Director de Tesis: Dra. Claudia B. González

Director Asistente: Dr. Gustavo A. Polenta

Área Bioquímica y Nutrición – Instituto Tecnología de Alimentos (ITA) - Centro de Investigación de Agroindustria (CIA) - INTA

Laboratorio de Poscosecha - Estación Experimental Agropecuaria Concordia - INTA

Buenos Aires, 2007

Evaluación del efecto de los tratamientos de estrés térmico aplicados en frutos cítricos para reducir daño por frío. Acumulación de proteínas de estrés

Dado que se han utilizado con éxito diferentes tratamientos térmicos para prevenir el desarrollo del DF en frutas y hortalizas, el objetivo de la presente tesis fue caracterizar el efecto de los tratamientos de estrés térmicos sobre parámetros fisiológicos y bioquímicos en frutos sensibles que requieren períodos largos de almacenamiento poscosecha. Con este fin, se trataron mandarinas “ Nova” y pomelos “ Marsh” provenientes de Entre Ríos (Argentina), siendo las temperaturas de almacenamiento aplicadas 2°C (altamente inductora de DF) y 9°C (temperatura de conservación óptima). Los parámetros evaluados fueron: color, porcentaje de jugo, sólidos solubles totales, acidez titulable, índice de madurez, índice de DF, podredumbres, y acumulación de proteínas de estrés térmico (HSPs). Las evaluaciones se realizaron luego de la cosecha, inmediatamente después de aplicados los tratamientos, y en períodos quincenales durante el almacenamiento.

Los tratamientos térmicos aplicados a ambos frutos cítricos, no modificaron los parámetros de calidad evaluados en la presente tesis. Sólo se vio afectada la pérdida de peso (PP), particularmente en el caso de las mandarinas debido a su menor tamaño. Consecuentemente, se propone el uso de envoltorios durante la conservación con el objeto de minimizar las PP debidas a la respiración y/o establecer una relación óptima tiempo-temperatura de tratamiento a fin de limitar las pérdidas por evaporación.

La aplicación de los tratamientos térmicos, previa al almacenamiento, redujo exitosamente la incidencia de DF en pomelos aún durante la conservación a temperaturas altamente inductoras de daño. Se logró establecer una relación entre la cantidad de sHSPs inducidas por los tratamientos y el control de los síntomas de DF, constituyendo una fuerte evidencia de que estas proteínas de estrés son las responsables de la mayor resistencia al DF. En cambio en mandarinas –si bien se logró inducir la acumulación de proteínas de estrés en frutos tratados– no fue posible establecer si los tratamientos aplicados producían el efecto protector debido a que los frutos control no desarrollaron síntomas de DF durante la exposición a 2°C.

Se logró también desarrollar una técnica inmunológica (*dot blot*) para la cuantificación de las proteínas de estrés. Esta metodología fue capaz de detectar diferencias en la cantidad de HSPs acumuladas entre los frutos control y los tratados térmicamente. Por lo tanto, se propone al análisis de estas proteínas como variable de monitoreo para medir la intensidad de los tratamientos térmicos y/o el estado fisiológico del fruto durante la conservación.

Palabras claves: daño por frío, tratamiento térmico, cítricos, estrés, HSP.

Evaluation of the effect of thermal stress treatments applied on citrus to reduce chilling injury. Stress protein accumulation.

Due to successful application of thermal treatments to prevent the development of CI in fruits and vegetables, the purpose of the present thesis was to characterize the effect of these treatments on the physiological and biochemical parameters of sensitive fruits that required long periods of post harvest storage.

With this aim, “ Nova” mandarins and “ Marsh” grapefruit from Entre Rios (Argentina) were thermally treated, with storage temperatures being 2°C (CI inducing temperatures) and 9°C (optimal storage temperature). The parameters evaluated were color, juice percentage, total soluble solids, maturity index, CI index, decay, and stress protein accumulation. The different evaluations were performed at harvest, immediately after treatment application and fortnightly during post harvest storage.

Thermal treatments did not modify fruit quality parameters. Only weight loss (WL) was increased, particularly in mandarins due to their small size. Consequently, it is proposed the use of wrapping during storage to reduce WL produced by respiration and/or to establish the optimal “ time-temperature” relationship for the treatments in order to decrease evaporation WL.

The application of thermal treatments, previous to storage, successfully reduced the incidence of CI in grapefruits, even during the storage at damage-inducing temperatures. It was also established a relationship between sHSPs thermal induction and the control of CI symptoms, this fact being strong evidence supporting the hypothesis that these stress proteins are responsible for the increased CI resistance. Instead in mandarins, even though it was found an accumulation of stress proteins in treated fruits, it was not possible to establish such that relationship because “ control fruits” did not develop the characteristic CI symptoms throughout the complete period of storage at 2°C.

We were also successful in developing an immunological technique (dot blot) to quantify the stress protein accumulation. This methodology was capable of detecting differences in the amount of accumulated HSPs between control and thermally treated

fruits. Therefore, it is proposed the analysis of these proteins to monitor thermal treatments intensity and/or the physiology of the fruits under refrigerated storage.

Key words: chilling injury, thermal treatments, citrus, stress, HSP

A Catalina y Josefina, mis hijas

A Nestor, mi amor

A Patri y Vivi, mis hermanas

A Pimpo y Dorita, mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo agradecer a CLAUDIA, por haber confiado en mí para emprender esta tarea, por su insistencia, su tiempo y dedicación, por haberme guiado profesionalmente, y por las tantas charlas entre idas y venidas a nuestro lugar de trabajo.

Le agradezco a GUSTAVO, por su coodirección, y por su permanente ayuda incondicional en el laboratorio, su paciencia y predisposición para terminar con los ensayos de esta tesis.

A ANA MARÍA, por su valioso aporte en la estadística, por todas esas horas pasadas frente al monitor rodeadas de papeles y analizando datos. Por las charlas, las risas, y el aliento en las horas de cansancio.

Agradezco muy profundamente a ADRIANA, mi compañerita de banco, por todas las horas compartidas dentro y fuera del INTA.

También deseo expresar mi total agradecimiento a CECILIA, ADRIANA, DARÍO y GUSTAVO, por la “ **buena onda**” compartida diariamente en el laboratorio, con desinterés y predisposición para salir adelante en la lucha diaria, y por haberme apoyado durante todo este último tiempo.

A ANDREA y ADRIANA D., por su constante apoyo tanto en lo profesional como personal.

A GABRIELA y SERGIO, por el aporte brindado de sus conocimientos.

Un especial agradecimiento a todos mis **compañeros del ITA**, con los que diariamente comparto desayunos, cumpleaños, almuerzos, **festejos**, etc., haciendo de este Instituto, un lugar de trabajo invaluable.

A DANIEL y a la Estación Experimental de Concordia, por su contribución en el desarrollo de parte de las investigaciones llevadas a cabo en este trabajo de investigación.

Al INTA, y en particular al CIA e ITA, por haberme dado la oportunidad de completar este trabajo de tesis y por el apoyo económico.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento de parte del trabajo de tesis a través del proyecto PICT 98 09-04344.

<i>INDICE DE TABLAS</i>	<i>v</i>
<i>INDICE DE FIGURAS</i>	<i>viii</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>xi</i>
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1.1 PRODUCCIÓN NACIONAL DE CÍTRICOS	1
1.1.1 Producción nacional y evolución de la superficie cultivada	1
1.1.2 Nivel de ocupación	1
1.1.3 Destino de la producción de frutas cítricas frescas	2
1.1.4 Distribución Regional de la Citricultura Argentina	2
1.1.4.1 Región NOA	3
1.1.4.2 Región NEA	3
1.1.4.3 Buenos Aires	4
1.1.4.4 Otras regiones del país	4
1.2 CONTEXTO INTERNACIONAL	5
1.2.1 Naranja	5
1.2.2 Limón	6
1.2.3 Mandarina	6
1.2.4 Pomelo	6
1.2.5 Mercado Externo	7
1.2.6 Destino de las exportaciones	7
1.2.7 Perspectivas	9
1.3 FRUTOS CÍTRICOS: GENERALIDADES	9
1.3.1 Taxonomía y cultivos	10
1.3.1.1 Naranjas dulces	10
1.3.1.2 Mandarinas	10
1.3.1.3 Pomelos	11
1.3.1.4 Limones y limas	11
1.3.2 Calidad	11
1.3.3 Manejo Poscosecha de cítricos	12
1.3.4 Maduración	13
1.3.5 Daño por frío	16
1.3.5.1 Mecanismo de desarrollo del daño por frío	20

1.3.5.2 Métodos para reducir el daño por frío _____	22
1.3.5.3 Tratamientos de estrés _____	25
1.4 PROTEÍNAS DE ESTRÉS TÉRMICO _____	26
1.4.1 Generalidades _____	26
1.4.2 Familia de HSP70 _____	28
1.4.3 Familia de HSP60 _____	30
1.4.4 Familia de HSP90 _____	31
1.4.5 Familia de HSP100 _____	32
1.4.6 Familia de las proteínas de bajo peso molecular (sHSPs) _____	33
1.4.7 Regulación _____	35
1.4.8 Usos prácticos de las proteínas de estrés _____	38
1.4.9 Aspectos tecnológicos _____	39
1.5 CONSIDERACIONES SOBRE LA METODOLOGÍA UTILIZADA _____	40
1.5.1 Medición de los parámetros de calidad _____	40
1.5.1.1 Color _____	41
1.5.1.2 Dulzor _____	43
1.5.1.3 Técnicas Electroforéticas _____	44
1.6 OBJETIVOS DE LA TESIS _____	46
Objetivo general _____	46
Objetivos específicos _____	46
<i>2. MATERIALES Y MÉTODOS</i> _____	<i>48</i>
2.1 Material vegetal _____	48
2.2 Tratamientos aplicados _____	48
2.2.1 Tratamientos en mandarinas _____	48
2.2.2 Tratamientos en pomelos _____	50
2.3 Evaluaciones de la calidad de los cítricos _____	51
2.3.1 Evaluación del color _____	51
2.3.2 Determinación de la pérdida de peso _____	52
2.3.3 Determinación del porcentaje de jugo _____	52
2.3.4 Determinación del contenido de sólidos solubles totales _____	52
2.3.5 Determinación de la acidez titulable _____	52
2.3.6 Determinación del índice de madurez _____	52
2.3.7 Evaluación de las alteraciones fisiológicas _____	53
2.3.8 Análisis estadístico _____	53

2.4 Efecto de los tratamientos térmicos sobre la acumulación de las proteínas de estrés _____	56
2.4.1 Extracción de proteínas _____	56
2.4.1.1 Obtención de los polvos cetónicos _____	56
2.4.1.2 Obtención de las proteínas _____	56
2.4.1.3 Determinación de la concentración de proteínas _____	57
2.4.2 Separación e identificación de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio _____	57
2.4.3 Identificación de proteínas de estrés por métodos inmunoológicos _____	58
2.4.4 Cuantificación de las proteínas de estrés por métodos inmunológicos _____	59
2.4.5 Análisis de las imágenes para la caracterización y cuantificación de las proteínas _____	59
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	60
3.1 RESULTADOS OBTENIDOS EN MANDARINAS _____	61
3.1.1 Evaluación de la calidad _____	61
3.1.1.1 Color _____	61
3.1.1.2 Pérdida de peso _____	67
3.1.1.3 Porcentaje de jugo _____	72
3.1.1.4 Sólidos solubles totales _____	74
3.1.1.5 Acidez total _____	76
3.1.1.6 Índice de madurez _____	79
3.1.1.7 Alteraciones fisiológicas _____	81
• Daño por frío _____	81
• Efecto de los tratamientos sobre las podredumbres _____	84
3.1.1.8 Evaluación del efecto de los tratamientos aplicados sobre los parámetros determinantes de la calidad en frutos _____	86
3.1.2 Efecto de los tratamientos térmicos sobre la acumulación de las proteínas de estrés _____	90
3.1.2.1 Selección del método de extracción de las proteínas del flavedo: Polvos Cetónicos _____	90
3.1.2.2 Análisis del perfil de los extractos proteicos mediante estudios electroforéticos e inmunológicos _____	91
3.1.2.3 Cuantificación de las proteínas de estrés _____	103
• Cuantificación de las sHSPs _____	104
• Cuantificación de las HSP70 _____	106
3.1.3 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO EN MANDARINAS _____	113

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN POMELOS _____	115
3.2.1 Evaluación de la calidad _____	115
3.2.1.1 Color _____	115
3.2.1.2 Pérdida de peso _____	122
3.2.1.3 Porcentaje de Jugo _____	126
3.2.1.4 Sólidos Solubles Totales _____	128
3.2.1.5 Acidez total _____	130
3.2.1.6 Índice de madurez _____	132
3.2.1.7 Alteraciones fisiológicas _____	134
• Daño por frío _____	134
• Efecto de los tratamientos sobre las podredumbres _____	137
3.2.1.8 Evaluación del efecto de los tratamientos aplicados sobre los parámetros determinantes de la calidad en frutos. _____	140
3.2.2 Efecto de los tratamientos térmicos sobre la acumulación de las proteínas de estrés _____	143
3.2.2.1 Selección del método de extracción de proteínas del flavedo: Polvos Cetónicos _____	143
3.2.2.2 Análisis del perfil de los extractos proteicos mediante estudios electroforéticos e inmunológicos _____	144
3.2.2.3 Cuantificación de las proteínas de estrés _____	150
• Cuantificación de las sHSPs _____	150
• Cuantificación de las HSP70 _____	153
3.2.3 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO EN POMELOS _____	160
4. <i>CONCLUSIONES GENERALES</i> _____	162
5. <i>BIBLIOGRAFÍA</i> _____	166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Destino de la producción nacional de cítricos (2004) _____	2.
Tabla 2. Nombres botánicos de cítricos comestibles (<i>Citrus ssp.</i> e híbridos) _____	10.
Tabla 3. Cambios que pueden ocurrir durante la maduración organoléptica de la fruta fresca _____	14.
Tabla 4. Temperaturas y tiempos de conservación recomendados para cítricos _____	20.
Tabla 5. Función y localización intracelular de las cinco principales clases de HSP/chaperonas en plantas _____	29.
Tabla 6. Distribución y propiedades de las sHSPs en plantas _____	34.
Tabla 7. Efecto en plantas de dos niveles de estrés por calor (<42°C y >45°C), observados inmediatamente de aplicados y luego del retorno a TA _____	40.
Tabla 8. Evolución del IC (medias y errores estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____	62.
Tabla 9. Evolución del IC (medias y errores estándar) en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____	63.
Tabla 10. Evolución del IC (medias y errores estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C _____	64.
Tabla 11. Evolución del IC (medias y errores estándar) en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____	64.
Tabla 12. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” durante la conservación a 2°C _____	68.
Tabla 13. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____	69.
Tabla 14. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” durante la conservación a 9°C _____	70.
Tabla 15. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____	70.
Tabla 16. Evolución del porcentaje de jugo (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____	73.
Tabla 17. Evolución del porcentaje de jugo (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C _____	73.

- Tabla 18.** Evolución de los SST expresados en °Brix (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____ **75.**
- Tabla 19.** Evolución de los SST expresados en °Brix (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C _____ **75.**
- Tabla 20.** Evolución de la AT expresada como g ác. cítrico/100 g fruta (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____ **76.**
- Tabla 21.** Evolución de la AT expresada como g ác. cítrico/100 g fruta (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C _____ **77.**
- Tabla 22.** Evolución del IM (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____ **79.**
- Tabla 23.** Evolución del IM (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C _____ **80.**
- Tabla 24.** Evolución del h° (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediateamente después de ser aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____ **116.**
- Tabla 25.** Evolución del h° (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____ **116.**
- Tabla 26.** Evolución del C* (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____ **117.**
- Tabla 27.** Evolución del C* (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 2°C) _____ **118.**
- Tabla 28.** Evolución del h° (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C _____ **119.**
- Tabla 29.** Evolución del h° (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____ **120.**
- Tabla 30.** Evolución del C* (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediateamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C _____ **121.**
- Tabla 31.** Evolución del C* (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____ **122.**

- Tabla 32.** Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 2°C _____ **123.**
- Tabla 33.** Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____ **123.**
- Tabla 34.** Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C _____ **125.**
- Tabla 35.** Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) _____ **125.**
- Tabla 36.** Evolución del porcentaje de jugo (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____ **127.**
- Tabla 37.** Evolución del porcentaje de jugo (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C _____ **128.**
- Tabla 38.** Evolución del contenido de SST, expresados en °Brix (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____ **129.**
- Tabla 39.** Evolución del contenido de SST expresados en °Brix (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C _____ **129.**
- Tabla 40.** Evolución de la AT expresada en g ác. cítrico/100g de fruta (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C _____ **131.**
- Tabla 41.** Evolución de la AT expresada en g ác. cítrico/100g de fruta (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C _____ **131.**
- Tabla 42.** Evolución del IM (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 2°C _____ **133.**
- Tabla 43.** Evolución del IM (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C _____ **133.**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de Frutos Cítricos en Argentina (Período 1995–2004)	2.
Figura 2. Producción regional de cítricos (%). (Año 2004)	3.
Figura 3. Producción relativa por especie. Región NOA (Año 2004)	3.
Figura 4. Producción relativa por especie. Región NEA (Año 2004)	4.
Figura 5. Producción relativa por especie en Formosa y Chaco (Año 2004)	5.
Figura 6. Principales destinos de las exportaciones Argentinas de Limones. Período 1999–2003 (Volumen en %)	7.
Figura 7. Principales destinos de las exportaciones Argentinas de Naranjas. Período 1999–2003 (Volumen en %)	8.
Figura 8. Principales destinos de las exportaciones Argentinas de Mandarinas. Período 1999–2003 (Volumen en %)	8.
Figura 9. Principales destinos de las exportaciones Argentinas de Pomelos. Período 1999–2003 (Volumen en %)	8.
Figura 10. Daño por frío en pomelos (“ pitting”) en pomelo	18.
Figura 11. Daño por frío en pomelos (“ pitting”) en pomelo	18.
Figura 12. Detalle ampliado de las lesiones mostradas en Fig. 10 y 11	18.
Figura 13. Detalle ampliado de las lesiones mostradas en Fig. 10 y 11	18.
Figura 14. Secuencia de los eventos que llevan al desarrollo de DF	21.
Figura 15. Esquema general de respuesta por HSPs ante una situación de estrés	37.
Figura 16. A. Corte transversal de la esfera de colores. B. Representación esquemática de la esfera de colores mostrando los distintos parámetros de color (Minolta, 1988)	42.
Figura 17. Representación de la esfera de colores en donde se muestra la variación de los parámetros de color (Minolta, 1988)	43.
Figura 18. Esquema de la aplicación de los tratamientos y posterior conservación de mandarinas “ Nova”	49.
Figura 19. Esquema de la aplicación de los tratamientos y posterior conservación de pomelos “ Marsh”	51.
Figura 20. IDF en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)	82.
Figura 21. Porcentaje de podredumbres en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)	85.
Figura 22. AD de las muestras de mandarinas “ Nova” durante la conservación a 2°C	87.

Figura 23. AD de las muestras de mandarinas “ Nova” durante la conservación a 9°C _____	89.
Figura 24. Polvo cetónico de una muestra representativa del flavedo de mandarinas _____	91.
Figura 25. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” control (C) durante al conservación a 2°C _____	92.
Figura 26. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” sometidas al tratamiento de desverdizado (D), durante la conservación a 2°C _____	93.
Figura 27. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” sometidas al tratamiento térmico (HS), durante la conservación a 2°C __	94.
Figura 28. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” sometidos al tratamiento combinado (HS+ D), durante la conservación a 2°C _____	95.
Figura 29. Análisis por <i>Western blot</i> de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” , control (C) y sometidos al tratamiento térmico (HS), revelado con el Ab-HSPC1 (sHSPs) _____	96.
Figura 30. Análisis por <i>Western blot</i> de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” , control y sometidos al tratamiento térmico (HS), revelado con el Ac-HSP70 _____	98.
Figura 31 Análisis por <i>dot blot</i> de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS y HS+ D, durante la conservación a 2°C, y revelados con el Ab-HSPC1 (sHSPs) _____	105.
Figura 32. Análisis por <i>dot blot</i> de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS y HS+ D, durante la conservación a 9°C, revelados con el Ab-HSPC1 (sHSPs) _____	106.
Figura 33. Análisis por <i>dot blot</i> de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS y HS+ D, durante la conservación a 2°C, revelados con el Ac-HSP70 comercial _____	107.
Figura 34. Análisis por <i>dot blot</i> de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS y HS+ D, durante la conservación a 9°C, revelados con el Ac-HSP70 comercial _____	108.
Figura 35. IDF en pomelos “ Marsh” luego de la conservación a 2°C (A) y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) (B) _____	135.
Figura 36. Porcentaje de podredumbres en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 2°C (A) y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C) (B) _____	137.
Figura 37. Porcentaje de podredumbres en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 9°C _____	138.
Figura 38. AD de las muestras de pomelos “ Marsh” durante la conservación a 2°C _____	141.

Figura 39. AD de las muestras de pomelos “ Marsh” durante la conservación a 9°C _____	142.
Figura 40. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C), durante la conservación a 2°C _____	144.
Figura 41. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C), durante la conservación a 9°C _____	145.
Figura 42. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” sometidos al tratamiento térmico por 24 h (HS24), durante la conservación a 9°C _____	146.
Figura 43. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” sometidos al tratamiento térmico por 48 h (HS48), durante la conservación a 2°C _____	147.
Figura 44. Análisis por <i>Western blot</i> de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” , sometidos al tratamiento HS48, durante la conservación a 2°C _____	149.
Figura 45. Análisis por <i>dot blot</i> de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS24 y HS48, durante la conservación a 2°C, y revelados con el Ab-HSPC1 (sHSPs) _____	151.
Figura 46. Análisis por <i>dot blot</i> de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS24 y HS48, durante la conservación a 9°C, revelados con el Ab-HSPC1 (sHSPs) _____	152.
Figura 47. Análisis por <i>dot blot</i> de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C) y sometidos a los tratamientos HS24 y HS48, durante la conservación a 2°C, y revelados con el Ac-HSP70 comercial _____	153.
Figura 48. Análisis por <i>dot blot</i> de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C) y sometidos a los tratamientos HS24 y HS48, durante la conservación a 9°C, y revelados con el Ac-HSP70 comercial _____	154.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	= anticuerpo
ACD	= dominio α -cristalino
Ag	= antígeno
AD	= Análisis Discriminante
ADN	= ácido desoxiribonucleico
AJ	= Ácido jasmónico
ARNm	= ácido ribonucleico mensajero
AT	= Acidez total
BCE	= buffer de corrida para electroforesis
BCIP	= 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfato
BD	= buffer de desarrollo
°Brix	= grados Brix
BPE	= buffer de extracción para proteínas
BT	= buffer de transferencia
C*	= valor <i>chroma</i>
DF	= daño por frío (<i>chilling injury</i>)
EDTA	= ácido etilendiamino tetraacético
ej.	= ejemplo
FAO	= <i>Food and Agriculture Organization</i>
Fig.	= figura
g	= gramos
GT	= golpe térmico (<i>heat shock</i>)
HSE	= elemento de estrés térmico (<i>heat shock element</i>)
HSF	= factor de estrés térmico (<i>heat shock factor</i>)
h°	= ángulo <i>hue</i>
h	= horas
has	= hectáreas
HSP	= proteína de estrés térmico (<i>heat shock protein</i>)
HSPn	= proteína de estrés de n kDa (ej. HSP60= proteína de estrés de 60 kDa)
HR	= humedad relativa
HWB	= cepillado e inmersión con agua caliente (“ <i>hot water brushing</i> ”)
HWD	= inmersión en agua caliente (“ <i>hot water dip</i> ”)
IC	= índice de color
IDF	= índice de daño por frío
IM	= índice de madurez
kDa	= kilodalton
L*	= valor <i>value</i>
LDH	= láctico deshidrogenasa
mA	= miliamper
ml	= mililitros
mm	= milímetros
min	= minutos
mM	= milimolar
N	= normal
nm	= nanometros

NBT	= cloruro de nitroblue de tetrazolio
NEA	= noreste argentino
NOA	= noroeste argentino
ppm	= partes por millón
P	= podredumbres
PAGE	= electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
PM	= peso molecular
PMSF	= fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PP	= pérdida de peso
ppm	= partes por millón
p/v	= peso en volumen
PVDF	= difluoruro de polivinilideno
PVPP	= polivinilpolipirrolidona
RE	= retículo endoplasmático
s	= segundos
SAGPyA	= Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
SB	= solución de bloqueo
SDS	= dodecil sulfato de sodio
sHSPs	= proteínas de estrés de bajo peso molecular (<i>small heat shock proteins</i>)
SR	= solución reveladora
SST	= sólidos solubles totales
TA	= temperatura ambiente
TBS	= tris buffer salino
TBST	= tris buffer salino conteniendo Tween 20
Tto*ti	= interacción tratamiento por tiempo
tn	= toneladas
UE	= Unión Europea
V	= voltio
v/v	= volumen en volumen
vs	= versus
µg	= microgrmo
µm	= micrómetro

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PRODUCCIÓN NACIONAL DE CÍTRICOS

1.1.1 Producción nacional y evolución de la superficie cultivada

Dentro de la fruticultura nacional, el sector citrícola argentino ocupa, desde el punto de vista socioeconómico, el segundo lugar detrás de la vitivinicultura.

Este sector se desarrolla sobre una superficie de 147.466 hectáreas (has) (SAGPyA, 2004), de las cuales el 37,5% corresponde a naranjas, el 24,5% a mandarinas, la superficie cubierta con pomelos alcanza el 8,3% y la correspondiente a limones aporta el 29,7%.

La producción nacional en el año 2004, alcanzó 2.737.105 toneladas (tn) distribuidas de la siguiente forma: limón 49,0%, Naranja 26,9%, Mandarina 17,7% y Pomelo 6,5%.

Esta breve referencia destaca el lugar preponderante que este sector frutihortícola posee en la economía de nuestro país.

1.1.2 Nivel de ocupación

Según datos provenientes de SENASA y de la Federación del Citrus de Entre Ríos (Fedecitrus), el nivel de actividad generado por la citricultura nacional comprende 5.300 productores, 529 empacadoras de las cuales 79 trabajan para la exportación, y 16 plantas industriales, ocupando a unos 100.000 trabajadores en su totalidad.

El cultivo que presenta mayor dinamismo es el de los limones, mientras que las producciones de mandarinas y naranjas presentan continuas fluctuaciones, generalmente debido a variaciones climáticas y a su gran dependencia con el mercado interno. La escasa fluctuación de los pomelos en el mercado es consecuencia de la inmovilización del consumo interno y de las exportaciones. La **Fig. 1** muestra la evolución de la producción de frutos cítricos desde el año 1995 hasta el 2004.

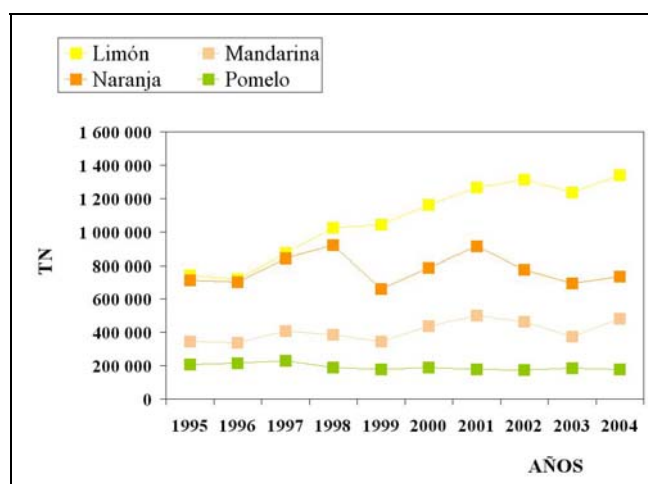


Figura 1. Producción de Frutos Cítricos en Argentina (Período 1995-2004)

1.1.3 Destino de la producción de frutas cítricas frescas

La Tabla 1 muestra el destino de los cítricos producidos en el país durante el año 2004, indicándose los porcentajes sólo para las principales especies.

Tabla 1. Destino de la producción nacional de cítrico (2004)

	Industria (%)	Consumo Interno (%)	Exportación En fresco (%)
Limón	74,0	4,4	12,5
Mandarina	12,5	72,5	14,9
Naranja	19,3	60,4	20,2
Pomelo	45,6	34,8	19,5

Fuente: Elaborado con datos de SENASA, Federcitrus, CICA e INTA.

1.1.4 Distribución Regional de la Citricultura Argentina

La actividad citrícola argentina se desarrolla en regiones bien definidas:

- Región noroeste (NOA): Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca.
- Región Mesopotámica (NEA): Misiones, Corrientes y Entre Ríos.
- Nordeste de Buenos Aires.
- Resto del país: Formosa, Santa Fe y Chaco, etc.

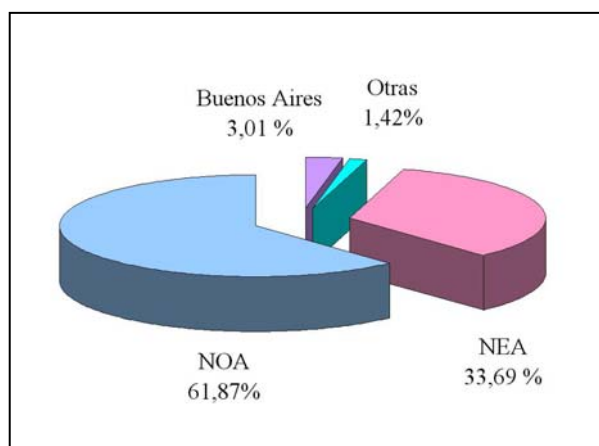


Figura 2. Producción regional de cítricos (%). (Año 2004)
Fuente: datos de informes Cítricos regionales INTA

1.1.4.1 Región NOA

Esta región representa a nivel nacional el 43,5% del total de la superficie implantada en nuestro país, y aproximadamente el 62,0% del volumen de producción nacional de cítricos, siendo el limón y la naranja las principales especies (**Fig.3**).

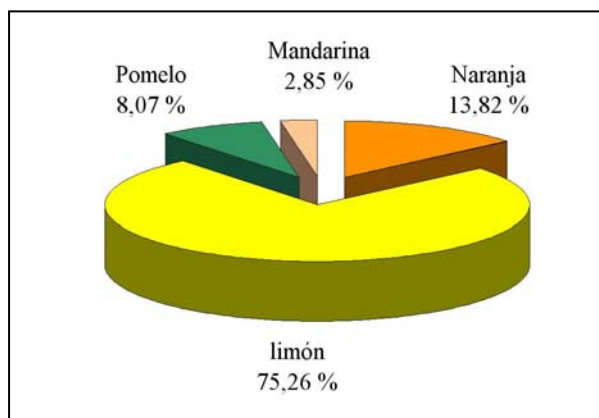


Figura 3. Producción relativa por especie. Región NOA (Año 2004)
Fuente: datos de informes Cítricos regionales INTA

1.1.4.2 Región NEA

En la región del NEA se halla plantada el 51,0% de la superficie total del país, en tanto que la producción regional alcanza el 34,0% del total nacional. Las especies más representativas son la naranja y la mandarina (**Fig. 4**).

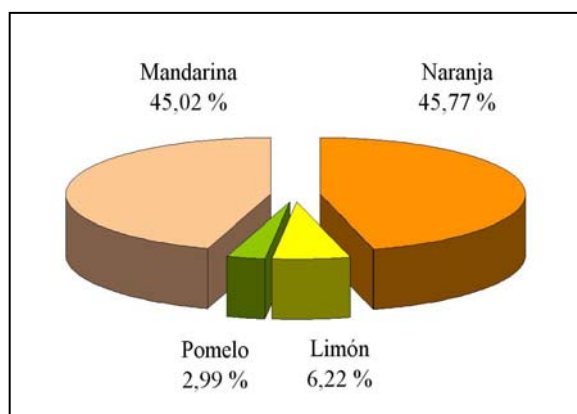


Figura 4. Producción relativa por especie. Región NEA (Año 2004)
Fuente: datos de informes Citricolas regionales INTA

1.1.4.3 Buenos Aires

La zona citrícola se sitúa en el nordeste de la Provincia de Buenos Aires, comprendiendo los Partidos de San Pedro, Baradero, San Nicolás, Zárate y Ramallo. En esta región, la citricultura se lleva a cabo conjuntamente con la producción de frutas de carozo. La superficie plantada de cítricos es de unas 5.400 has, lo que equivale al 3,7% del total nacional, mientras que la producción es de 82.500 tn representando el 3,0% del conjunto de la producción argentina. La naranja, con el 80,0% de la producción citrícola regional, es la especie predominante.

1.1.4.4 Otras regiones del país

Las Provincias de Chaco, Formosa y Santa Fe producen frutas cítricas sobre una superficie de aproximadamente 2.350 has, aportando volúmenes cercanos a las 40.000 tn (**Fig. 5**).

Argentina posee una excelente aptitud para la producción de frutos cítricos debido a sus características ecológicas. Las plantaciones se localizan en regiones que poseen un alto grado de especialización. Consecuentemente, la comercialización de los productos frutícolas constituye uno de los aspectos clave de la actividad agropecuaria.

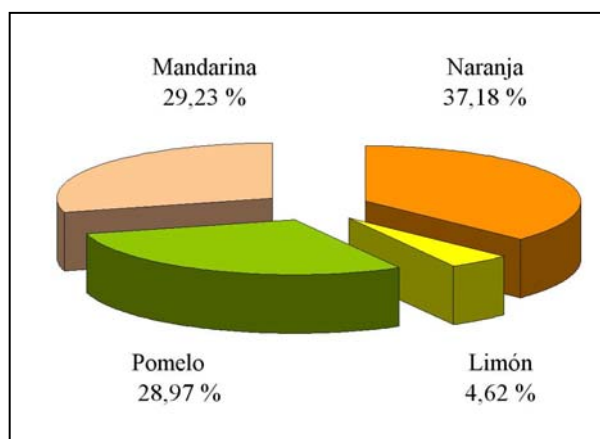


Figura 5. Producción relativa por especie en Formosa y Chaco (Año 2004)
Fuente: datos de informes Citrícolas regionales INTA

En los últimos años, los cítricos se transformaron en un rubro dinámico del comercio exterior argentino, mostrando una participación creciente en el total de las exportaciones agropecuarias. El mercado interno reveló diferencias significativas en el nivel de consumo asociado a los distintos estratos de la población. El consumo más elevado se asoció a los grupos de mayor poder adquisitivo, existiendo por lo tanto un alto potencial de desarrollo para este mercado.

1.2 CONTEXTO INTERNACIONAL

La producción y la comercialización de cítricos están afectadas por la estacionalidad, presentándose los denominados períodos de “ estación” y “ contraestación” . Los países del Hemisferio Norte son los mayores productores y consumidores de cítricos, aportando entre el 70 y el 80% de la producción mundial, el resto proviene de países del Hemisferio Sur. La posición geográfica de la Argentina le ha permitido convertirse en un proveedor de fruta cítrica fresca confiable durante la primavera y el verano boreal.

1.2.1 Naranja

Es la primera especie cítrica comercializada en el mundo, siendo España el principal exportador, con 1.4 millones de tn en el año 2003. Por el contrario, Brasil

es el primer productor a nivel mundial, con 15 millones de tn, contribuyendo con un 28% de la producción total. En Argentina, la producción estimada es de 725.000 tn.

1.2.2 Limón

España es también el primer oferente mundial de limones con 610.000 tn. Las exportaciones de limones por parte de EEUU alcanzaron las 98.000 tn.

Argentina logró aumentar el ritmo de las exportaciones de limones alcanzando las 334.000 tn en año 2003. El incremento se debió principalmente a las nuevas plantaciones, a la renovación de montes viejos, a las condiciones climáticas favorables y a una mejor conducción de los montes. El porcentaje que se derivó a la industria fue del 76,0%, correspondiendo a Argentina el primer lugar como exportador mundial de jugo concentrado de limón.

1.2.3 Mandarina

Las mandarinas aportan el 11% de la producción mundial de cítricos. China es el primer productor con 6.5 millones de tn.

La producción argentina es de muy buena calidad, y por este motivo es requerida en el mercado de fresco en contraestación, alcanzando un 3% de la producción mundial (alrededor de 324.000 tn).

Es necesario destacar la importancia que tienen las variedades en el aspecto comercial. A manera de ejemplo, las mandarinas más demandadas en los mercados internacionales son las de fácil pelado, con pocas semillas (tipo Satsumas y Clementinas). Estas variedades logran buenos precios en el exterior y pueden también ser comercializadas a precios aceptables en el mercado local.

1.2.4 Pomelo

La producción mundial de pomelos es de aproximadamente 5 millones de tn, lo que representa el 7% de la producción total de cítricos, destacándose que la cantidad producida no ha experimentado grandes variaciones en los últimos diez años. El principal productor y exportador en fresco a nivel mundial es EEUU, con 1.8 millones tn. Otros países con producciones significativas son China, con 330.000 tn, Sudáfrica

con 280.000 tn, Cuba y Méjico con aproximadamente 270.000 tn. La Argentina se ubica como sexto productor mundial, con 180.000 tn, lo que representa aproximadamente un 3,6% sobre el total mundial. Dentro del país, el mayor aporte lo hace la región del NOA, con más de 126.000 tn, siendo las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán las de mayor producción. En lo que se refiere a exportación, existe una importante participación de la provincia de Salta, con un 48% del total y de Entre Ríos, con el 16%. Analizando por regiones, las provincias del NOA aportan el 67% de las exportaciones totales, mientras que las provincias del NEA alcanzan una participación del 27%.

1.2.5 Mercado Externo

El mercado internacional de frutas cítricas frescas es altamente competitivo. Las frutas argentinas compiten a nivel internacional con las producciones de Sudáfrica, Nueva Zelanda, Uruguay y Brasil entre otras, que son también países proveedores del Hemisferio Sur.

1.2.6 Destino de las exportaciones

Las exportaciones argentinas tienen a la Unión Europea (UE) como destino excluyente, situación que no ha variado sustancialmente en los últimos años. En las Fig. 6, 7, 8 y 9, pueden observarse los principales destinos de las exportaciones Argentinas para los diferentes frutos cítricos.

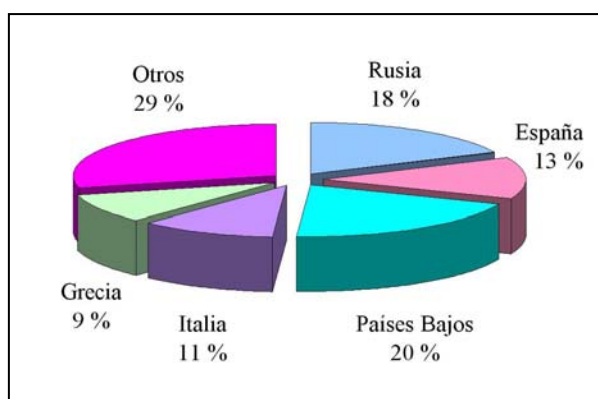


Figura 6. Principales destinos de las exportaciones Argentinas de Limones. Período 1999-2003 (Volumen en %)

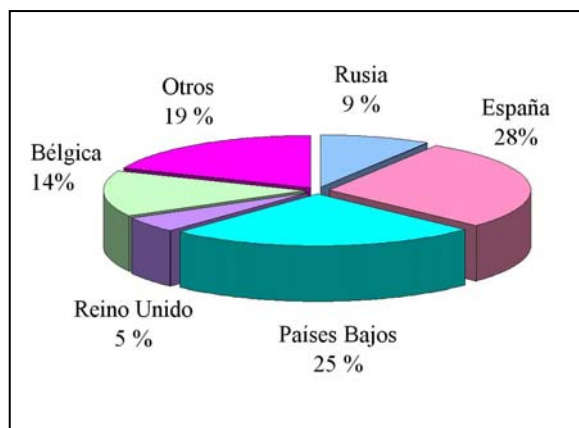


Figura 7. Principales destinos de las exportaciones Argentinas de Naranjas. Período 1999-2003 (Volumen en %)

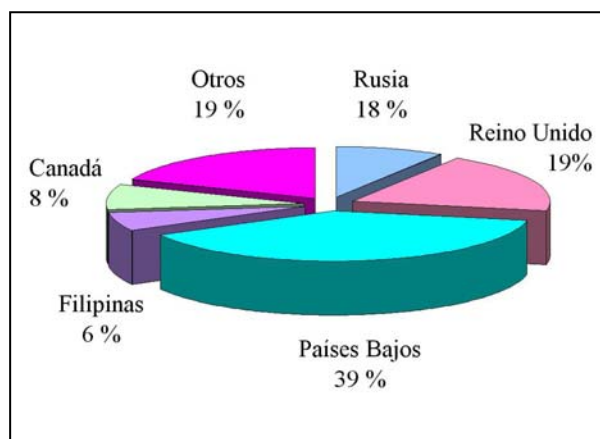


Figura 8. Principales destinos de las exportaciones Argentinas de Mandarinas. Período 1999-2003 (Volumen en %)

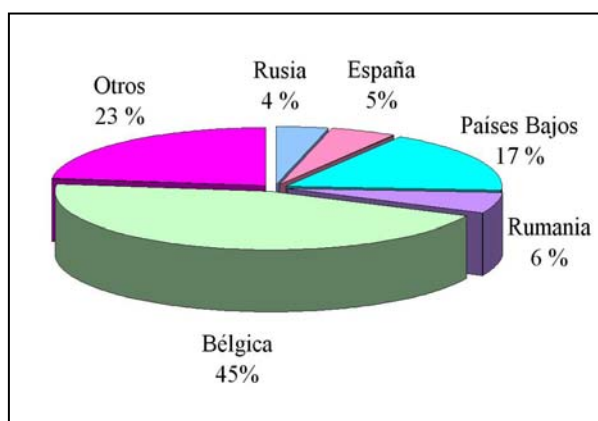


Figura 9. Principales destinos de las exportaciones Argentinas de Pomelos. Período 1999-2003 (Volumen en %)

La campaña correspondiente al período 2003–2004 significó un récord. Los envíos de fruta fresca al mercado externo representaron un aumento del 35% respecto de la campaña anterior, en comparación con el 17% de aumento registrado en 2002–2003.

Luego de ocho años de negociaciones comerciales y sanitarias, Argentina logró en abril del 2003 la apertura del mercado Japonés para la exportación de cítricos frescos, especialmente pomelos y limones. Este mercado es uno de los más exigentes del mundo en materia de calidad, sanidad y compromiso de cumplimiento. La apertura se concretó cuando el Ministerio de Agricultura, Pesca y Bosques del Japón (MAFF) aprobó un protocolo fitosanitario de tratamiento en frío para el control de la mosca de los frutos (Guidi *et al.*, 2000). En junio de 2003 se concretó la primera exportación de 800 tn de limones desde Tucumán. Esta cantidad, si bien no es importante, marca un hito en la historia de la citricultura nacional.

1.2.7 Perspectivas

El sector cítrico viene manifestando un continuo crecimiento de su producción y un importante desarrollo de sus exportaciones tanto de productos frescos como procesados (jugos y aceites esenciales). Sin embargo, ciertos problemas como el desarrollo de desórdenes fisiológicos durante el transporte a bajas temperaturas, impiden desarrollar la exportación en todo su potencial (SAGPyA, 2004).

1.3 FRUTOS CÍTRICOS: GENERALIDADES

Los frutos cítricos son reconocidos en todo el mundo por su “ flavor” y su valor nutricional. Si bien son originarios del sur de Asia, actualmente se cultivan en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, desde los 40° de latitud norte hasta los 40° latitud sur (Baldwin, 1993).

Según datos de la FAO, la superficie mundial de cítricos en el año 2004 alcanzó los 7,4 millones de has, mientras que la producción superó los 108 millones de tn (SAGPyA, 2004). Además del consumo “ en fresco” , existen muchos productos procesados que derivan de ellos, como ser: los concentrados de jugo de naranja congelados, jugos frescos, pulpa, pectinas, aceites esenciales, flavonoides y ácido cítrico proveniente de limones y limas (Samson, 1986).

1.3.1 Taxonomía y cultivos

Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae y subfamilia Aurantioideae. En la **Tabla 2** se dan los nombres científicos y comunes de los cítricos de mayor importancia económica.

Tabla 2. Nombres botánicos de cítricos comestibles (*Citrus ssp.* e híbridos)

Nombre Botánico	Nombre común
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce
<i>Citrus aurantium</i>	Naranja amarga
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarina
<i>Citrus paradisi</i>	Pomelo
<i>Citrus grandis</i>	Pomelo
<i>Citrus limon</i>	Limón
<i>Citrus medica</i>	Lima
<i>Citrus aurantifolia</i>	Naranja Trifoliata
<i>Poncirus trifoliata</i>	Kumquat
<i>Fortunilla margarita</i>	
Híbridos comunes	
Tangor = mandarina	x naranja dulce
Tangelo = mandarina	x pomelo
Lemonime = limón	x lima
Citrange = naranja dulce	x <i>Poncirus</i>
Citrumelo = pomelo	x <i>Poncirus</i>
Limequat = Lima	x Kumquat
Citrangequat = oval kumquat	x “Rusk” citrange
Calamansi = mandarina	x kumquat

Fuente: Baldwin, E.A. (1993).

1.3.1.1 Naranjas dulces

Estas frutas se encuentran divididas en tres grupos: naranja sanguínea, Navel y naranjas comunes. Dentro del último grupo, la variedad Valencia representa el cultivo de mayor importancia económica debido a su adaptabilidad, contenido de jugo, excelente color y buen flavor.

1.3.1.2 Mandarinas

Las mandarinas (incluyendo las tangerinas) se dividen en cinco grupos: Satusma, King, Willowleaf, común y frutas pequeñas. El grupo común de mandarinas,

conocidas en el oeste como tangerinas, incluye a las variedades Clementina, Dancy y Ortanique (Jamaica).

1.3.1.3 Pomelos

Los pomelos se dividen en dos grupos: cultivos blancos y pigmentados. Dentro del primer grupo se encuentran los pomelos Duncan, mientras que entre los pigmentados se encuentran: Star Ruby, Ruby Red, Rio y Flame.

1.3.1.4 Limones y limas

Los limones son sensibles tanto al calor como al frío. Las variedades Eureka y Lisboa son de gran importancia, creciendo en climas similares al del Mediterráneo. Por su parte las limas se adaptan más a climas tropicales y se las divide en dos grupos: ácidas y dulces.

1.3.2 Calidad

Los consumidores de frutos cítricos de los países desarrollados son cada vez más exigentes, por lo que su calidad debe garantizarse desde el empaque en origen, durante la comercialización y continuar hasta el momento del consumo.

Según la Real Academia Española, “calidad” es el conjunto de propiedades inherentes a un producto, que permiten apreciarlo como igual, mejor o peor que otros productos similares. También, se ha definido a la calidad de un producto como “todas las características que determinan su valor, por parte del consumidor, y que se corresponden con su normativa legal”. El concepto de calidad de un producto está muy relacionado tanto con las “cualidades” propias de éste, como con las características que le imparten al mismo el/los procesos que se han sucedido desde su origen (producción) hasta su llegada a manos del consumidor. Es importante que los factores de calidad puedan ser descriptos objetivamente y/o cuantificados de alguna manera. En el caso de los frutos cítricos se consideran:

- *Factores Intrínsecos*: aquellos relacionados al producto en sí, y pueden ser medibles o no. A los primeros se los llama parámetros y a los segundos

atributos. Entre los parámetros se encuentran el tamaño, el peso, el color, la textura, el porcentaje de jugo, los sólidos solubles, el contenido en ácido cítrico, el índice de madurez (IM), el contenido vitamínico y proteico, y la concentración de volátiles (Abbot, 1999). Entre los atributos se pueden mencionar la forma, la integridad, el estado de desarrollo, la facilidad de desprendimiento de la corteza, la sanidad (ausencia de alteraciones fisiológicas, plagas, enfermedades, etc.), el sabor, la comestibilidad, el olor, etc. Los atributos no pueden ser medidos en forma objetiva, aunque es posible evaluarlos mediante el análisis sensorial y en algunos casos, relacionarlos con parámetros medibles (Mazzuz & Del Río, 1997).

- *Factores extrínsecos*: no dependen del producto en sí, pero son componentes importantes de su calidad. Algunos de ellos son: presentación del producto, homogeneidad, facilidad de consumo y tipo de envase y embalaje.

1.3.3 Manejo Poscosecha de cítricos

Los cítricos son producidos en áreas tropicales y subtropicales, a menudo distanciados de los principales centros de consumo. En muchos casos, en el momento de la cosecha la demanda es escasa o los mercados están saturados, en consecuencia es necesario almacenar los frutos hasta que la situación económica sea más favorable. Por lo tanto, entre la cosecha y el consumo, pueden transcurrir períodos que van desde una semana hasta varios meses (Eckert & Eaks, 1989).

Un importante aspecto a tener en cuenta durante el manejo poscosecha es que luego de la cosecha la fruta continúa “viva”, esto implica que continúan muchas de las reacciones metabólicas y se mantienen activas muchas de las funciones fisiológicas que poseía en la planta. En consecuencia, un importante objetivo es desarrollar tecnologías que minimicen el deterioro de estos productos durante todas las etapas, desde la cosecha hasta su consumo. Este objetivo requiere conocer la fisiología del fruto y estudiar en profundidad aquellos factores que puedan contribuir a la pérdida de la calidad. Las causas que provocan pérdida poscosecha son muchas, pero pueden ser clasificadas en dos categorías principales. La primera es la pérdida física, que puede surgir de daños estructurales o alteraciones de origen microbiano.

Esto produce la degradación de los tejidos hasta un estado en donde los frutos no son más aceptables ni para el consumo en fresco, ni para el procesamiento. Las pérdidas físicas también pueden originarse por la evaporación de agua intercelular, que lleva directamente a la pérdida de peso (PP). La segunda causa es la pérdida de la calidad, que se produce como consecuencia de cambios fisiológicos y de la composición. Estos cambios alteran la apariencia, el gusto y/o la textura, transformando a los productos en menos deseables para el consumidor. Los mismos pueden originarse por un metabolismo anormal de la fruta o por eventos anormales provocados por las condiciones ambientales durante la conservación (Wills *et al.*, 1998).

Las pérdidas poscosecha causadas por alteraciones fisiológicas y patológicas son variables y dependen de la región de producción, tipo de fruta, edad y estado sanitario del árbol, condiciones ambientales durante el cultivo y la cosecha, efectividad de los tratamientos fungicidas y manejo poscosecha de la fruta (Eckert & Eaks, 1989). Se estima que entre el 25 y el 80% de la fruta se pierde tras la recolección (Wills *et al.*, 1998). El manejo poscosecha influye de manera importante sobre la rentabilidad final, debido a que suele ser el origen de numerosos daños internos y externos que afectan la calidad de los frutos y en consecuencia modifican el costo durante la comercialización.

En el caso de los cítricos, la principal causa de deterioro fisiológico es el estrés hídrico que se produce luego de la separación del fruto de la planta madre. En el caso de las mandarinas, esta situación es más grave dado que el fruto posee una elevada relación superficie/volumen y poco espesor de corteza (Martínez-Jávega & Del Río, 1998). La transpiración no sólo causa desecación, arrugamiento y ablandamiento del fruto, sino que también acelera la senescencia. Durante el almacenamiento a baja temperatura, se reduce el gradiente de potencial del agua entre el fruto y la atmósfera de almacenamiento, disminuyéndose en parte la velocidad de pérdida de agua debido a la transpiración.

1.3.4 Maduración

La fruta pasa a lo largo de su desarrollo por una serie de etapas, caracterizadas por una secuencia continua de cambios metabólicos. En este sentido,

pueden identificarse tres etapas fisiológicas fundamentales: crecimiento, maduración y senescencia. Sin embargo, debido a que los distintos tipos de frutas difieren considerablemente entre sí en cuanto a su conducta madurativa, no es fácil asignar parámetros bioquímicos o fisiológicos específicos para identificar de manera universal cada una de estas etapas.

La etapa más importante y compleja en el desarrollo de la fruta es el proceso de maduración. Ésta puede dividirse, a su vez, en dos fases: la fase de maduración fisiológica (“*maturation*”) y la de maduración organoléptica (“*ripening*”) (Rhodes, 1971). La primera suele iniciarse antes de que termine el crecimiento celular y finaliza, más o menos, cuando el fruto tiene las semillas en disposición de producir nuevas plantas. La maduración fisiológica sólo se completa adecuadamente en el árbol. La maduración organoléptica hace referencia al proceso por el cual las frutas adquieren las características sensoriales que las hacen apetecibles para el consumidor. Este proceso transforma un tejido fisiológicamente maduro pero no comestible en otro visual, olfativo y gustosamente atractivo (Leopold & Kriedemann, 1975). En general, este proceso comienza durante los últimos días de la maduración fisiológica y conduce irreversiblemente a la senescencia de la fruta (**Tabla 3**). A diferencia de la maduración fisiológica, la maduración organoléptica puede completarse tanto en el árbol como luego de la recolección de la fruta, aunque el resultado difiere significativamente.

Tabla 3. Cambios que pueden ocurrir durante la maduración organoléptica de la fruta fresca

Maduración de la semilla
Abscisión (separación de la planta parental)
Cambios en la tasa de respiración
Cambios en la tasa de producción de etileno
Cambios en la permeabilidad de tejido y compartimentalización celular
Ablandamiento: cambios en la composición de sustancias pectinas
Cambios en la composición de carbohidratos
Cambios en los ácidos orgánicos
Cambios proteicos
Producción de volátiles del flavor
Desarrollo de cera en la piel

Fuente: Pratt (1975)

En base a su conducta madurativa, la fruta puede clasificarse en dos tipos: “ climatéricas” y “ no climatéricas” . En los frutos climatéricas (ej. manzana, pera, tomate, banana, etc.), el proceso de madurez es un proceso que involucra un gran número de cambios físicos y bioquímicos que pueden ocurrir antes o después de la cosecha. El inicio de la maduración climatérica es un proceso bien definido, caracterizado por un aumento rápido de la velocidad de respiración y de la producción de etileno por parte de la fruta. Este momento es conocido como “ pico climatérico” . Las frutas climatéricas sufren una maduración brusca y presentan grandes cambios en el color, la textura y la composición. Habitualmente se las cosecha en estado pre-climatérico, y se almacenan en condiciones controladas para regular la maduración hasta el momento de la comercialización (Wills *et al.*, 1998). En cambio, en los frutos “ no climatéricos” (ej. cítricos, uva, frutilla, etc.), la “ maduración” no se produce en un momento definido, sino como un proceso gradual en el cual las frutas presentan cambios lentos en su aspecto y composición. A diferencia de las frutas climatéricas, el grado de madurez apropiado sólo se alcanza en el árbol y se puede determinar para cada tipo de fruta IM característicos. Para obtener una fruta de calidad adecuada, la recolección se hace después de la maduración, ya que si no se alcanza el punto óptimo el proceso de maduración no continúa y se producen ablandamientos. Los cambios que se presentan después de la cosecha son de una magnitud muy inferior a los de los frutos climatéricos.

Si la fruta no climatérica es cosechada inmadura, aunque reciba un adecuado manejo poscosecha, presentará una calidad inferior a la cosechada en la madurez óptima, y además son muy susceptibles a manifestar desórdenes fisiológicos que limitan considerablemente el período de almacenamiento y la aptitud comercial. Por otra parte, una fruta excesivamente madura no resistirá un almacenamiento prolongado, debido entre otras cosas, a la pérdida de consistencia de la pulpa y al aumento de la predisposición a sufrir ciertas alteraciones fisiológicas y ser atacado por microorganismos causantes de pudriciones.

En el caso de las mandarinas y las naranjas, el valor del IM en el momento de la recolección de los cítricos es determinante para la calidad final de la fruta, debido a que durante el almacenamiento frigorífico se produce un incremento del mismo, pudiendo alcanzar valores que se corresponden con sabores de una cierta insipidez

(Mazzuz & Del Río, 1997). Además, si los valores de IM iniciales son muy elevados, las concentraciones de volátiles al final de la conservación pueden ser demasiado altos, con la consiguiente repercusión negativa en el sabor y el aroma. En otras frutas como las limas, limones y pomelos, los cambios en el IM no son determinantes de la duración de la conservación. En los cítricos en general, la firmeza inicial limita la vida útil, ya que puede ocurrir un excesivo ablandamiento durante la conservación. Esta pérdida de firmeza se correlaciona, en general, con pérdidas de agua por transpiración (Martínez-Jávega, 1999).

Es importante mencionar que en el caso de algunos frutos cítricos, a pesar de ser frutos no climatéricos, la coloración externa luego de la cosecha puede modificarse por la aplicación de etileno (Guardiola, 1992/93) en un proceso denominado “desverdización”. Por lo tanto el color de un fruto no es un buen indicador de la madurez del mismo.

1.3.5 Daño por frío

La frigoconservación es una de las herramientas más importantes para mantener la calidad poscosecha de las frutas y hortalizas, debido a que preserva sus propiedades organolépticas y nutritivas. Las bajas temperaturas retrasan el envejecimiento, reducen el ritmo respiratorio, disminuyen la actividad enzimática y microbiana, retardan la maduración, y disminuyen el déficit de presión de vapor entre el producto y el ambiente, minimizando así la transpiración (Martínez-Jávega, 1996). Desde el punto de vista comercial, la aplicación de frío permite: prolongar el período de comercialización de variedades tardías para aprovechar períodos más favorables, mantener la calidad durante el transporte a mercados distantes, actuar de pulmón para abastecer la línea de almacén cuando las condiciones climatológicas no permiten la recolección, conservar los frutos durante los períodos de alto riesgo de helada en campo, dilatar el abastecimiento a las fábricas de derivados cítricos. Este procedimiento puede utilizarse también como tratamiento cuarentenario para el control de insectos en frutos exportados a países que exigen este requisito (Martínez-Jávega, 1996).

Los cítricos, por ser de origen tropical y subtropical, presentan una especial sensibilidad a las bajas temperaturas de almacenamiento (Salveit & Morris, 1990),

produciéndose alteraciones de naturaleza fisiológica conocidas generalmente como **daño por frío (DF)** (“ *chilling injury*”). El DF resulta de la exposición de los tejidos susceptibles a temperaturas por debajo de los 15°C, pero por encima del punto de congelación del producto. Es importante destacar que el mecanismo de desarrollo del DF es diferente al del daño por congelación, ya que este último se produce como consecuencia de la formación de cristales durante el congelamiento y la consecuente destrucción de tejidos.

El DF generalmente se presenta en el pericarpio de la fruta (Watkins *et al.*, 1995). En los cítricos, los síntomas de DF no sólo dependen de la especie y del cultivo, sino también de la madurez, tipos de tejidos, y de factores ambientales, como ser la humedad durante el almacenamiento (Grierson, 1981; Wang, 1984). En general, los pomelos son más susceptibles que las naranjas a los daños causados por las temperaturas de enfriamiento.

La sintomatología más común de DF es el “ **picado**” (“ *pitting*”), caracterizado por depresiones en la piel de forma más o menos circular, con una ligera decoloración que posteriormente adquiere una tonalidad parda o rosada. Estas lesiones tienden a unirse, determinando una zona de demarcación bien definida entre las lesiones y el tejido epidérmico sano. En general, los frutos de piel delgada y los menos maduros son más susceptibles a desarrollar este tipo de sintomatología.

Las **Fig. 10** y **11**, muestran frutos de pomelo con DF (“ *pitting*”), y las **Fig. 12** y **13**, detalles ampliados de estas zonas.

En frutos almacenados a temperaturas cercanas a los 0°C, puede desarrollarse una alteración conocida como “ **escaldado**” ó “ **bronceado**” , que se manifiesta como un oscurecimiento difuso de la piel, de forma irregular y que se extiende paulatinamente por la superficie del fruto. En pomelos y tangelos, puede producirse un ennegrecimiento de las “ **glándulas de aceite**” (“ *oil-gland darkening*”). A esta alteración contribuye la alta humedad relativa del almacenamiento, pudiendo a veces confundirse con el escaldado (Grierson, 1981).

Otro síntoma de DF menos frecuente que los anteriores, es la “ **descomposición o podredumbre acuosa**” (“ *watery breakdown*”). Esta alteración afecta tanto a la pulpa como a la piel, los frutos presentan un aspecto blando y esponjoso, similar al que se observa en frutos congelados.

El DF puede inducir el desarrollo de olores desagradables (“ *off-flavor* ”), la pérdida del aroma, la apariencia de aguachento, y de pardeamiento interno (Hardenburg *et al.*, 1990).



Figuras 10 y 11. Daño por frío (“ *pitting* ”) en pomelo



Figuras 12 y 13. Detalle ampliado de las lesiones mostradas en Fig. 10 y 11

Las manifestaciones del DF son función del tiempo y de la temperatura. Un período corto a una cierta temperatura por debajo del umbral de daño puede no producir el desarrollo de esta sintomatología. Sin embargo, una exposición prolongada podría provocar un daño irreversible, cuya magnitud puede a su vez incrementarse con el tiempo. A la inversa, el desarrollo de DF en productos sensibles

será mayor, cuanto más próxima al umbral de daño se encuentre la temperatura de conservación, aún cuando el período de exposición sea corto (Wills *et al.*, 1998). Si bien la manifestación del DF puede darse en la propia cámara de conservación, para que esto ocurra es necesario un tiempo mínimo de permanencia del fruto en el frío. Este período de “latencia” depende de la variedad, y es, por ejemplo, de aproximadamente 7 días en mandarinas “Fortuna” y de 30 días en la especie “Nova”. Por lo tanto, el riesgo de aparición de los síntomas de DF será mayor cuanto mayor sea el tiempo de permanencia en cámara y menor sea la temperatura ambiente. Es importante hacer notar que los síntomas se aprecian generalmente luego de la remoción del producto de la temperatura causante del daño y posterior exposición a temperaturas ambiente o mayores. En estas condiciones, la evolución del daño suele ser bastante rápida, e inclusive presentarse en el lapso de unas pocas horas (Martínez-Jávega, 1996).

El DF provoca la liberación de metabolitos a nivel celular, tales como aminoácidos, azúcares y sales minerales. La presencia de estos metabolitos, junto con la degradación de la estructura celular, constituye una excelente condición para el crecimiento de organismos patógenos, especialmente de hongos. Estos patógenos pueden estar presentes como infecciones latentes previo a la cosecha, o bien pueden contaminar el producto durante la cosecha, el empaque, el transporte o la comercialización. Es bastante frecuente el desarrollo de podredumbres en productos tropicales luego del almacenamiento a bajas temperaturas.

En la **Tabla 4** se detallan las temperaturas recomendadas para la conservación de algunas variedades de cítricos. De manera general puede decirse, que éstas son tanto más elevadas cuanto mayor es la susceptibilidad al DF de la variedad en cuestión (Martínez-Jávega, 1996). Las condiciones de almacenamiento que se exhiben en esta tabla suelen aplicarse también en el transporte refrigerado, práctica que cada vez está siendo más extendida y exigida por el comercio.

Las bajas temperaturas y la susceptibilidad varietal son determinantes en la aparición de DF. Se ha comprobado que las variedades de mandarinas “Clementina” y “Clemenules” son más resistentes que las “Nova” y “Fortuna” (Sala, 1998).

Tabla 4. Temperaturas y tiempos de conservación recomendados para cítricos

Productos	Temperatura (°C)	Tiempo (meses)	Productos	Temperatura (°C)	Tiempo (meses)
Mandarinas			Naranjas		
Clementina	4-5	1,5-2,5	Blanca común	2-3	2,5-3,5
Ellendale	5-6	2,0-2,5	Navel Washing.	2-3	2,5-3,5
Murcott	6-7	1,5-2	Navelate	3-4	2-3
Nova	9-10	0,5-1	Navelina	2-3	4-5
Ortanique	5-6	2,5-3	Salustiana	2-3	4-5
Satsuma	1-2	1,0-1,5	Valencia late	2-3	4-5
			Verna	2-3	2,5-3,5
Limas	9-10	1,5-2,5	Pomelos	11-12	2-3
Limones					
Fino	11-12	3-4			
Verna	13-14	4-5			

Fuente: Martínez-Jávega (2002).

También existen otros factores que influyen en el desarrollo de DF. Los frutos inmaduros o precoces son más sensibles al frío que los maduros o tardíos de la misma cosecha, con independencia de que sean frutos climatéricos o no. Por ejemplo, en tomate “Daniela” los frutos pintones son menos sensibles al DF que los verdes (Artés, 1999). Por otra parte, los frutos más pequeños son, en general, más susceptibles al DF dada las mayores pérdidas de agua por transpiración que experimentan. A su vez, los frutos recolectados de la parte externa del árbol son más sensibles que los de la parte interna debido a su mayor exposición a modificaciones climáticas (Martínez-Jávega, 2002). Otros factores que también afectan la resistencia de un fruto al DF son genéticos, fisiológicos y bioquímicos, e incluso las condiciones térmicas del cultivo (Marcellin & Urlich, 1983; Luchsinger & Artés, 2000).

1.3.5.1 Mecanismo de desarrollo del daño por frío

Dentro del modelo propuesto en la actualidad para explicar el DF, se postula que el desarrollo del mismo incluye dos tipos de eventos principales:

- *Eventos primarios*: las células de la planta “sensan” la disminución de la temperatura. Estos eventos son instantáneos y reversibles, al menos, por un período corto de tiempo.

- *Eventos secundarios* o respuesta a largo plazo: son eventualmente irreversibles y ocasionan, en última instancia, la muerte celular.

Este concepto es ilustrado en la **Fig. 14**.

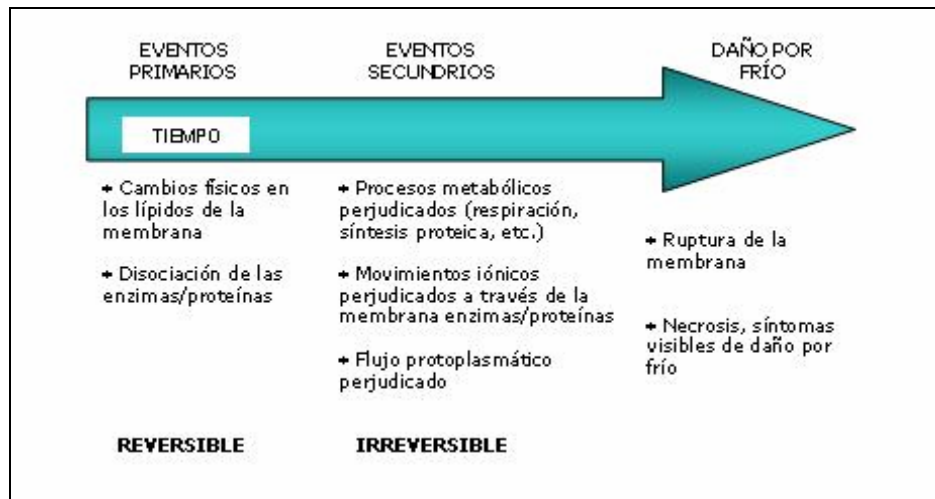


Figura 14. Secuencia de los eventos que llevan al desarrollo de DF
Fuente: Wills *et al.*, 1998

Las dos causas principales postuladas como responsables del desarrollo de la sensibilidad al frío son:

1. *Las bajas temperaturas inducen cambios en las propiedades físicas de las membranas celulares, debido a cambios en el estado fisiológico de los lípidos de la membrana. Estas pasan de un estado flexible a uno rígido (llamada también “hipótesis lipídica del frío”).*

Esta hipótesis es apoyada por evidencias obtenidas mediante técnicas físicas como calorimetría diferencial de barrido, resonancia de spin electrónico y polarización de fluorescencia de moléculas intercaladas en las membranas celulares. Luego de un cierto tiempo de exposición, los cambios producidos en las membranas generarían diversas respuestas secundarias como pérdida de su integridad, aumento de la actividad respiratoria, interferencia en la producción de energía, disminución de las corrientes protoplasmáticas y la pérdida de la compartimentalización celular (Kays, 1991; Wills *et al.*, 1998).

2. *Las bajas temperaturas inducen la disociación de subunidades estructurales de las enzimas y otras proteínas, que resultan en cambios en la cinética enzimática y/o en cambios estructurales de ciertas proteínas como la tubulina* (Graham & Patterson, 1982; Wills *et al.*, 1998).

En estudios realizados en plantas y animales, existen evidencias que indican que varias enzimas del metabolismo celular sufren disociación a temperaturas cercanas a los 0°C. Algunas enzimas multiméricas se disocian en sus subunidades, con la consecuente pérdida de la actividad metabólica y cambios en alguna de las propiedades cinéticas. Se encontrarían afectadas algunas enzimas del metabolismo respiratorio y fotosintético. La consecuencia de tales cambios en la actividad de las enzimas sería un desbalance en el metabolismo, que podría eventualmente llevar a la muerte celular debido a la acumulación de productos tóxicos, como por ejemplo acetaldehído. Por otra parte, proteínas estructurales del citoesqueleto celular, como por ejemplo tubulina, son lábiles al frío y sufren disociación a bajas temperaturas. Esto podría sumarse al efecto de la baja temperatura sobre la corriente citoplasmática, que es especialmente sensible en las plantas que son susceptibles al frío. También las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido podrían alterarse debido a la disminución de las fuerzas de unión hidrofóbicas inducidas por las bajas temperaturas. Este debilitamiento podría provocar el mal funcionamiento de las enzimas solubles, la disociación de las subunidades y el desplegamiento de los péptidos (Parkin *et al.*, 1989).

1.3.5.2 Métodos para reducir el daño por frío

Las pérdidas poscosecha debido a la incidencia de DF son probablemente mayores de las que han sido reconocidas hasta el momento. En consecuencia, es indispensable encontrar técnicas de manejo poscosecha que ayuden a reducir este detrimento (Wang, 1994). La prevención de este desorden fisiológico demanda el uso cuidadoso de prácticas agrotécnicas, tales como realizar la cosecha en un estado adecuado de madurez del fruto, realizar el control preciso de la temperatura, de la humedad, de la composición de la atmósfera durante el almacenamiento, etc. (Klein & Lurie, 1992).

Un método evidente para controlar el DF en una fruta en particular consiste en determinar cuál es la temperatura crítica para el desarrollo del DF, y evitar la exposición de los frutos a temperaturas que estén por debajo de esa temperatura crítica (Wills *et. al.*, 1998). Sin embargo, en algunos casos, esta temperatura es demasiado elevada, y el consecuente proceso de senescencia que se continúa reduce sensiblemente el tiempo de conservación. Por ejemplo, en pomelos la temperatura crítica es de 11-12°C, restringiéndose así su vida útil a solamente 2-3 meses (Martínez-Jávega, 2002).

Se han propuesto numerosas técnicas para prevenir o reducir el DF. Estas técnicas incluyen: el uso de temperaturas de acondicionamiento, calentamiento intermitente, almacenamiento bajo atmósfera controlada, tratamientos químicos y la aplicación de reguladores del crecimiento (Klein & Lurie, 1992; Wang, 1994). Las tres primeras involucran la manipulación y modificación de la temperatura ambiente durante el almacenamiento, mientras que los otros métodos involucran la aplicación directa de un tratamiento a los frutos. En general, estas técnicas reducen el DF ya sea por el incremento de la tolerancia de los frutos a las bajas temperaturas o bien retardando el desarrollo de los síntomas (Wang, 2000).

El calentamiento intermitente, consiste en exponer la fruta a uno o más períodos de alta temperatura durante el almacenamiento en frío (Wang, 1993); mientras que el preacondicionamiento térmico implica exponer la fruta a temperaturas moderadas (7 días a 10, 16 ó 21°C) previo al almacenamiento frigorífico (Wang, 1994).

En muchos programas de investigación, se enfatiza el desarrollo de técnicas “ no químicas ” para mantener la calidad poscosecha de las frutas. Se ha fomentado este enfoque debido a la preocupación continua de los consumidores respecto del uso de compuestos químicos como método para controlar los desórdenes poscosecha, dado que se considera que estos compuestos podrían ser potencialmente dañinos para la salud del hombre. Por ende, la aplicación de **tratamientos térmicos** previo a la conservación frigorífica de la fruta se presenta como un método no químico interesante para el control de los desórdenes fisiológicos y patológicos de los cultivos.

La aplicación de los tratamientos térmicos puede ser llevados a cabo en forma de: baño de agua caliente (“ *hot water dips*” , HWD), vapor caliente o aire caliente forzado (Erkan *et al.*, 2005).

Los tratamientos por inmersión en agua caliente fueron utilizados originalmente para el control de los patógenos (generalmente hongos), pero su uso también ha sido extendido para la desinfección de los insectos de los frutos. Estos tratamientos, como preventivos del DF, son aplicados por tiempos cortos (desde segundos a pocos minutos) y a temperaturas elevadas. Presentan la ventaja de que pueden ser empleados fácilmente por la industria, en comparación con los tratamientos de vapor de aire caliente; y además, su eficiencia puede ser aumentada por la aplicación de fungicidas (Schirra & Ben-Yehoshua, 1999). Sin embargo, una desventaja que presenta este método es que la temperatura requerida para que el tratamiento sea efectivo puede, en algunos casos, inducir daños por calor lo que limita su aplicación comercial (Porat *et al.*, 2000a).

Fallik *et al.* (1999) desarrollaron otra variante del HWD (“ *hot water brushing*” HWB), denominada cepillado en agua caliente, en donde los frutos son primero cepillados superficialmente para eliminar restos de pesticidas y esporas de los hongos, y luego sometidos al tratamiento con agua caliente, cuya intensidad dependerá del cultivo utilizado (48–63°C por 10–25 s). Si bien este mecanismo fue utilizado principalmente para la desinfección de los frutos, también fue efectivo en la tolerancia a bajas temperaturas en pomelos “ *Star Ruby*” (Porat *et al.*, 2000a).

El tratamiento con vapor caliente fue desarrollado específicamente para el control de los insectos, mientras que el tratamiento por aire caliente forzado ha sido utilizado para el control de patógenos e insectos, y desde el punto de vista académico, para estudiar la respuesta de las frutas a las altas temperaturas (Lurie, 1998).

Se ha demostrado que la exposición a un tipo de estrés, en dosis subletales, podría proteger a los tejidos vegetales no sólo de la exposición a niveles más intensos de este mismo estrés, sino también frente a otros tipos de estrés (termotolerancia) (Bierkins, 2000). La deducción inmediata que surge, es que la aplicación de un tratamiento de estrés determinado, podría potencialmente proteger a un fruto contra los efectos indeseables de la exposición a bajas temperaturas (Klein

& Lurie, 1992). Esto constituye un enfoque novedoso, y es por eso que en los últimos años se ha trabajado intensamente en la aplicación de un estrés físico, en forma controlada, para prevenir el desarrollo de los daños fisiológicos generados durante el período de frigoconservación poscosecha.

1.3.5.3 Tratamientos de estrés

Si bien las plantas pueden adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales, existe un margen estrecho de condiciones bajo las cuales, las plantas (en su totalidad o partes de éstas) funcionan en su estado óptimo. Cuando se exponen a condiciones que se encuentran fuera de esos límites se genera una situación de estrés. El “**estrés**” es definido como cualquier factor o sucesión de factores externos de magnitud tal, que sean capaces de inducir un daño potencial o interrumpir el proceso fisiológico normal de un organismo (Kays, 1991). El término “**estrés**” también es definido como “**el factor o la combinación de factores ambientales y biológicos**” capaces de provocar “**un cambio aberrante en el proceso fisiológico**” (Hale & Orcutt, 1987).

Prácticamente, cualquier técnica utilizada para mantener fresco a un producto cosechado por un período extenso, puede causar algún tipo de estrés sobre los tejidos y provocar desórdenes que afecten en forma directa su calidad (Shewfelt & Prusia, 1993). A lo largo de la cadena productiva, que va desde la producción hasta el consumo, las frutas están expuestas a distintos tipos de estrés, algunos de ellos “**intencionales**” y otros no. Dentro de los primeros, se incluyen las bajas temperaturas, la atmósfera controlada, la contaminación microbiana, la irradiación y los aditivos químicos. Como estrés “**no intencionales**” pueden mencionarse al impacto de la fruta contra superficies duras o contra otras frutas, y la exposición a altas temperaturas durante las operaciones de cosecha (Kays, 1991; Shewfelt, 1993a).

La respuesta de los tejidos al estrés es altamente variable. Los factores que influyen en esta variabilidad pueden ser genéticos, pueden deberse a las condiciones de crecimiento, a los mecanismos de defensa endógena (naturaleza de la superficie externa del tejido), a la madurez en el momento de la cosecha y a la magnitud de la exposición. Se ha visto que la exposición de frutos y vegetales a bajos niveles de

estrés o de corta duración, puede dar como resultado una respuesta reversible. Sin embargo, a partir de un cierto punto la respuesta se vuelve irreversible. La identificación de esa zona de “reversibilidad” permitiría la potencial aplicación de métodos de estrés para extender la vida útil de los frutos sin afectar la calidad del producto (Shewfelt, 1993a).

La aplicación efectiva de los diferentes tratamientos de estrés, requeriría de la determinación de indicadores celulares o moleculares que puedan distinguir entre un daño reversible y uno irreversible, y modificar así las condiciones de almacenamiento. De esta forma, sería posible prolongar la vida útil de la fruta, sin sacrificar su calidad (Shewfelt, 1993b). Un marcador molecular que posee las características adecuadas para evaluar la intensidad de los tratamientos de estrés aplicados son las denominadas “**proteínas de estrés térmico**” [“*Heat Shock Proteins*” (*HSPs*)]. Estas HSPs o chaperonas moleculares, se expresan en las plantas no sólo por la exposición a altas temperaturas, sino también en respuesta a un amplio rango de estreses ambientales, como ser estrés hídrico, salínico, osmótico, y oxidativo. Existen numerosos datos experimentales que sugieren que las HSPs juegan un papel crucial en la protección de las plantas contra el estrés y en el reestablecimiento de la homeostasis celular. Además de su función directa en la tolerancia adquirida al estrés, podrían también interactuar con otros mecanismos, en forma sinérgica, para disminuir el daño celular (Wang *et al.*, 2004).

1.4 PROTEÍNAS DE ESTRÉS TÉRMICO

1.4.1 Generalidades

El estrés ocasionado por condiciones extremas en el ambiente que rodea a una planta puede provocar cambios radicales rápidos en su fisiología celular. A diferencia de los animales, las plantas no pueden moverse a un lugar donde las condiciones ambientales sean más favorables, por lo que deben ajustar su fisiología de manera de compensar los cambios perjudiciales ocasionados por una situación de estrés.

Uno de los tipos de estrés más estudiados en vegetales es el estrés por calor. Según Schöffl *et al.* (1998), si la intensidad de este estrés es demasiado elevada, puede producirse un daño celular importante llevando eventualmente, a la muerte celular. Sin embargo, dosis subletales de estrés por calor pueden inducir una

respuesta capaz de proteger tanto a la célula como a todo el organismo contra un daño severo, permitiendo, además, la recuperación normal de las actividades fisiológicas y celulares. Prácticamente en todas las plantas, animales y procariontes analizados hasta el momento, un aumento transiente de 5 a 10°C, por encima de la temperatura normal de crecimiento y por un período que va desde los 15 min hasta algunas horas, induce la síntesis de un grupo particular de proteínas conocidas genéricamente como **HSPs**. Estas proteínas podrían haber estado ausentes o bien presentes (aunque a niveles muy bajos) en una célula no estresada (Brodl, 1989). Se ha observado dentro del mismo mecanismo de respuesta, que la concentración de muchas de las proteínas sintetizadas en condiciones normales, disminuyen en forma importante, situación que permitiría dirigir prácticamente toda la energía hacia la síntesis de las HSPs (Key *et al.*, 1981). El aumento en la síntesis de HSPs como respuesta inmediata al estrés por calor fue reportado por primera vez en células de *Drosophyla* (Tissieres *et al.*, 1974). Linnquist (1986), utilizando células de diferentes organismos (mamíferos, insectos, bacterias y levaduras) logró establecer una correlación positiva entre la síntesis de HSPs y la adquisición de un estado de termotolerancia. En variedades termotolerantes de trigo se encontraron también HSPs generadas por la aplicación de un tratamiento térmico, no así en variedades termosensibles (Krishnan *et al.*, 1989).

Como su nombre lo indica, las HSPs son producidas en respuesta a un incremento en la temperatura. Sin embargo, se demostró que su síntesis también puede dispararse por otros factores, tales como la presencia de metales pesados o detergentes no iónicos, la aplicación de tratamiento a bajos pHs, el desarrollo de infecciones microbianas, el efecto de traumas titulares y lesiones genéticas (Craig, 1985; Ali & Banu, 1991).

Estas proteínas fueron designadas originariamente con el nombre de “chaperonas moleculares” porque poseían la capacidad de unirse o asociarse a otras proteínas modificando su destino y función. Probablemente, todas las proteínas celulares interactúan con las HSPs, al menos una vez durante su tiempo de vida, ya sea durante la síntesis, la translocación subcelular o su degradación (Schöffl *et al.*, 1998). Estas proteínas se distribuyen en todos los compartimentos celulares y sus principales funciones son: a) facilitar el plegamiento de proteínas nacientes a medida

que dejan los ribosomas, b) promover el plegamiento de las proteínas a su estado nativo final, c) mantener los sustratos en una forma competente para el transporte a través de la membrana, d) mantener las proteínas en una conformación específica, e) prevenir la agregación de proteínas no plegadas, y f) promover la renaturalización de los agregados proteicos (Boston *et al.*, 1996; Ganea, 2001). Las HSPs reconocen sustratos proteicos desplegados, vía la exposición de residuos hidrofóbicos que normalmente se encuentran escondidos en el interior de la misma. En este sentido, ellas se comportan como catalizadores, debido a que interactúan con los sustratos proteicos pero no están presentes en el producto final (Fink, 1999). Se ha encontrado también, que diferentes tipos de HSPs pueden interactuar entre sí tanto *in vitro* como *in vivo*. En este sentido, estudios *in vitro* mostraron que las HSP110, HSP70 y HSP25 forman un gran complejo molecular en ausencia del sustrato proteico, y bajo condiciones de estrés por calor, el sustrato es incluido en el complejo (Ganea, 2001).

Aunque las HSPs fueron caracterizadas inicialmente debido a su mayor expresión en respuesta a un estrés térmico, estas proteínas pueden encontrarse también en todos los tipos de células, en todas las fases del ciclo celular, durante el desarrollo embriogénico, en la diferenciación celular, en la estimulación hormonal y el crecimiento bacteriano, y son consideradas como unas de las proteínas más conservadas (Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996).

En los últimos años se han descrito numerosas características funcionales y estructurales de las HSPs, clasificándolas en varias familias, en función del tamaño y de la estructura. Actualmente se reconocen cinco familias de HSP (**Tabla 6**): la familia de HSP70; las chaperoninas (HSP60); la familia de las HSP90; la familia de HSP100 y la familia de proteínas de bajo peso molecular (“*small heat shock proteins*” = sHSPs). Aunque la participación de las HSPs en procesos celulares ha sido descrita con bastante detalle en otros organismos, se conoce muy poco su función en plantas. Se cree que además de su participación en la tolerancia adquirida al estrés, estas proteínas actuarían de manera sinérgica asociadas a otros mecanismos y componentes celulares a fin de disminuir el daño (Wang *et al.*, 2004).

1.4.2 Familia de HSP70

Las HSP70 (también llamadas *Bip* por “*binding protein*”), junto con las chaperoninas (HSP60), forman una maquinaria celular que asisten en un amplio rango

de procesos de plegamiento de proteínas en casi todos los compartimentos celulares. Estas proteínas tienen la función esencial de prevenir la agregación y asistir en el plegamiento y desplegamiento de proteínas, en la translocación de péptidos, y en el ensamble y desarme de complejos proteicos oligoméricos, tanto bajo condiciones normales como bajo condiciones de estrés. Los miembros de esta familia están además involucrados en procesos de degradación proteolítica de proteínas inestables, marcándolas para su procesamiento en los lisosomas o proteosomas (Ali & Banu, 1991; Wang *et al.*, 2004).

Tabla 5. Función y localización intracelular de las cinco principales clases de HSP/chaperonas en plantas

CLASE	MIEMBROS REPRESENTATIVOS	LOCALIZACION INTRACELULAR	PRINCIPALES FUNCIONES
HSP70			Prevenir la agregación Asistir en el plegamiento Translocación e importación de proteínas, transducción de señales y activación transcripcional
Subfamilia: DnaK	Hsp/Hsc70 Hsp70 Bip ¹	Citosol Cloroplasto, mitocondria Reticulo endoplasmático	
Hsp110/SSE	Hsp91	Citosol	
HSP60/chaperonina			Plegamiento y asistencia en el plegamiento
Subfamilia: Grupo I	Cpn60 ²	Cloroplasto , mitocondria	
Grupo II	CCT ³	Citosol	
HSP90	HSP90		Facilitar la maduración de las moléculas-señales
	AtHsp90-1 AtHsp90-5 AtHsp90-6 AtHsp90-7	Citosol Cloroplasto Mitocondria Reticulo endoplasmático	
HSP100/Clp	Hsp100		Disgregación, desplegamiento
Subfamilia: Clase I	Club, ClpA/C ClpD	Citosol, mitocondria	
Clase II	ClpM, ClaN ClpX, ClpY	Cloroplasto Cloroplasto	
sHSP			Previendo agregación, estabilizando proteínas no nativas
Subfamilia: I	Hsp17,6	Citosol	
II	Hsp17,9	Citosol	
III	Hsp21 y Hsp26,2	Cloroplasto	
IV	Hsp22	Reticulo endoplasmático	
V	Hsp23	Mitocondria	
VI	Hsp22,3	Membrana	

Fuente: Wang *et al.*, 2004.

Estudios realizados por Chirico *et al.* (1988), en sistemas de traducción *in vitro* de vesículas microsomales de levaduras, determinaron que las HSP70 estaban involucradas en el desplegamiento de proteínas translocadas, permitiendo su transporte a través de las membranas del retículo endoplasmático (RE) y de las mitocondrias.

Han sido identificados nueve miembros de esta familia, los cuales difieren tanto en la secuencia de aminoácidos como en la localización celular. Tres de ellos están presentes en mitocondria, núcleo y nucleolo, mientras que el resto se encuentra en el citosol (Ali & Banu, 1991).

Estas proteínas están presentes en todos los organismos vivos estudiados, si bien el mayor número de estudios ha sido realizado en levaduras. Se las considera como una de las proteínas conocidas más conservadas, con un 50% de residuos idénticos entre las HSP70 de eucariontes y su homólogo de *E. coli* (llamada DnaK).

Estructuralmente, estas proteínas tienen dos dominios principales. Un dominio ATPasa amino-terminal, altamente conservado, de 45 kDa que une ADP y ATP muy fuertemente, y un dominio de unión peptídico carboxi-terminal de 25 kDa. Para un correcto plegamiento proteico, es necesaria la cooperación de ambos dominios (Boston *et al.*, 1996). Anderson *et al.* (1994) describieron que las HSP70 existen como monómeros, dímeros y oligómeros de alto peso molecular.

Algunos miembros de la familia de las HSP70 se expresan en forma constitutiva, denominándose HSC70 (“*heat shock cognate*”). En particular, las HSP70 de plantas son el producto de pequeñas familias de multigenes (Miernyk, 1997).

Se ha demostrado que los genes de HSP70 en *Arabidopsis* y en espinaca son expresados en respuesta a condiciones ambientales de estrés tales como el calor, el frío, la sequía, o el estrés químico. En plantas, la sobreexpresión de los genes de HSP70 se correlaciona positivamente con la adquisición de termotolerancia, y con la tolerancia aumentada al estrés salino e hídrico (Wang *et al.*, 2004).

1.4.3 Familia de HSP60

Las HSP60 conocidas como “chaperoninas” (Ellis, 1990), son proteínas oligoméricas de gran tamaño con forma de anillo, que unen intermediarios

parcialmente plegados, previniendo su agregación y facilitando el desplegamiento y posterior ensamble.

Estas proteínas se encuentran en procariontes, y en las mitocondrias y los plástidos de eucariontes (Hartl, 1996; Boston *et al.*, 1996). El mejor ejemplo de esta clase de chaperoninas incluye la proteína GroEL en bacterias, y su equivalente en eucariontes, la HSP60. Posteriormente, las chaperoninas fueron clasificadas en dos subfamilias: grupo I, que se encuentran en mitocondrias y cloroplastos de bacterias (GroE y Cpn60); y el grupo II, que corresponden a las chaperoninas CCP (chaperoninas conteniendo complejo polipéptido-t 1, TCP1) (Wang *et al.*, 2004).

Las HSP60 son proteínas tetradecaméricas, con una cavidad central a la que se unirían estructuras proteicas no nativas. Esta familia está compuestas por subunidades de peso molecular comprendido entre 60 y 65 kDa, las cuales forman complejos con polipéptidos y tienen actividad ATPasa como los miembros de la familia HSP70 (Ali y Banu, 1991).

Las HSP60 proteínas están presentes en todos los compartimentos celulares excepto en el retículo endoplasmático (RE), y si bien se expresan en general de manera constitutiva, pueden observarse aumentos modestos luego de un golpe térmico (Vitanen *et al.*, 1995). Para prevenir la agregación, se ha sugerido que estas proteínas podrían permitir que estructuras mal plegadas sean desplegadas y luego plegadas correctamente. El análisis de los aminoácidos de los miembros de la familia de las HSP60, muestra una extensa homología de secuencia.

La caracterización funcional de las chaperoninas en plantas es aún limitada. Sin embargo, el ejemplo mejor caracterizado es que las HSP60 participan en el ensamble de la enzima oligomérica ribulosa bifosfato carboxilasa (Rubisco) en los cloroplastos (Wang *et al.*, 2004).

1.4.4 Familia de HSP90

Los miembros de esta familia poseen pesos moleculares entre 83 y 94 kDa, y están altamente conservadas en eucariontes y procariontes, observándose por lo menos un 63-71% de homología entre las proteínas de levaduras, las de origen animal y vegetal. De manera similar a las HSP70, uno o más miembros de la familia de las HSP90 son proteínas celulares típicamente constitutivas, representando unas

de las proteínas más abundantes en la célula (1-2% del total proteico celular) (Frydman, 2001). Para realizar sus funciones requieren generalmente ATP como dador de energía (Wang *et al.*, 2004). Existen numerosas evidencias, tanto a nivel bioquímico como genético, que las HSP90 tendrían la función de modular la transducción de señales celulares mediante modificaciones en la conformación y/o plegamiento de las proteínas. Muchos de sus sustratos son transductores de señales, como los receptores de hormonas esteroides y las kinasas proteicas. Si bien la función principal de estas HSPs es la de modular el plegamiento proteico, también tienen un papel clave en la transducción de señales, el control del ciclo celular, la degradación proteica y la movilización de proteínas.

Aunque las HSP90 se encuentran constitutivamente en muchos organismos, su expresión se incrementa en respuesta al estrés (Wang *et al.*, 2004). En *Arabidopsis*, la expresión de esta proteína está regulada durante el desarrollo y responde frente a cambios ambientales, tales como calor, frío, estrés salino, presencia de metales pesados y fitohormonas, y transiciones luz-oscuridad (Miloni & Hatzopoulos, 1997).

1.4.5 Familia de HSP100

Los miembros de la familia de las HSP100/Clp pertenecen a una gran superfamilia. Estas proteínas tienen la función de ayudar a los organismos a sobrevivir en condiciones extremas. Son proteínas altamente conservadas, presentes en todos los organismos, y contienen sitios de unión al ATP y a polipéptidos (Fink, 1999).

Es interesante notar que en lugar de prevenir la agregación proteica y el incorrecto plegamiento (funciones típicas de otras chaperonas moleculares), los miembros de esta familia intervienen en la desagregación y degradación proteica. Por ejemplo, intervienen en la remoción de ciertos polipéptidos no funcionales, potencialmente dañinos, que se originarían por un mal plegamiento, por desnaturalización o por agregación, siendo esta función de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis celular. Este mecanismo de rescate de proteínas de los agregados, requiere de la cooperación de las HSP70. Las HSP100/Clp solubilizan los agregados proteicos y los liberan en un estado que les permite ser replegados

con la asistencia del sistema HSP70 (Wang *et al.*, 2004). Parsell *et al.* (1994) han observado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que las HSP104 son capaces de solubilizar agregados proteicos a temperaturas elevadas.

Se ha detectado la presencia de las HSP100 en muchas especies de plantas, tales como Arabidopsis, soja, tabaco, maíz (*Zea mays*), arroz y trigo. Estas proteínas también se expresan en forma constitutiva en plantas, pero su expresión está regulada por el desarrollo, y se inducen también ante diferentes estrés ambientales, tales como el calor, el frío, la deshidratación, etc. (Wang *et al.*, 2004).

1.4.6 Familia de las proteínas de bajo peso molecular (sHSPs)

Las sHSPs poseen pesos moleculares que varían desde 12 a 42 kDa, y están presentes en las células formando grandes complejos oligoméricos de 300–800 kDa, lo que constituye una característica común de los miembros de la familia de las sHSPs. Estas proteínas presentan una estructura cuaternaria multimérica, la cual es esencial para sus actividades, exhibiendo una alta afinidad por intermediarios parcialmente plegados. Si bien ellas se sintetizan en forma ubicua en eucariontes y procariontes, en plantas, presentan una gran diversidad y abundancia, en contraste con lo que sucede en mamíferos (Waters *et al.*, 1996). Las sHSPs son parte de la respuesta al estrés ambiental, y actúan protegiendo las plantas del daño producido por el estrés o colaborando en reparar el daño (Sabehat *et al.*, 1998). Los miembros de esta familia se expresan raramente en tejidos vegetativos no expuestos a altas temperaturas, pero bajo condiciones de estrés por calor pueden incrementarse unas 2000 veces alcanzando más del 1% del total del contenido proteico (Waters *et al.*, 1996). Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que las sHSPs actúan como chaperonas evitando la formación de agregados proteicos independiente del ATP (Waters *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997). En relación con su función, las sHSPs exhiben una alta afinidad por intermediarios parcialmente plegados, aunque no muestran especificidad aparente por los sustratos y sólo son funcionales en su forma oligomérica (Fink, 1999). En contraste con las HSP de alto peso molecular, las que participan activamente en todo tipo de plegamiento proteico, las sHSPs estabilizan específicamente proteínas desplegadas por una condición de estrés.

La homología estructural entre los miembros de la familia de las sHSP es muy baja, aunque todas ellas comparten una secuencia conservada de 90–100 aminoácidos localizado en el extremo carboxi-terminal de la molécula. Esta secuencia es llamada “ dominio α -cristalino” (ACD) debido a su relación con una proteína presente en el cristalino de mamíferos. Además, este dominio está flanqueado por otros 2 dominios: el dominio n-terminal, que es variable en secuencia y longitud, y las extensiones c-terminales, que si bien no comparten secuencias similares, tienen en común la hidrofobicidad, la alta flexibilidad y la potencial función en la solubilización proteica (Ganea, 2001).

Las plantas producen típicamente más de 10 tipos de sHSPs en respuesta al estrés por calor, los cuales pertenecen a 6 familias de multigenes. Tres familias (I, II, y III) están localizados en el citosol o el núcleo, y las otras tres están localizados en los plástidos, RE y mitocondria (Murakami, 2004). Esta alta diversificación de las sHSPs refleja, probablemente, una adaptación molecular a las condiciones de estrés que es única en vegetales (Wang *et al.*, 2004).

Tabla 6. Distribución y propiedades de las sHSPs en plantas

sHSPs	Plantas	Característica Estructural	Actividad/Función
HSP18,1 HSP17,7	<i>Pisum sativum</i> (citosol)	Complejos de aprox. 200-240 kDa, compuesto de 12 subunidades, inducido por calor	Previene agregación de CS a 45°C y su inactivación irreversible; suprime la agregación de LDH a 55°C; aumenta el replegamiento de las CS y LDH desnaturalizadas en forma química, de una manera ATP-independiente.
HSP21	<i>Pisum sativum</i> (cloroplasto)	Complejos oligoméricos con aparente tamaño mayor que 200 kDa, conteniendo 9 ó más subunidades	Contribuye a la adquisición de termotolerancia en plantas.
HSP22	<i>Lycopersicon esculentum</i> L. (mitocondria)	Homología de secuencia con otras sHSP	Rol en la protección de las células de las plantas contra el estrés oxidativo y por calor. Protección de CS de la inactivación térmica y promueve la renaturalización de la inactivada CS térmica o química

Fuente: Ganea, 2001. CS: Citrato sintasa; LDH: Láctico deshidrogenasa

Condiciones de estrés como la sequía, el calor, el frío, la alta salinidad, etc., pueden resultar en la activación de mecanismos comunes de respuestas. Este hecho sugiere la existencia de un solapamiento entre grupos de genes, los cuales podrían ser activados por las diferentes condiciones de estrés. Este mecanismo explicaría el fenómeno conocido como tolerancia cruzada (“*cross-tolerance*”), en la que un estrés particular puede inducir “resistencia” en la planta contra un estrés diferente del inicial (Bowler & Fluhr, 2000).

1.4.7 Regulación

Si bien la respuesta al estrés o golpe térmico (GT) se ha mantenido altamente conservada a lo largo de la evolución, el mecanismo de regulación de la síntesis de las HSPs no sería común para todas las especies. En respuesta al GT, la célula interrumpe la síntesis de proteínas que se producen normalmente mientras que se induce la síntesis de las HSPs a partir de dos mecanismos principales: uno a nivel de la traducción y el otro a nivel de la transcripción. Para el primer caso se ha visto en *D. melanogaster*, que si bien están presentes los ARNm de proteínas celulares normales y las de las HSPs, durante un GT sólo se traducen los mensajeros de estas últimas proteínas (Storti *et al.*, 1980). Por el contrario, en levaduras, el control es ejercido principalmente a nivel transcripcional (Lindquist, 1981).

En plantas, el GT ocasiona una rápida acumulación de ARNm específicos de HSP, producto de un incremento en la transcripción de estos genes (Gurley & Key, 1991). Los ARNm de las HSP70 y HSP90 pueden incrementarse 10 veces, mientras que los correspondientes a las sHSP aumentan más de 200 veces. Schöffl & Key (1982) observaron que los ARNm de las sHSPs, se acumulan a niveles estimados de 20.000 copias de cada proteína por célula. Este tipo de respuesta es prioritaria con respecto a otras respuestas celulares, provocando incluso la reducción o la inhibición de la activación de otras respuestas defensivas (Kuun *et al.*, 2001). La termoinductibilidad es atribuida a elementos promotores regulatorios (“*heat shock elements*”, HSEs) en *cis*, altamente conservados, localizados en la región flanqueante 5’ proximal del TATA box de los genes de estrés térmico (Schöffl *et al.*, 1998), y esta secuencia de ADN está altamente conservada desde levaduras hasta humanos (Kingston, 1990). La presencia de múltiples HSEs dentro de unos pocos

cientos de pares de bases es característica de muchos genes de estrés térmico. La secuencia consenso de los HSEs posee unidades alternantes de secuencia 5' - nGAAn-3' . Barros *et al.* (1992) demostraron en plantas que estos HSEs son los sitios de unión para los factores de transcripción de estrés térmico (HSF) activos en *trans*, siendo necesario, por lo menos, tres unidades de HSFs para que ocurra una unión eficiente. Los factores HSF1 de Arabidopsis expresados en *E. coli* forman trimeros *in vitro*. Esta trimerización es necesaria para una correcta unión al ADN y constituye, en metozoarios, el paso clave en la regulación de la actividad HSF. En respuesta al estrés, el HSF se convertiría de la forma monomérica a la trimérica, aumentando su afinidad por el HSE y activándose de esta manera, la transcripción de estos genes (Schöffl *et al.*, 1998).

De forma similar a lo que se observa en vertebrados, todas las especies de plantas investigadas hasta el momento contienen múltiples HSFs. En contraste, *D. melanogaster* y levaduras, sólo contienen un único gen que codifica HSF. En plantas, se reportaron 4 HSFs en Arabidopsis, 6 en soja, 3 en tomate, y 3 en maíz. El peso molecular de los HSFs se encuentra en el rango 31,2-57,5 kDa (Schöffl *et al.*, 1998).

En especies tan distantes evolutivamente como humanos y moscas (*Drosophila*), la unión al ADN de los HSFs como los procesos de activación transcripcional de estos mismos factores, están aumentadas por el GT. En levaduras la unión del factor a las secuencias regulatorias ocurre bajo condiciones de estrés y de no-estrés. Existe una fuerte evidencia de que este mecanismo estaría mediado por un cambio en la fosforilación de los HSFs ante un golpe de calor. En cambio, en eucariotas superiores el factor no está unido al ADN, y se une rápidamente frente a un estrés, detectándose al mismo tiempo una fosforilación adicional (Schlesinger, 1990; Gurley & Key, 1991).

¿Cómo censa la temperatura la célula? Aún no se conoce la respuesta. Utilizando sistemas *in vitro*, se observó que el factor de transcripción (extraído del citoplasma de células HeLa) se une a los HSE sólo después de un tratamiento por calor o de bajo pH, o por la adición de iones calcio o detergentes no iónicos. Consecuentemente, se ha propuesto que la fosforilación de las proteínas de estrés podría constituir en plantas, un mecanismo sensor del estrés por altas temperaturas (Krishnan & Pueppke, 1987).

Existen diferencias entre los genes que codifican las HSPs que son expresadas en forma constitutiva y las que se inducen bajo condiciones de estrés. En los genes constitutivos está presente un intrón, y dado que la presencia de intrones es considerado una forma primitiva, se sugiere que los genes de GT podrían haber perdido sus intrones como vía para la optimización de la expresión bajo condiciones de estrés (Gurley & Key, 1991).

Las diferentes clases de HSPs protegen a la célula en forma cooperativa y cumplen además funciones complementarias. En algunos casos se superponen en sus funciones de protección, particularmente ante una situación de estrés (**Fig. 15**).

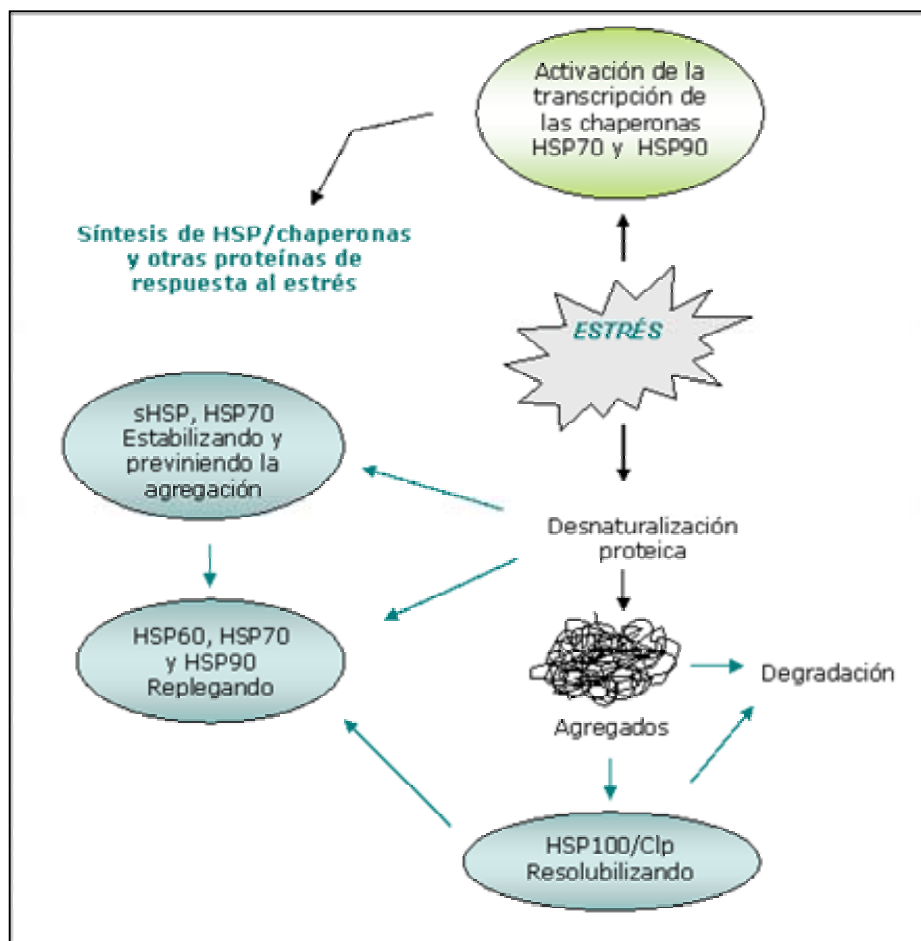


Figura 15. Esquema general de respuesta por HSPs ante una situación de estrés
Fuente: Wang *et al.*, 2004

1.4.8 Usos prácticos de las proteínas de estrés

Debido a la reconocida importancia que poseen estas proteínas como protectoras frente al estrés, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones donde se las utiliza con fines prácticos. Dado que los cambios producidos a nivel bioquímico constituyen las primeras respuestas detectables frente a las fluctuaciones ambientales, podría utilizarse la detección y cuantificación de las HSPs con fines de biomonitoreo de la contaminación y/o fluctuación ambiental.

En particular, las HSPs presentan muchas de las características requeridas para ser utilizadas en este sentido (Bierkens, 2000): como por ejemplo, distintas formas de estrés inducen la síntesis de HSPs a niveles elevados, y esta inducción persiste en el tiempo. Otra característica de estas proteínas que las hace relevantes es que están evolutivamente conservadas en todas las especies (Rensing & Maier, 1994).

El uso de anticuerpos (Ac), tanto policlonales como monoclonales, ha sido de gran utilidad en la detección y/o cuantificación de las proteínas de estrés dada la importante reactividad cruzada que presentan las mismas. Desde el punto de vista analítico las técnicas inmunológicas (ELISA, Western Blot y detección histoquímica) por su seguridad, confiabilidad, sensibilidad y especificidad, son las más adecuadas para detectar proteínas, péptidos y compuestos orgánicos como marcadores de estrés ambiental. Si bien en el desarrollo de Ac se requiere una alta selectividad y especificidad (ej. reconocer una isoforma entre una mezcla de familias de proteínas similares), es importante tener presente que para analizar muestras ambientales se necesita además Ac que sean capaces de reaccionar con diversas especies y tipos de tejidos (Dunlap & Matsumura, 1997). Aplicando este principio, Dunlap & Matsumura (1997) desarrollaron un Ac policlonal de conejo contra un epítipo de HSP70 altamente conservado, que mostró reactividad cruzada con distintas especies (rana, camarones, salmón, plantas, 2 especies de pescado, un anfibio, 2 artrópodos), y fue efectivo para evaluar no sólo el estrés por calor, sino también estrés por salinidad y por exposición a compuestos químicos.

Las HSPs han sido utilizadas además, en estudios evolutivos o filogenéticos. En este sentido, las sHSPs son particularmente interesantes ya que dominan el perfil de la síntesis proteica durante el estrés y pueden acumularse rápidamente, llegando a representar un importante porcentaje del total proteico (Knight & Ackerly, 2001).

1.4.9 Aspectos tecnológicos

Los tratamientos térmicos fueron aplicados inicialmente en poscosecha para eliminar las larvas de los insectos, o como alternativa al uso de compuestos químicos para desinfectar las frutas (Klein & Lurie, 1992). En los últimos años, muchos autores los han utilizado para mantener y extender la vida útil de frutas y hortalizas (Sabehat *et al.*, 1996; Lurie, 1998), y para reducir los síntomas de DF durante el almacenamiento en frío (Wang, 1993; Lurie, 1998; Schirra & Ben-Yehoshua, 1999; Porat *et al.*, 2000a). Aunque el modo de acción involucrado en la reducción de la podredumbre y el DF no son claros.

La temperatura máxima tolerada por las plantas normalmente está en el rango de los 42-60°C, y se correlaciona positivamente con la temperatura normal de crecimiento de los cultivos. Por ejemplo, en tomates, la temperatura letal es de 45°C, 63°C para uvas, y 49 a 52°C para manzanas.

Los efectos más destacados de la aplicación de los tratamientos térmicos en frutas durante el período de poscosecha son: ablandamiento, modificación de la tasa respiratoria, disminución de la producción de etileno, alteración en la producción de compuestos volátiles, cambios en el color (Klein & Lurie, 1992; Paull & Chen, 2000).

El efecto del tratamiento térmico sobre la maduración de las frutas (**Tabla 7**) posee dos tipos de respuesta. La primera se da a temperaturas menores de 42°C y está relacionada con la respuesta celular ante el estrés. Esto produce la modificación de la sensibilidad al frío, el retraso de la maduración y modificaciones ligeras de la calidad. Las condiciones durante la precosecha, la especie, el cultivo, el estadio de la maduración, la temperatura y su duración, y las posibles variaciones diurnas influyen sobre esta respuesta.

El segundo tipo de respuesta ocurre cuando el estrés excede el umbral de aproximadamente 45°C, en el cual la célula pierde su capacidad de recuperarse. Esta respuesta ocasiona la interrupción de varios pasos metabólicos asociados a la maduración (**Tabla 7**; Paull & Chen, 2000).

Tabla 7. Efecto en plantas de dos niveles de estrés por calor (<42°C y >45°C), observados inmediatamente de aplicados y luego del retorno a TA

ESTRÉS POR CALOR (C°)	EFFECTOS INMEDIATOS		RETORNO A LA TEMPERATURA AMBIENTE
< 42	Respiración	Incrementada	Retorno a niveles control
	Etileno	Disminuido	Recuperación lenta
	Transcripción	ARNm – HS producidos Otros ARNm suprimidos	No se forman más transcritos Recuperación de la transcripción normal
	Traducción ARNm	Proteínas de HS producidas Secuestrado	Disminuye después de 18 h Recuperación de la traducción
	Proteínas	La degradación continúa a una tasa elevada	Recuperación de la velocidad de degradación normal
	Oxígeno reactivo	Incrementado	Recuperación a los niveles normales
> 45	Respiración	Incrementada	Retorno a niveles control
	Etileno	Disminuido	Producción recuperada lentamente luego de varios días
	Transcripción	ARNm – HS pobremente inducidos Síntesis de ARNm reducidos	No se forman más transcritos Recuperación dependiente del estrés
	Traducción	Pérdida de polisomas	Recuperación dependiente del estrés
	Proteínas	Degradación continúa a una tasa elevada	Dependiente del estrés. Más allá del umbral, hay un desbalance en el metabolismo: necrosis
	Oxígeno reactivo	Daño a membranas y proteínas	Si el umbral excede al daño: necrosis

Fuente: Paull & Chen, 2000.

1.5 CONSIDERACIONES SOBRE LA METODOLOGÍA UTILIZADA

1.5.1 Medición de los parámetros de calidad

La evaluación de calidad de los productos frutihortícolas incluye fundamentalmente el análisis de los atributos sensoriales, el valor nutritivo, los constituyentes químicos, las propiedades mecánicas, las propiedades funcionales, y la presencia de posibles defectos. Para la determinación de las características de calidad, ha sido de gran importancia la utilización de métodos instrumentales en lugar de métodos de apreciación subjetiva, dado que el uso de los instrumentos evita la variabilidad que presenta el análisis subjetivo. Esta metodología permite además, utilizar un lenguaje de entendimiento común entre los investigadores, la industria y

los consumidores. El tipo de instrumento a utilizar para las mediciones de calidad dependerá del parámetro a evaluar.

1.5.1.1 Color

La medición del color es un importante atributo de calidad en los productos alimenticios. Aunque el color de las frutas y los vegetales es una manifestación externa de la composición de los pigmentos de las plantas, se ha demostrado que un simple análisis de los pigmentos extraídos no predice con exactitud el impacto visual del producto. Sin embargo, desde un punto de vista fisiológico, el análisis de los cambios de los pigmentos es importante para entender la fisiología de la maduración organoléptica y la senescencia (Shewfelt, 1993a). Se ha demostrado que en el caso de los cítricos, dos atributos de calidad de gran importancia están representados por el color de la corteza y del jugo. Estas mediciones pueden realizarse en forma subjetiva o semiobjetiva por comparación visual con patrones de referencia (cartilla de estándares) (Munsell, 1966; Yamazaki & Suzuki, 1980). Una tecnología más interesante es la medición objetiva por métodos físicos, utilizando distintos equipos desarrollados para tal fin, entre los más utilizados se puede mencionar el medidor de color Hunter y el de reflectancia Minolta (Salunkhe *et al.*, 1991). El principio de medición de estos instrumentos se basa en el hecho que, cuando una fruta u hortaliza es expuesta a la luz, aproximadamente el 4% de la luz incidente es reflejada en su superficie externa, causando una reflectancia especular. El 96% restante se transmite a través de la superficie hacia la estructura celular, en donde puede ser desviada por las pequeñas interfaces del tejido o absorbida por los constituyentes celulares (Abbot, 1999). Se han desarrollado muchas escalas de colores pero la escala predominantemente utilizada para frutas y vegetales es el Hunter “ Lab” o su variante CIE $L^* a^* b^*$. El error más frecuente en la medición del color es el uso de los resultados obtenidos con la escala Lab directamente sin conversión al hue, value y croma. Los humanos y los colorímetros “ ven” el color en forma diferente. Los equipos ven el color de un producto en términos de su luminosidad (L), el carácter rojo-verde en la ausencia de los componentes amarillo y azul (a), y el carácter amarillo-azul en la ausencia de los componentes rojo o verde (b). Las mediciones en L, a y b son el lenguaje del instrumento, mientras que hue (h°), croma (C^*) y

luminosidad (L^*) son términos que se relacionan con la percepción humana e integran algunas señales complejas en estos componentes. Afortunadamente, podemos convertir un tipo de término en otro, utilizando operaciones matemáticas (Thai, 1993):

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \quad C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

Cuando clasificamos los colores, éstos se pueden descomponer en sus tres elementos primarios “ tono” (color), “ brillo” (luminosidad) y “ croma” (saturación).

1. *El ángulo o valor hue* (h°) o *tono*, es el término para distinguir al color, sea rojo, amarillo, azul, etc. Este valor puede variar en forma continua para dar lugar a los diferentes colores, tal como se presenta en la **Fig. 16**.

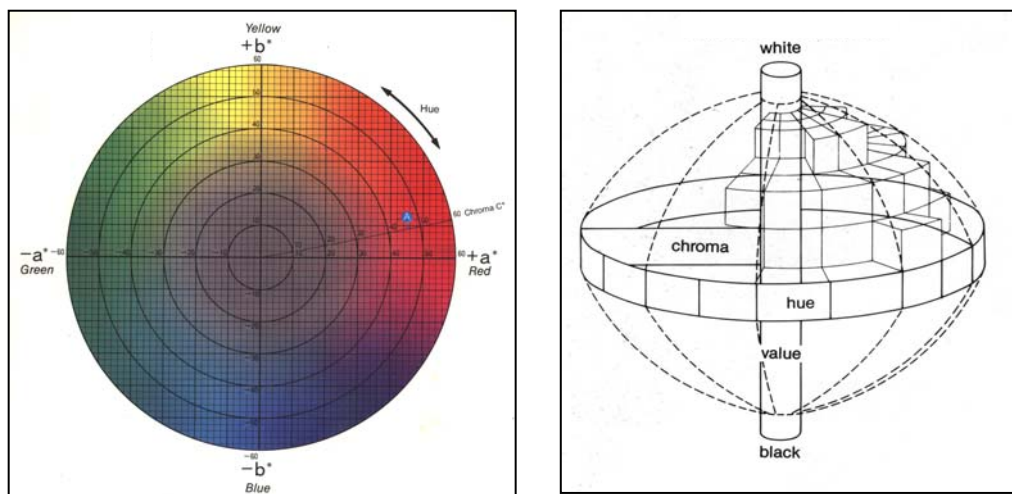


Figura 16: A. Corte transversal de la esfera de colores. B. Representación esquemática de la esfera de colores mostrando los distintos parámetros de color (Minolta, 1988).

2. *El brillo o luminosidad*, denominado **value** (L^*) está relacionado con la premisa que los colores pueden ser divididos en claros u oscuros. Para interpretar el significado de L^* , debe considerarse que la **Fig. 16A** representa un corte transversal de la esfera de color para un determinado

valor de L^* . La intensidad aumentará si el corte se realiza hacia arriba y disminuirá si éste se realiza más abajo (**Fig. 16B y 17**).

3. *El grado de saturación* da idea de la intensidad de color. Este valor determina que tan vivo o apagado es un color, y da origen al tercer elemento en la medición de un color que se denomina *chroma* (C^*). Este valor cambia horizontalmente en la esfera de colores, siendo los colores del centro los más apagados. La **Fig. 16A** muestra los tonos que indican los valores de chroma de un determinado valor.

Los tres parámetros o elementos que se muestran en la **Fig. 16B** pueden ser combinados en un sistema tridimensional, representándose como un sólido de color, como se observa en la **Fig. 17**.

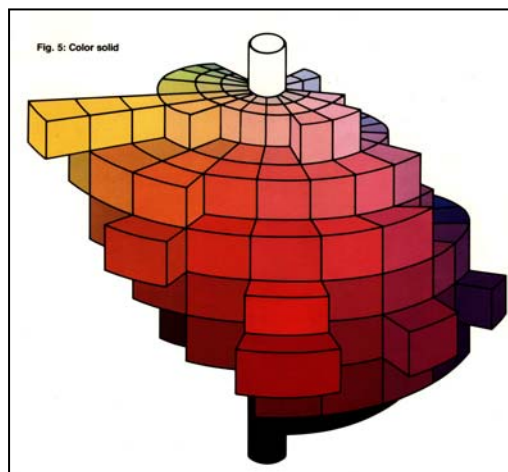


Figura 17: Representación de la esfera de colores en donde se muestra la variación de los parámetros de color (Minolta, 1988).

1.5.1.2 Dulzor

El dulzor es una variable muy importante en la calidad sensorial de la fruta. La misma puede ser determinada a través del análisis de azúcares totales y reductores, o mediante el contenido de sólidos solubles totales (SST), siendo esta última una determinación simple que puede realizarse con un refractómetro. El contenido de

SST tiene una estrecha relación con el dulzor, dado a que los azúcares constituyen el componente mayoritario de los mismos (Kader, 1992).

1.5.1.3 Técnicas Electroforéticas

En los últimos años, las técnicas electroforéticas han sido ampliamente utilizadas tanto para caracterizar la evolución de las proteínas constitutivas de la fruta durante la maduración, como para investigar el comportamiento de las mismas durante la conservación, aunque existen algunos informes que señalan ciertas dificultades en los estudios realizados con proteínas vegetales. Según Robertson *et al.* (1997), en el análisis de las proteínas de ciertos componentes vegetales como la pared celular, los avances logrados están más retrasado en relación con otros compuestos, como los hidratos de carbono. Inclusive, gran parte de lo que se conoce acerca de las proteínas, proviene de estudios genómicos y de clonación, existiendo pocos estudios directos sobre proteínas extraídas y purificadas a partir de los tejidos. Desde el punto de vista práctico, los tejidos vegetales resultan difíciles de procesar por los métodos establecidos para otros tipos de tejidos, debido principalmente a la gran cantidad de compuestos que interfieren tanto con la extracción, como con la propia electroforesis.

Las técnicas electroforéticas presentan las ventajas de ser simples, confiables y de proveer una gran información. Se estima que alrededor de 600.000 científicos utilizan actualmente esta técnica, logrando que los progresos en el campo de la investigación sean rápidos y constituye el pilar fundamental para el desarrollo de lo que hoy se conoce como proteómica. La proteómica puede definirse como “ el estudio de las propiedades proteicas (nivel de expresión, modificaciones postranscripcionales, interacciones, etc.) en gran escala, para obtener una visión integrada y global de los diferentes procesos a nivel proteico” (Blackstock & Weir, 1999).

El análisis proteómico es una medida directa de las proteínas en términos de su presencia y abundancia relativa (Wilkins *et al.*, 1996). Es sorprendente que los genes dentro del genoma que codifican proteínas sean relativamente pocos comparado con la cantidad de proteínas existentes (≈ 22.000 genes vs. ≈ 400.000 proteínas). Esta diversidad proteica es debida a los procesos de *splicing* alternativo y

a las modificaciones postranscripcionales que sufren las mismas. Por estas razones, no basta con el análisis de la expresión génica (cantidad de ARNm) sino que es necesario considerar además el análisis proteómico para determinar con exactitud que proteína ha sido expresada, con qué intensidad y para evidenciar posibles modificaciones postraduccionales que ocurrieron en la célula y/o en el tejido de interés.

Puede concluirse, que la proteómica, permitió y permitirá realizar avances importantes en el conocimiento de eventos y en la respuesta fisiológica de los vegetales, y tendrá, seguramente, una amplia aplicación en futuros estudios tanto fisiológicos como bioquímicos.

1.6 OBJETIVOS DE LA TESIS

Teniendo en cuenta la importancia que tienen los frutos cítricos tanto en el contexto nacional como internacional, y en la necesidad de mantener la calidad de los mismos durante la cosecha, el almacenamiento y su posterior comercialización, como un requisito excluyente para ganar nuevos mercados, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar la evolución de los parámetros fisiológicos y bioquímicos determinantes de la calidad en frutas cítricas (mandarinas y pomelos) sometidas a tratamientos de estrés térmicos, aplicados con el fin de prolongar su vida útil durante la conservación a bajas temperaturas.

Objetivos específicos

- Evaluar las respuestas fisiológicas y bioquímicas (color, porcentaje de jugo, sólidos solubles totales, acidez titulable, índice de madurez, índice de daño por frío, podredumbres y proteínas de estrés) relacionadas con la calidad de frutos cítricos (pomelos “ Marsh” Blanco y mandarinas “ Nova”) sometidos a tratamientos térmicos inmediatamente poscosecha.
- Determinar la efectividad de los tratamientos térmicos utilizados en reducir el DF en los frutos del sistema modelo.
- Caracterizar en frutas cítricas la respuesta de las HSPs inmediatamente después de ser aplicados los tratamientos térmicos y durante su conservación a bajas temperaturas (2°C).
- Comparar esta respuesta con la obtenida con frutos cítricos tratados térmicamente y conservados a la temperatura recomendada para mantener la calidad de los mismos (9°C).

- Seleccionar las variables fisiológicas y/o bioquímicas más afectadas por la aplicación de los tratamientos térmicos, con el fin de evaluar su utilización como potenciales indicadores de la intensidad y duración de la protección inducida por el tratamiento térmico aplicado.
- Establecer en forma fehaciente si alguna de las HSPs inducidas por calor podrían ser utilizadas como marcadores biológicos para determinar intensidad y efectividad del tratamiento térmico y/o establecer el momento en que los frutos deben ser retirados de la frigoconservación a fin de evitar o minimizar el DF.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Las especies seleccionadas para llevar a cabo los ensayos fueron: Mandarina “ Nova” (*Citrus Clementina* Hort. ex. Tanaka x (*Citrus paradisi* Mc-Fadyen x *Citrus reticulata* Blanco) y Pomelo “ Marsh” Blanco (*Citrus paradisi* Mc-Fadyen). Ambas especies cítricas son consideradas de gran importancia económica en nuestro país, y son descritas en la literatura como especies susceptibles al DF.

Los frutos fueron cosechados de la Estación Experimental Agropecuaria Concordia - INTA, de Entre Ríos, Argentina, durante los años 2000 y 2001. La selección de los mismos fue realizada en base a la uniformidad de tamaño, eliminándose todos aquellos que presentaban defectos y/o alteraciones en la epidermis. Los frutos fueron lavados con detergente neutro, aplicándose posteriormente fungicida Tiabendazol (TBZ) (1000 ppm). A continuación se aplicó cera formulada con polietileno y goma-laca a una concentración de sólidos del 18% ST. Finalmente se realizó el secado en túnel de aire a 45°C. Los frutos seleccionados fueron empacados en cajas (50 frutos por caja) y distribuidos al azar entre los diferentes tratamientos.

Los tratamientos térmicos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Poscosecha de la mencionada Estación Experimental Agropecuaria de INTA. Los análisis fisiológicos fueron realizados inmediatamente después de los respectivos muestreos. Los muestreos se realizaron: luego de la aplicación de los tratamientos y cada 15 días durante el período de conservación en cámara a 2 y a 9°C. Los frutos separados para realizar los análisis bioquímicos fueron congelados primero con N₂ líquido y luego conservados en freezer (-20°C) hasta su procesamiento. Estos análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Proteínas del Instituto Tecnología de Alimentos del INTA - Castelar.

2.2 Tratamientos aplicados

2.2.1 Tratamientos en mandarinas

En este ensayo se utilizaron 4000 frutos signados en forma aleatoria a 4 lotes homogéneos. Cada lote fue sometido a uno de los siguientes tratamientos:

- 1- No tratado, utilizado como control = *C*
- 2- Tratamiento de desverdizado (incubación en cámara a 20-21°C durante 48 h, en presencia de 5ppm de etileno) = *D*
- 3- Tratamiento térmico [incubación en cámara a 36°C durante 48 h y 90% humedad relativa (HR)] = *HS*
- 4- Tratamiento térmico (exposición en cámara a 36°C durante 48 h y HR 90%) seguido de tratamiento de desverdizado (incubación en cámara a 20-21°C durante 48 h, en presencia de 5ppm de etileno) = *HS+D*

TRATAMIENTO	MUESTREO	
	Luego del tratamiento	Luego de 24 h a 20°C
Control (<i>C</i>)		M1₀
Desverdizado (<i>D</i>)	D	M1₀
Tratamiento Térmico (<i>HS</i>)	HS	M1₀
Tratamiento Térmico + Desverdizado (<i>HS+D</i>)	HS+D	M1₀



Mandarinas Tratadas (<i>C, D, HS, HS+D</i>)	Temperatura Conservación	MUESTREO (durante la conservación)							
		Período							
		15 días		30 días		45 días		60 días	
		Salida	S +7	Salida	S +7	Salida	S +7	Salida	S +7
	2°C	M15₀	M15₇	M30₀	M30₇	M45₀	M45₇	M60₀	M60₇
	9°C	M15₀	M15₇	M30₀	M30₇	M45₀	M45₇	M60₀	M60₇

Nota: S+7 = salida + 7 días 20°C

Figura 18. Esquema de la aplicación de los tratamientos y posterior conservación de mandarinas “ Nova” .

El diseño experimental se resume en la **Fig. 18**, e incluye los 4 tratamientos mencionados (*C*, *D*, *HS* y *HS+D*); 2 temperaturas de conservación (2°C y 9°C); 1 muestreo a la salida de los tratamientos (M1) y otros cuatro muestreos quincenales durante el período de conservación (dos meses) a cada una de las temperaturas mencionadas: 15, 30, 45 y 60 días (M15, M30, M45 y M60); y 2 condiciones de evaluación: después de cada uno de los muestreos (M1₀, M15₀, M30₀, M45₀, M60₀), y luego de 7 días de almacenamiento en cámara a 20°C (M15₇, M30₇, M45₇, M60₇).

2.2.2 Tratamientos en pomelos

Para este ensayo, se utilizaron 3000 frutos signados en forma aleatoria a 3 lotes homogéneos.

Cada lote, en fue sometido a uno de los siguientes tratamientos:

1. No tratado, utilizado como control = *C*
2. Tratamiento térmico corto (incubación en cámara durante 24 h a 37°C y 90% HR) = *HS24*
3. Tratamiento térmico largo (incubación en cámara durante 48 h a 37°C y 90% HR) = *HS48*

El diseño experimental se resume en la **Fig. 19**, e incluye 3 tratamientos (*C*, *HS24* y *HS48*); 2 temperaturas de conservación (2°C y 9°C); 1 muestreo a la salida de los tratamientos (P1) y muestreos quincenales durante el período de conservación (a cada una de las dos temperaturas mencionadas): 15, 30, 45 y 60 días (P15, P30, P45 y P60); y 2 condiciones de evaluación: inmediatamente después de cada uno de los muestreos (P1₀, P15₀, P30₀, P45₀, P60₀), y luego de 7 días de almacenamiento en cámara a 20°C (P15₇, P30₇, P45₇, P60₇). En el caso particular del análisis de las HSPs realizado en los frutos de pomelo, se extendió el período de conservación hasta los 75 días (P75) para ambas temperaturas de conservación evaluadas.

TRATAMIENTO	MUESTREO	
	Luego del tratamiento	Luego de 24 h a 20°C
Control (C)		P1 ₀
Tratamiento Térmico de 24 h (HS24)	HS	P1 ₀
Tratamiento Térmico de 48 h (HS48)	HS	P1 ₀



TRATAMIENTO	MUESTREO (durante la conservación)								
	Temperatura Conservación	Período							
		15 días		30 días		45 días		60 días	
Pomelos Tratados (C, HS24, HS48)		Salida	S +7	Salida	S +7	Salida	S +7	Salida	S +7
	2°C	P15 ₀	P15 ₇	P30 ₀	P30 ₇	P45 ₀	P45 ₇	P60 ₀	P60 ₇
	9°C	P15 ₀	P15 ₇	P30 ₀	P30 ₇	P45 ₀	P45 ₇	P60 ₀	P60 ₇

Nota: S+7 = salida + 7 días 20°C

Figura 19. Esquema de la aplicación de los tratamientos y posterior conservación de pomelos “ Marsh” .

2.3 Evaluaciones de la calidad de los cítricos

2.3.1 Evaluación del color

El color de los frutos cítricos fue evaluado mediante un colorímetro Minolta CR 300 utilizando el sistema Hunter – Lab con iluminante D65. En cada fruto se realizaron dos mediciones en la zona ecuatorial, determinándose los valores de L*, a* y b*. En todos los casos se registró el promedio de las mediciones. Posteriormente, en el caso de las mandarinas se calculó el índice de color (IC) como $(1000 \times a^*) / (L^* \times b^*)$, desarrollado por Jiménez – Cuesta *et al.* (1981). En los pomelos, como medida de color se calculó el ángulo hue (h°) y el valor croma (C*), utilizando las siguientes fórmulas (McGuire, 1992; Voss, 1992): $(h^\circ) = \arctg (b^*/a^*)$ y $(C^*) = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$.

Las evaluaciones se realizaron en la cosecha, inmediatamente después de aplicados los diferentes tratamientos, durante los distintos períodos de la

conservación frigorífica y luego de la simulación de la comercialización (7 días a 20° C). En cada una de las evaluaciones se utilizaron 30 mandarinas y 25 pomelos.

2.3.2 Determinación de la pérdida de peso

El peso de los frutos fue evaluado en forma individual utilizando una balanza digital, y luego se calculó la pérdida de peso (PP) porcentual.

2.3.3 Determinación del porcentaje de jugo

El porcentaje de jugo se calculó considerando el peso de la fruta y el volumen total de jugo extraído de la fruta. El contenido de jugo se expresó como la relación porcentual entre el volumen del jugo y el peso de la fruta. Las determinaciones se realizaron sobre 3 muestras constituidas por 5 frutos cada una.

$$\% \text{ jugo} = \frac{\text{Vol. jugo (ml)} \times 100}{\text{peso fruta (g)}}$$

2.3.4 Determinación del contenido de sólidos solubles totales

El contenido de SST fue medido en el jugo mediante un refractómetro de mano (Atago N1) y expresado como grados Brix (°Brix). Esta determinación se realizó en 3 muestras conteniendo 5 frutos cada una.

2.3.5 Determinación de la acidez titulable

La acidez titulable (AT) de los frutos fue determinada mediante titulación de 5 ml de jugo hasta pH 8,2 con una solución valorada de NaOH 0,1N y expresado como g de ácido cítrico anhidro/100 g de fruta. Esta determinación se realizó en 3 muestras de 5 frutos cada una.

2.3.6 Determinación del índice de madurez

El índice de madurez (IM) se calculó como la razón entre SST y la AT obtenidos previamente.

$$\text{IM} = \text{SST} / \text{AT}$$

2.3.7 Evaluación de las alteraciones fisiológicas

Como medida directa de la calidad se evaluó el porcentaje de frutos que manifestaron alteraciones fisiológicas. Estas evaluaciones fueron realizadas sobre 120 mandarinas y 50 pomelos de cada uno de los tratamientos aplicados.

Las alteraciones fisiológicas que presentaron los frutos cítricos se clasificaron en:

- Daño por frío (DF): esta alteración fue detectada visualmente, determinando la presencia de *pitting* sobre la superficie del fruto. El DF se clasificó de acuerdo a su severidad en 4 categorías: 0 = sin daño; 1 = ligero; 2 = moderado y 3 = severo. El índice de daño por frío (IDF) fue determinado como la suma de los frutos con DF multiplicado por el número asignado a su correspondiente categoría, y dividiendo posteriormente esta cifra por el número total de frutos evaluados (Lafuente *et al.*, 1997; Porat *et al.*, 2000a).

$$IDF = \frac{\sum \text{severidad del daño (0-3)} \times \text{n}^{\circ} \text{ de frutos con DF dentro de c/categoría}}{\text{Número total de frutos}}$$

- Podredumbres (P): se detectó visualmente la presencia de hongos sobre la superficie de los frutos expresándose como porcentaje de frutos alterados respecto del total de frutos analizados.

2.3.8 Análisis estadístico

El análisis aplicado para evaluar las distintas determinaciones en este ensayo se realizó mediante el paquete estadístico SPSS® versión 12 (SPSS Inc., Illinois).

La evolución de cada uno de los parámetros se realizó a cada una de las temperaturas de conservación estudiadas (2 y 9°C) en forma separada.

Las variables que involucran la destrucción del fruto (volumen de jugo, porcentaje de jugo, SST, AT, IM) fueron analizadas mediante un diseño factorial balanceado con dos factores: tratamiento y tiempo.

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{donde:}$$

μ = media general

α_i = efectos fijo del tratamiento

β_j = efecto fijo del tiempo

$(\alpha \beta)_{ij}$ = efecto fijo de la interacción

ε_{ijk} = término del error con que se distribuye $N(0,1)$.

Para $i= 1\dots a$, $j= 1\dots b$, $k=1\dots n$

Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el Test de Tukey ($p<0,05$).

En el estudio de las **mandarinas**, $n = 3$; $a = 4$, donde los niveles fueron: *C*, *D*, *HS* y *HS+D*, y $b = 5$, donde los niveles fueron: 1, 15, 30, 45 y 60 días de conservación ($M1_0$, $M15_0$, $M30_0$, $M45_0$ y $M60_0$), a cada una de las temperaturas indicadas.

En el estudio de los **pomelos** $n = 3$; $a = 3$, donde los niveles fueron: *C*, *HS24* y *HS48* y, $b = 5$, donde los niveles fueron: 1, 15, 30, 45 y 60 días de conservación ($P1_0$, $P15_0$, $P30_0$, $P45_0$ y $P60_0$) a cada una de las temperaturas indicadas.

Para el análisis de la pérdida de peso en ambos frutos, se utilizó el mismo modelo que en las variables que involucran la destrucción del fruto, con la variante que $n = 30$ para mandarinas y $n = 25$ para los pomelos, y $b = 4$ (en ambos casos), donde los niveles fueron: 15, 30, 45 y 60 días de conservación frigorífica ($P15_0$, $P30_0$, $P45_0$ y $P60_0$) a cada una de las temperaturas indicadas.

En el caso particular de las variables que involucran el color de los frutos (IC para mandarinas; el ángulo Hue y el Croma para los pomelos) se utilizó un diseño factorial balanceado con dos factores (tratamiento y tiempo) y análisis de covarianza (Weber & Skilling, 2000). Este análisis incorpora al modelo factorial la covariable “*x*” (determinación en la cosecha), a los efectos de eliminar la variación que poseía la variable medida (*y*). De este modo, las medias de los tratamientos y tiempos de la variable (*y*), se ajustaron a un valor común de la variable *x*, reduciéndose así la varianza del error, y permitiendo que las comparaciones de las medias den una mayor precisión de los parámetros estimados. Los contrastes permitieron comparar dichas medias ($p<0.05$).

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \zeta_j + (\alpha \zeta)_{ij} + \beta x_{ijk} + \xi_{ijk} \text{ donde :}$$

μ = media general.

α_i = efecto del tratamiento.

ζ_j = efecto del tiempo

$(\alpha \zeta)_{ij}$ = efecto de la interacción tratamiento por tiempo.

β = efecto de la covariable.

x_{ijk} = covariable

ε_{ijk} =término del error que se distribuye $N(0,1)$.

Para $i= 1\dots a$, $j= 1\dots b$, $k=1\dots n$.

En el caso de las **mandarinas** se evaluó la variable índice de color (IC) donde $n = 30$, $a = 4$, cuyos niveles fueron: *C*, *D*, *HS* y *HS+D*, por otro lado $b = 5$; cuyos niveles fueron 1, 15, 30, 45 y 60 días de conservación en cámara. Además en forma separada se evaluaron dos condiciones: inmediatamente después de cada uno de los muestreos ($M1_0$, $M15_0$, $M30_0$, $M45_0$ y $M60_0$), y luego de 7 días de almacenamiento en cámara a 20°C ($M15_7$, $M30_7$, $M45_7$ y $M60_7$) y \mathbf{x} = IC al momento de la cosecha.

En el caso de los **pomelos**, para las variables de color evaluadas fueron: h° y C^* , donde $n = 25$, $a = 3$, donde los niveles fueron: *C*, *HS24* y *HS48*; $b = 5$, donde los niveles fueron: 1, 15, 30, 45 y 60 días de conservación. También en forma separada se evaluaron dos condiciones: inmediatamente después de cada uno de los muestreos ($P1_0$, $P15_0$, $P30_0$, $P45_0$ y $P60_0$), y luego de 7 días de almacenamiento en cámara a 20°C ($P15_7$, $P30_7$, $P45_7$ y $P60_7$), y \mathbf{x} = h° y C^* al momento de la cosecha.

Los datos correspondientes a las variables fisiológicas: IC, pp, %jugo, SST, AT e IM, para las mandarinas, y: h° , C^* , pp, %jugo, SST, AT e IM, para el caso de los pomelos, durante la conservación a cada una de las temperaturas ensayadas (2 y 9°C) fueron analizados aplicando **Análisis Discriminante (AD)** mediante el método de selección por pasos Lambda de Wilks (*stepwise*). El criterio utilizado fue de 0,05 para la significancia máxima de F de entrada, y 0,10 para la significancia mínima de F de salida. El AD maximiza la varianza entre categorías y minimiza la varianza dentro de las mismas, permitiendo obtener una ecuación por la cual las muestras son clasificadas en sus respectivos tratamientos.

Previo a aplicar el AD, los datos de las variables fisiológicas se transformaron en sus valores estandarizados, donde z_i es la variable estandarizada $z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}$. Esta transformación permitió homogeneizar las magnitudes (peso) entre las variables (Hair *et al.*, 1999).

2.4 Efecto de los tratamientos térmicos sobre la acumulación de las proteínas de estrés

2.4.1 Extracción de proteínas

2.4.1.1 Obtención de los polvos cetónicos

El procedimiento de obtención de los polvos cetónicos se llevó a cabo a temperaturas entre 0 y 4°C. A 20 g del flavedo (parte externa coloreada de la cáscara) de las frutas cítricas, previamente triturado con procesadora Moulinex, se le adicionó alcohol etílico en relación 1:2 (g/ml). El preparado se homogeneizó dos veces con equipo Ultraturrax durante 1 min cada vez a 16000 rpm. El homogenato así obtenido se centrifugó a 3000 x g durante 5 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en acetona (4°C) en relación 1:2 (g/ml) conteniendo 1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y se homogeneizó nuevamente con equipo Ultraturrax durante de 1 min a 16000 rpm. Este procedimiento fue repetido cuatro veces, descartándose en cada ocasión el sobrenadante correspondiente. El homogenato finalmente obtenido, se filtró en vacío y se lavó con acetona hasta lograr la clarificación del polvo. Este polvo se secó en estufa de vacío a temperatura ambiente durante 3 horas y se lo almacenó en freezer a -20°C hasta el momento del análisis.

2.4.1.2 Obtención de las proteínas

Las proteínas fueron extraídas del polvo cetónico siguiendo el método de Hurkman & Tanaka (1986), con algunas modificaciones.

A 0,25 g del polvo cetónico se le adicionó 1ml de buffer de extracción para proteínas (*BPE*) y 4 ml de fenol saturado con 100 mM buffer Tris-HCl pH 8,0. Este homogenato fue agitado durante 30 min a 4°C y posteriormente centrifugado durante 20 min a 10400 x g a 4°C (Sigma 3K30). Se les extrajo la fase fenólica y se les

adicionó un volumen equivalente de buffer Tris-HCl 0,1M pH 8,0 conteniendo EDTA 1mM. La muestra se centrifugó durante 10 min a 10400 x g a 4°C. Se separó la fase fenólica y se le adicionó acetato de amonio 0,1 M en metanol, en una relación 1:5. Esta mezcla se mantuvo durante toda la noche en *freezer* a -20°C a fin de permitir la precipitación de proteínas, y posteriormente las proteínas fueron separadas por centrifugación durante 30 min a 10400 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con acetato de amonio 0,1M en metanol y posteriormente con acetona al 80%, centrifugándose cada vez a 12000 x g durante 1 min. El precipitado una vez seco, se resuspendió en 50 µl de buffer de corrida para electroforesis (BCE).

BPE: Tris-HCl 100mM pH 8,0, EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) 1mM pH 8,0, fluoruro de fenimetanosulfonilo (PMSF) 1mM.

BCE: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % (p/v) SDS; 10 % (v/v) glicerol; 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol y 0,02% (p/v) azul de bromofenol.

2.4.1.3 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en el extracto fue determinada por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando como patrón una solución de albúmina bovina 0,1 mg/ml. La absorbancia de las muestras fue medida a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro marca GILFORD®.

2.4.2 Separación e identificación de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio

Las corridas electroforéticas fueron realizadas según la técnica de Laemmli (1970), en geles de 0,75 mm de espesor. Se sembraron cantidades similares de proteínas en cada uno de los geles realizados (25 µg). Las proteínas fueron separadas utilizando geles discontinuos; la concentración de poliacrilamida del gel separador varió según el caso entre el 10- 15%. Las corridas electroforéticas fueron realizadas con un equipo Mini Protean II (BIO RAD®) a voltaje constante (130V) durante aproximadamente 1 h 30 min. Como estándar de peso molecular se utilizó un kit de BIO RAD® (*low molecular weight standard*) en el cual los PM de las proteínas

estuvieron comprendidos en el rango de 14,4 a 97,4 kDa. Posteriormente, las bandas proteicas fueron teñidas con una solución al 0,2% (p/v) de *Coomassie Brilliant Blue R-250* en solución de acético/metanol/agua (v/v) (10/45/45).

2.4.3 Identificación de proteínas de estrés por métodos inmunológicos

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas durante 50 min a 100 V y 350 mA, a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro: 45µm) utilizando el buffer de transferencia (**BT**) y el módulo de transferencia del Mini Protean II (BIO RAD®).

Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue lavada durante 15 min con una solución Tris buffer salino (**TBS**) conteniendo Tween 20 (**TBST**), y posteriormente bloqueada durante 30 min a 20°C con solución de bloqueo (**SB**). A continuación, la membrana fue incubada durante 90 min a TA con el anticuerpo primario: antisuero policlonal **anti-HSP21**, obtenido contra la proteína de estrés de 21 kDa purificada en nuestro laboratorio a partir de frutos de tomate tratados con estrés por calor (Tesis Doctoral MS Gustavo Polenta 2005), diluido 1:750 en TBST + leche en polvo descremada 2%; o con el anticuerpo monoclonal comercial **anti-HSP70** (SIGMA®, catálogo # H5147, *monoclonal antiheat shock protein 70 clone BRM-22*) diluido 1:1500 en TBST + 2% leche en polvo descremada. Luego del lavado durante 15 min con solución TBST, la membrana fue incubada durante otros 90 min a TA con el anticuerpo secundario [anti- IgG ratón para el caso de anti-HSP70, o anti- IgG conejo para el caso de anti-HSP21, obtenidos ambos en cabra y conjugados con fosfatasa alcalina (BIO RAD®) en una dilución 1:1500]. Luego de tres lavados de 5 min cada uno con TBST, la membrana fue revelada con solución reveladora (**SR**) hasta visualización de las bandas (Stott, 1989).

BT: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.4% SDS

TBS: 25 mM Tris-HCl pH 7.4, NaCl 0,8%, KCl 0.02%

TBST: 0.05% (v/v) Tween 20 en **TBS**

SB: TBST conteniendo 2 % de leche en polvo descremada.

SR: 0.4 mM nitroblue tetrazolium chloride (NBT) + 0.4 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato (BCIP) en buffer de desarrollo (**BD**)

BD: 100 mM Tris pH 9.5; 0.5 mM MgCl₂

2.4.4 Cuantificación de las proteínas de estrés por métodos inmunológicos

Para determinar la cantidad de proteína de estrés inducida por los tratamientos aplicados, se utilizó la técnica de *dot blot*. Con este fin, se sembraron aproximadamente 5 μ l de los extractos proteicos (25 μ g de proteínas totales) de las diferentes muestras en una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro: 45 μ m). Una vez seca, la membrana fue lavada con buffer TBST y bloqueada con SB, y sometida al revelado inmunológico descrito previamente en el punto 2.4.3.

2.4.5 Análisis de las imágenes para la caracterización y cuantificación de las proteínas

Las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida y en las membranas de nitrocelulosa fueron escaneadas con un Densitómetro GS-800 Imaging Calibrated Densitometer (BIO RAD®), y las imágenes así obtenidas fueron procesadas posteriormente mediante el programa de análisis Quantity One 1-D (BIO RAD®). Una vez que las imágenes fueron digitalizadas, se determinaron los PM y las cantidades relativas de las proteínas presentes en las bandas de interés mediante las funciones del mencionado software diseñado para tal fin.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo general de la presente tesis fue realizar un análisis comparativo del efecto del tratamiento de estrés térmico sobre los principales parámetros objetivos de la calidad de frutos cítricos, estudiado inmediatamente después de aplicado el tratamiento y en distintas etapas durante su conservación. Con este fin, se analizaron variables fisiológicas y bioquímicas (color, peso, porcentaje de jugo, SST, AT, IM, alteraciones fisiológicas, proteínas de estrés), entre las que se identificaron la/las más afectadas por los tratamientos aplicados. Con posterioridad, se evaluó el uso de alguna de variables como indicador de la efectividad e intensidad de los tratamientos utilizados.

Las temperaturas seleccionadas para la conservación de los frutos fueron: 2°C, temperatura altamente inductora del DF (Alfárez *et al.*, 2005) y 9°C, considerada como la temperatura óptima de almacenamiento para los cítricos (Martínez-Jávega, 2002).

Como se indicó previamente, los muestreos se realizaron inmediatamente después de ser aplicados los distintos tratamientos, M1₀ para las mandarinas y P1₀ para los pomelos, y quincenalmente durante un período de dos meses durante la conservación a las temperaturas de 2°C y 9°C (M15₀, M30₀, M45₀ y M60₀ para mandarinas y P15₀, P30₀, P45₀ y P60₀ para pomelos). El primer estudio de las variables no destructivas se llevó a cabo en frutos muestreados como se describió más arriba, en cambio, el segundo estudio se realizó sobre los mismos frutos, pero luego que fueron colocados en cámara por 7 días a la temperatura de 20°C. El objetivo de esta etapa fue simular el período de comercialización y favorecer el desarrollo de los síntomas de DF. En este último caso los diferentes tiempos de muestreo se denominaron: M15₇, M30₇, M45₇ y M60₇ para mandarinas, y P15₇, P30₇, P45₇ y P60₇ para los pomelos. En el caso de las variables que involucraron la destrucción del fruto (% jugo, SST, AT e IM), se realizó un único estudio que no incluyó la simulación de la comercialización.

3.1 RESULTADOS OBTENIDOS EN MANDARINAS

3.1.1 Evaluación de la calidad

En la actualidad, entre las tecnologías aplicadas para mejorar ciertos aspectos de calidad de los cítricos, especialmente en limones, naranjas y mandarinas, se destaca el tratamiento de desverdizado. Básicamente, este tratamiento consiste en la aplicación exógena de etileno bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativas, y tiene por objetivo aumentar la velocidad de los cambios de pigmentación de la piel del fruto, la que ocurre por conversión de los cloroplastos funcionales del epicarpio en cromoplastos favoreciendo el desarrollo del color (Wheaton & Stewart, 1973). El tratamiento se aplica con el fin de cumplir con los requisitos de madurez (grado de coloración) para el consumo, de manera de comercializar los frutos en los momentos óptimos del mercado, tanto internacional como nacional (Jiménez-Cuesta *et al.*, 1983; Ismail & Zhang, 2004). Esta técnica permite adelantar la recolección hasta 4 ó 5 semanas, incrementando consecuentemente el valor agregado del fruto (Cuquerella, 1997).

3.1.1.1 Color

La evaluación del color en mandarinas se llevó a cabo utilizando el IC. En la **Tabla 8** se muestra la evolución de este parámetro inmediatamente después de aplicados los tratamientos, y cada 15 días durante la conservación a 2°C, y en la **Tabla 9**, se observa el IC de estos mismos frutos conservados a 20°C durante 7 días adicionales.

Dado que los resultados muestran que a la temperatura de conservación de 2°C (tanto durante la conservación frigorífica como luego de la simulación de las condiciones de comercialización) la interacción tratamiento-tiempo (Tto*Ti) fue significativa ($p < 0.05$), se realizó la comparación de medias entre las combinaciones de los distintos niveles incluidos en los factores tratamiento y tiempo de conservación.

No se detectó variación significativa ($p > 0.05$) del IC en los frutos dentro de cada tratamiento durante los 60 días de conservación a 2°C (**Tabla 8**). En cambio en el C, donde se observa un aumento del IC a los 15 días (M15₀), el que se mantiene hasta el final del período de conservación.

Tabla 8. Evolución del IC (medias y errores estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	7,0 ± 0,3 d	9,4 ± 0,3 c	9,7 ± 0,3 c	10,2 ± 0,3 c	10,5 ± 0,3 c
D	16,6 ± 0,3 a	17,2 ± 0,3 a	16,2 ± 0,3 a	16,0 ± 0,3 a	17,3 ± 0,3 a
HS	9,0 ± 0,3 c	10,2 ± 0,3 c	9,7 ± 0,3 c	9,7 ± 0,3 c	9,7 ± 0,3 c
HS+D	12,7 ± 0,3 b	13,8 ± 0,3 b	13,8 ± 0,3 b	13,7 ± 0,3 b	13,7 ± 0,3 b
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	Covariable
	*	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0,05$

Inmediatamente después de aplicados los tratamientos (M1₀), el IC de los frutos sometidos a los diferentes tratamientos presentó valores significativamente diferentes ($p < 0.05$), siendo el IC de D > HS+D > HS > C. En cambio en los diferentes muestreos durante la conservación, solamente los frutos sometidos al tratamiento de D y HS+D mostraron valores significativamente diferentes ($p < 0.05$), siendo el D el de mayor IC en cada uno de los períodos de muestreo. Este resultado corrobora el éxito de la aplicación de etileno, el cual logró acelerar la evolución del color verdoso al color del “ fruto maduro” . En todos los casos, los frutos sometidos al tratamiento combinado (HS+D), si bien presentaron un color aceptable, el desarrollo del mismo fue menor al inducido por el tratamiento de D sólo, sugiriendo una atenuación del efecto del desverdizado debido a la aplicación del calor. En relación al tratamiento térmico sólo, si bien este produjo una variación significativa del color inmediatamente después de aplicado (M1₀), el valor de IC obtenido no sufrió modificaciones durante la conservación a 2°C.

El análisis del IC de los frutos sometidos a la simulación de la comercialización (Tabla 9), muestra un comportamiento similar al obtenido durante la frigoconservación (Tabla 8). El IC en los frutos no tratados (C) mostró una tendencia

($p > 0.05$) a aumentar durante la conservación a 9°C (M30₇). Se observa también en esta tabla, que los mayores valores de IC ($p < 0.05$) se obtuvieron en los frutos que fueron sometidos al tratamiento de D y HS+D. Este resultado sugiere que aquellos cambios generados por los tratamientos y/o la conservación en frío no son modificados por la exposición de los frutos a temperatura ambiente (TA).

Tabla 9. Evolución del IC (medias y errores estándar) en mandarinas “Nova”, luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₇	M30 ₇	M45 ₇	M60 ₇
C	6,9 ± 0,3 e	7,9 ± 0,3cde	9,1 ± 0,3 cd	10,1 ± 0,3 c	10,1 ± 0,3 c
D	16,4 ± 0,3 a	16,1 ± 0,3 a	15,6 ± 0,3 a	15,6 ± 0,3 a	15,7 ± 0,3 a
HS	9,0 ± 0,3 cd	9,6 ± 0,3 c	9,5 ± 0,3 c	9,9 ± 0,3 c	9,9 ± 0,3 c
HS+D	12,7 ± 0,3 b	13,1 ± 0,3 b	13,2 ± 0,3 b	13,3 ± 0,3 b	14,0 ± 0,3 b
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	Covariable
	*	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0,05$

En la **Tabla 10** se muestra la evolución de los valores de IC de las mandarinas durante la conservación a 9°C y en la **Tabla 11**, el IC de los frutos que estuvieron expuestos a 20°C por otros 7 días. Debe destacarse que a la temperatura de conservación de 9°C también hubo interacción entre los tratamientos y los tiempos ensayados ($p < 0.05$).

Tabla 10. Evolución del IC (medias y errores estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	6,3 ± 0,4 i	11,6 ± 0,4 fg	12,9 ± 0,4 efg	16,6 ± 0,4 bc	17,5 ± 0,4 abc
D	16,2 ± 0,4 bcd	17,0 ± 0,4 bc	17,9 ± 0,4 ab	17,8 ± 0,4 ab	19,2 ± 0,4 a
HS	9,1 ± 0,4 h	9,5 ± 0,4 h	10,9 ± 0,4 gh	13,1 ± 0,4 ef	15,5 ± 0,4 cd
HS+D	12,3 ± 0,4 fg	12,8 ± 0,4 efg	13,5 ± 0,4 ef	13,5 ± 0,4 def	14,4 ± 0,4 de
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Tabla 11. Evolución del IC (medias y errores estándar) en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₇	M30 ₇	M45 ₇	M60 ₇
C	6,3 ± 0,4 i	11,1 ± 0,4 gh	13,9 ± 0,4 de	17,2 ± 0,4 abc	18,1 ± 0,4 ab
D	15,6 ± 0,4 cd	15,8 ± 0,4 cd	18,9 ± 0,4 ab	19,1 ± 0,4 ab	19,4 ± 0,4 a
HS	8,9 ± 0,4 h	9,2 ± 0,4 h	11,5 ± 0,4 fg	14,4 ± 0,4 de	16,9 ± 0,4 bc
D + HS	12,2 ± 0,4 efg	12,4 ± 0,4 efg	13,7 ± 0,4 def	14,5 ± 0,4 de	15,7 ± 0,4 cd
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

El IC de los frutos conservados a la temperatura de 9°C (Tabla 10) evolucionó en el tiempo de manera diferente dependiendo de los tratamientos aplicados. Se

destaca un primer incremento del IC en los frutos control (C) a partir de los 15 días de conservación (M15₀) y un segundo aumento hacia los 45 días (M45₀) ($p < 0.05$). En los frutos sometidos al tratamiento térmico exclusivamente, el color se incrementó más lentamente, ya que los aumentos se produjeron a los 45 días (M45₀) y 60 días (M60₀). Los frutos sometidos al tratamiento de desverdizado (D) mostraron un alto IC inmediatamente después de tratados (M1₀), y manteniéndose este valor durante la conservación. Es interesante destacar que al combinar los tratamientos de D y HS, se produjo un aumento inicial del IC (menor que el correspondiente al D solo) que se mantuvo durante todo el período de almacenamiento.

Si comparamos los tratamientos entre sí en cada uno de los períodos de muestreo, no es posible describir un patrón de comportamiento. Sólo se señala que los frutos sometidos al tratamiento de desverdizado alcanzaron siempre valores mayores de IC que el resto, aunque no siempre esta diferencia fue estadísticamente significativa. Otro resultado a subrayar es que el efecto del tratamiento por calor aplicado previo al desverdizado, reduce el efecto producido por este último tratamiento. Este resultado se repite tanto en el almacenamiento a 9°C (**Tabla 10**) como durante la simulación de las condiciones de comercialización (**Tabla 11**).

Si bien no se realizó una comparación estadística del IC entre las dos temperaturas de conservación, se evidencia por comparación de las **Tablas 8 y 10** que los frutos de mandarina conservados a 9°C alcanzaron valores de IC más elevados que a 2°C. Coincidentemente con estos resultados, la observación visual de los frutos conservados a esa temperatura, mostró que los mismos presentaban una coloración regular en la totalidad de la superficie del flavedo.

Resulta de gran interés el hecho que los frutos sometidos a tratamiento térmico presentaron una coloración significativamente menor ($p < 0.05$) que los frutos control (salvo en un periodo inmediato posterior a su aplicación, **Tablas 10 y 11**). Esta diferencia se hace menos notable cuando se colocan los frutos durante 7 días a TA. Consecuentemente, se podría inferir que el efecto de las altas temperaturas es el de retrasar el desarrollo del color de los frutos, particularmente en el caso de las mayores temperaturas de conservación (9°C). En relación con esta última observación, tanto Salveit & Cabrera (1987), como Inaba & Chachin (1988), encontraron que las altas temperaturas inhibían el proceso de maduración en tomates

y otros frutos, aún después de interrumpida estas condiciones. Civello *et al.* (1997) también encontraron en frutillas tratadas térmicamente, un retraso en el desarrollo del color externo, siendo este fenómeno dependiente de la intensidad del tratamiento aplicado y del período de evaluación. Por el contrario, Lurie & Klein (1991) observaron un mayor desarrollo del color respecto del control en tomates tratados térmicamente, conservados a 2°C y finalmente expuestos a 20°C. Estos autores concluyeron que, aunque el tratamiento por calor “*per se*” es capaz de producir un retraso en la maduración, este retraso se mantendría sólo durante la conservación a bajas temperaturas, mientras que la exposición posterior a 20°C permitiría la continuación del proceso madurativo. Nuestros resultados indican que el efecto inhibitorio del tratamiento por calor sólo se pone de manifiesto si el fruto es conservado a la temperatura de 9°C y la exposición posterior a TA reduce estas diferencias. Según Paull & Chen (2000), la evolución del color es un proceso fisiológico de gran complejidad, el cual está afectado por diversos factores. Es probable que las diferencias encontradas entre las distintas investigaciones sea producto de un inadecuado control o de un control diferencial de estos factores.

En relación al efecto de la exposición al etileno, Martínez-Jávega (2002) observó que los frutos cítricos no sometidos a una atmósfera de etileno experimentaban una evolución del color más lenta en comparación con aquellos que estuvieron en presencia de este gas. En coincidencia con lo informado por estos autores, los resultados presentados en el presente trabajo de tesis muestran que para ambas temperaturas de conservación, los frutos expuestos a la atmósfera de etileno (D) fueron los que presentaron siempre un mayor IC a lo largo de todo el período de conservación (**Tablas 8 y 10**) y luego de la posterior exposición a 20°C por 7 días (**Tablas 9 y 11**). Este hecho destaca los beneficios del desverdizado, no sólo acelerando el proceso de cambio de color, sino también alcanzando valores de IC no logrados por los tratamientos térmicos dentro del período de conservación estudiado. Además, se observó que el efecto inhibitorio de los tratamientos térmicos sobre la evolución del color es detectado más claramente en los frutos sometidos posteriormente al tratamiento de desverdizado (D vs. HS+D). Un efecto similar fue descrito por Plaza *et al.* (2004) quienes informaron que el tratamiento de desverdizado aplicado a frutos de mandarina (5-10µl etileno a 20°C hasta alcanzar un

IC de $\cong 6$) fue más efectivo en inducir el desarrollo del color que cuando se aplicaron los tratamientos de calor simultáneamente (5-10 μ l etileno a 40°C por 24 h + 5-10 μ l etileno a 20°C hasta alcanzar un IC de $\cong 6$). Según Wheaton & Stewart (1973), los cambios que ocurren durante el proceso de desverdización involucran dos aspectos: la destrucción de la clorofila favoreciendo la manifestación de los pigmentos carotenoides presentes, y el desarrollo de estos últimos pigmentos hasta producir el color naranja característico de las mandarinas. Más aún, Cuquerella (1997) estableció que ambas reacciones enzimáticas, las de degradación de la clorofila y de síntesis de carotenoides, presentan temperaturas óptimas e inhibitorias diferenciales. Para la primera reacción, las temperaturas óptima e inhibitoria son de 28 y 40°C respectivamente, mientras que para la síntesis de carotenoides estas son de 18 y 30°C, respectivamente. Por lo tanto, al someter los frutos a una temperatura de 40°C por 24 h se vería afectada en forma negativa la síntesis de carotenoides, mientras que la degradación de la clorofila continuaría, aunque en forma más lenta. Es posible que la alta temperatura utilizada en el tratamiento térmico de las mandarinas (36°C, 48 h) haya inducido el retraso o la inhibición de la síntesis de carotenoides, lo que en definitiva se reflejaría en un menor valor de IC. En el caso de los frutos que fueron conservados a 9°C, el desarrollo del color sólo sufrió un retraso temporáneo, ya que al exponerlos a TA (7 días) se logró la reactivación de la síntesis de carotenoides. Debe destacarse que en esas condiciones se alcanza al cabo de 45 días (M457; **Tabla 11**) un IC similar al obtenido inmediatamente después de aplicado el tratamiento de desverdizado. En cambio, los frutos conservados a 2°C no logran, aun luego de expuestos a TA, alcanzar el valor de IC producido por el tratamiento de desverdizado sólo.

Considerando tanto los resultados propios como los informados en la literatura, puede concluirse que la aplicación del tratamiento de desverdizado sólo es más efectiva en favorecer el desarrollo del color del fruto, que si se lo aplica combinado con el tratamiento térmico.

3.1.1.2 Pérdida de peso

La **Tabla 12** muestra la PP de mandarinas conservadas por un período de 60 días a 2°C, y la **Tabla 13** muestra la evolución de este parámetro bajo las mismas

condiciones de conservación pero manteniendo luego los frutos durante 7 días a 20°C. La **Tabla 14** muestra la evolución de la PP de mandarinas conservadas a 9°C durante 60 días y la **Tabla 15** la evolución de este parámetro en la misma fruta luego de la conservación y del período de 7 días a 20°C.

Los resultados indican que la PP de los frutos es afectada tanto por los tratamientos aplicados, como por el tiempo y la temperatura de conservación. Cuando los frutos son conservados tanto a 2°C y a 9°C (**Tablas 12 y 14**), se detecta en todos los tratamientos un aumento de la PP en comparación con el C, produciéndose la mayor PP con la combinación de HS+D. En los tratamientos C, D y HS, las pérdidas aumentan a medida que transcurre el período de almacenamiento, siendo las correspondientes al tratamiento térmico las de mayor valor del grupo. Durante la conservación a 2°C, la combinación de los tratamientos de D y HS, produce una PP elevada ya a los 15 días (M15₀) y se mantiene en estos valores casi hasta la finalización del período, momento en el que vuelve a aumentar ($p < 0.05$).

Tabla 12. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova ” durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo			
	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	1,2 ± 0,2 k	2,4 ± 0,3 j	3,8 ± 0,7 i	4,5 ± 0,6 hi
D	5,0 ± 0,6 h	6,0 ± 0,7 g	6,2 ± 0,5 fg	7,3 ± 0,7 de
HS	6,9 ± 0,9 ef	8,1 ± 0,8 d	8,1 ± 0,8 d	10,0 ± 0,6 ab
HS+D	9,3 ± 0,9 bc	8,9 ± 0,8 c	9,7 ± 0,8 b	10,9 ± 0,9 a
Nivel de Significancia del ANOVA				
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti
	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Si la conservación se lleva a cabo a 9°C, las PP se van incrementando –aunque más lentamente– durante los 60 días del estudio. Cuando estos mismos frutos son

luego expuestos a 20°C por 7 días (Tablas 13 y 15), las PP siguen un patrón similar al descripto para las Tablas 12 y 14.

Tabla 13. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreos			
	M15 ₇	M30 ₇	M45 ₇	M60 ₇
C	3,1 ± 0,5 j	4,0 ± 0,4 i	6,6 ± 0,9 g	8,6 ± 1,0 e
D	5,7 ± 0,6 h	8,4 ± 0,9 ef	9,9 ± 0,8 d	10,3 ± 0,8 cd
HS	7,6 ± 1,3 f	9,9 ± 1,0 d	10,9 ± 0,9 c	12,4 ± 0,9 b
HS+D	9,7 ± 1,1 d	10,9 ± 1,3 c	13,0 ± 0,9 ab	13,7 ± 1,2 a
Nivel de Significancia del ANOVA				
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti
	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0,05$.

Es importante mencionar que aun cuando no se compararon estadísticamente ambos resultados (Tablas 12 y 14 vs. Tablas 13 y 15) los valores de PP fueron mayores cuando se expusieron los frutos a TA durante 7 días. Al final de los ensayos la deshidratación de los frutos resultó ser similar para ambas temperaturas de conservación estudiadas, por ejemplo en el tratamiento HS+D: 10,9% vs. 12,2% (Tablas 12 y 14); y 13,7 vs. 14,8 luego de 7 días a 20°C (Tablas 13 y 15) para 2 y 9°C, respectivamente.

Schirra *et al.* (2004) informaron que naranjas de la variedad “ Blood” sometidas a tratamiento térmico en cámara (37°C por 48 h) ó por inmersión en agua caliente (50°C por 3 min) sufrieron una PP mayor que la fruta no tratada. Los resultados informados por estos autores concuerdan con los obtenidos en esta tesis, donde las temperaturas utilizadas en los tratamientos térmicos incrementaron la deshidratación de los frutos con el consecuente aumento de las PP.

Tabla 14. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova ” durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo			
	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	1,3 ± 0,1 k	1,7 ± 0,4 k	3,1 ± 0,3 j	4,0 ± 0,4 i
D	5,1 ± 0,8 h	4,8 ± 0,5 h	5,2 ± 0,5 g	6,9 ± 0,8 ef
HS	6,4 ± 1,2 fg	6,3 ± 0,9 fg	7,3 ± 1,2 e	8,5 ± 1,1 d
HS+D	10,0 ± 1,1 c	9,8 ± 1,0 c	10,8 ± 1,2 b	12,2 ± 1,0 a
Nivel de Significancia del ANOVA				
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti
	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Tabla 15. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova ” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreo			
	M15 ₇	M30 ₇	M45 ₇	M60 ₇
C	2,9 ± 0,2 k	2,9 ± 0,4 k	5,6 ± 0,5 j	7,6 ± 0,6 hi
D	6,1 ± 0,9 j	6,9 ± 0,6 i	8,9 ± 0,9 fg	9,5 ± 0,9 ef
HS	7,3 ± 1,3 hi	8,1 ± 0,9 gh	9,8 ± 1,3 de	10,6 ± 1,0 d
HS+D	10,5 ± 0,9 d	11,5 ± 1,1 c	13,7 ± 1,3 b	14,8 ± 1,2 a
Nivel de Significancia del ANOVA				
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti
	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Alfárez *et al.* (2005) observaron que diferentes temperaturas de conservación producían distintos efectos sobre la PP; así el porcentaje de PP en naranjas

“ Navel” almacenadas a 2°C durante un período de 2 meses fue del orden del 3%, mientras que esa misma fruta conservada a 12°C sufrió una PP significativamente ($p > 0.05$) más pronunciada (>6%). En cambio, si comparamos la PP que se alcanzaron a ambas temperaturas de conservación (no evaluado estadísticamente) en el presente trabajo de tesis, vemos que los valores obtenidos fueron muy similares durante todo el período de conservación (60 días) en cualquiera de los tratamientos ensayados. Es probable que la diferencia de los resultados entre ambos trabajos se deba a la utilización mayor de una temperatura de almacenamiento (12°C) en comparación con la utilizada en nuestros ensayos (9°C).

Es sabido que luego de la cosecha y durante el almacenamiento, la PP de los frutos se incrementa como consecuencia de la transpiración, resultando en una disminución de la calidad y de la aceptabilidad de los mismos. Estas PP suelen ocasionar mermas superiores al 5% durante la comercialización, y al 7% luego de la conservación frigorífica por un período de tres meses seguido de la simulación de la comercialización (Jiménez-Cuesta *et al.*, 1983). Las condiciones que generan una elevada pérdida de agua aceleran a su vez la senescencia, provocando una marcada pérdida de la calidad del fruto, tanto por la aparición de arrugas en la corteza como por el encogimiento y ablandamiento del mismo (Guerra, 1996). Se ha demostrado que las pérdidas comerciales producidas por deshidratación pueden en algunos casos superar a las producidas por las podredumbres (Martínez-Jávega, 1997).

En las frutas las PP pueden asociarse también, aunque en menor medida, al proceso de respiración. En las manzanas, por ejemplo, se estima que las PP debidas a la transpiración constituye un 10% del total. En el caso de los cítricos, la tasa respiratoria es baja (7-9 mgCO₂/kg.h) en comparación con otros frutos como tomates (13-16 mgCO₂/kg.h), duraznos (16 mgCO₂/kg.h) y frutillas (49-95 mgCO₂/kg.h) medidos a 10°C (Hardenburg *et al.*, 1990). Sin embargo, debe considerarse que la tasa respiratoria aumenta de manera exponencial con el incremento de la temperatura. Respecto a este punto, Burdon *et al.* (2007) demostraron que la tasa respiratoria, en mandarinas “ Satsuma” , aumentaba en función de la temperatura utilizada en el tratamiento térmico (3-5 días a 10, 18 ó 30°C). Este último hecho permite sugerir que un determinante significativo de la PP en frutas sometidas a tratamientos térmicos, es la aplicación del tratamiento en sí mismo. Si bien las PP

debidas a la aplicación del tratamiento térmico son difíciles de prevenir, la tasa de transpiración en cambio, puede ser reducida aumentando la HR ambiente, disminuyendo la temperatura de conservación, reduciendo el movimiento de aire o aplicando envoltorios protectores. De esta forma, considerando los valores elevados de PP registrados en los frutos de mandarinas sometidos a los tratamientos térmicos ensayados en la presente tesis, resultaría interesante experimentar con el uso de envoltorios durante la conservación a efectos de reducir o limitar esta problemática.

3.1.1.3 Porcentaje de jugo

En las **Tabla 16 y 17** se representa la variación del porcentaje de jugo durante la conservación de mandarinas a 2°C y 9°C respectivamente. A ambas temperaturas de conservación, los frutos C y los sometidos a los tratamientos de D y HS, no mostraron variaciones significativas de porcentaje de jugo durante el período de conservación en estudio. En cambio, cuando se combinaron los tratamientos (HS+D), se observa una disminución de la cantidad de jugo a los 15 días de almacenamiento (M15₀), valor que se mantiene hasta el final del estudio. Si bien sólo en este último caso la disminución del porcentaje de jugo es estadísticamente significativa, en los otros casos y particularmente en los frutos tratados por calor, el % de jugo disminuyó. Este efecto podría estar asociado a la disminución del PP demostrada durante la conservación (**Tablas 12 y 14**).

Es importante destacar que para ambas temperaturas analizadas, el porcentaje de jugo siempre estuvo por encima de los mínimos establecidos por la reglamentación argentina para la comercialización de mandarinas en el mercado externo, que es del 35% (IASCAV, 1993).

Tabla 16. Evolución del porcentaje de jugo (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	44,9± 1,6 cd	46,0 ± 2,1 cd	44,4 ± 2,3 cd	46,5 ±1,2 bcd	46,7±1,1 abcd
D	47,8 ±0,8 abc	45,6 ± 1,2 cd	46,1 ± 1,1 cd	46,9± 0,2 abc	45,8 ± 0,5 cd
HS	51,2 ± 0,4 ab	46,1 ± 1,7 cd	46,4 ±1,5 bcd	44,0 ± 1,6 cd	41,8 ± 3,3 d
HS+D	51,7 ± 1,9 a	43,1 ± 2,1 cd	46,0 ± 0,9 cd	44,3 ± 1,0 cd	43,4 ± 2,3 cd
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	
	*	NS	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). NS: no significativo
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Tabla 17. Evolución del porcentaje de jugo (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	44,9±1,6cdef	48,3±1,5abcd	46,8±0,1bcdef	48,9 ±0,1abc	45,9±0,1bcdef
D	47,7±0,8abcde	46,8±0,7bcdef	49,2 ± 0,1 ab	46,5±0,1bcdef	43,6 ± 0,1 efg
HS	51,2 ± 0,4 a	43,2 ± 2,3 fgh	44,2 ± 0,1 def	44,0 ± 0,1 efg	39,2 ± 0,1 h
HS+D	51,7 ± 1,9 a	44,1 ± 1,6 def	45,0 ±0,1cdef	39,9 ± 0,1 gh	43,7 ± 0,1 efg
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

3.1.1.4 Sólidos solubles totales

La **Tabla 18** muestra la evolución de los SST inmediatamente después de aplicados los tratamientos (M1₀) y luego de la conservación a 2°C durante un período de 60 días. Los resultados indican que a esta temperatura de conservación, los SST no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados, ni durante el período de conservación dentro de un mismo tratamiento.

La **Tabla 19** muestra la evolución de los SST durante la conservación a 9°C. Los resultados encontrados a esta temperatura son similares a los observados a 2°C, a excepción de los frutos tratados térmicamente, donde se observa un aumento de SST en comparación con el C a partir de los 30 días de conservación (M30₀).

La determinación de SST en el jugo de las frutas se realiza mediante la medición de °Brix. Los SST representan fundamentalmente el contenido de azúcares (70-85%), ácido cítrico y sus sales (10%) y en menor proporción el contenido de otros compuestos como lípidos, nitrógeno, sustancias fosforadas, y pectinas (Baldwin, 1993).

La información obtenida a partir de una revisión bibliográfica indica que el contenido de SST no es afectado, en forma importante, por la aplicación de tratamientos térmicos. Así, distintos autores (Klein & Lurie, 1990; Klein *et al.*, 1990; Lui, 1978) informaron que los SST en manzanas tratadas por calor (4 días a 38°C) previo a ser conservadas a bajas temperaturas, no difirieron de aquellas no tratadas. Jacobi & Giles (1997) utilizando tratamientos con vapor para el control de los insectos en frutos de mango, tampoco encontraron diferencias significativas en los SST entre frutos tratados y no tratados.

En forma similar a otros frutos, los SST en cítricos tampoco fueron afectados por la aplicación de tratamientos térmicos (Paull & Chen, 2000; Porat *et al.*, 2000a; Schirra *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007). Los resultados encontrados en este trabajo de tesis, concuerdan con esta última información. Es interesante comentar que a pesar de que la concentración de los SST dependen de un gran número de factores, tales como el contenido de agua, de azúcares y de ácidos del fruto (Burdon *et al.*, 2007), la aplicación de cualquiera de los tratamientos propuestos no logró modificar este valor.

Tabla 18. Evolución de los SST expresados en °Brix (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	10,2±0,2 abc	10,3±0,1 abc	9,7±0,4 bc	9,9±0,5 abc	9,6±0,2 c
D	9,9± 0,5 abc	10,1±0,1 abc	10,5±0,3 abc	9,8±0,6 bc	10,4±0,1 abc
HS	9,5±0,1 c	10,5±0,1 ab	9,9±0,1 abc	10,3±0,2 abc	10,1±0,3 abc
HS+D	9,9±0,2 abc	9,8±0,3 bc	10,8±0,1 a	10,4±0,3 abc	10,1±0,2 abc
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	
	*	NS	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). NS: no significativo
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, ($p < 0.05$)

Tabla 19. Evolución de los SST expresados en °Brix (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	10,2±0,2 abcde	9,5±0,2 cdef	9,3 ± 0,5 ef	9,4±0,3 def	9,2±0,5 f
D	9,9±0,5 bcdef	10,3±0,3 abcd	10,4 ± 0,2 abc	10,2±0,3 abcde	10,1±0,2 abcdef
HS	9,5±0,1 cdef	10,2±0,5 abcde	10,5 ± 0,1 ab	10,8±0,1 ab	10,3±0,1 abcd
HS+D	9,9±0,2 bcdef	10,3 ± 0,3 abcd	10,7 ± 0,1 ab	10,8±0,1 ab	10,9±0,2 a
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

3.1.1.5 Acidez total

La **Tabla 20** muestra la evolución de AT en los frutos conservados a 2°C durante un período de 60 días. Los resultados indican que solamente en los frutos tratados térmicamente (HS y HS+D) se observó, inmediatamente después de aplicados los tratamientos (M1₀), una reducción significativa de la AT en relación al C. Sin embargo, en los muestreos posteriores no se detectaron diferencias entre el C y los distintos tratamientos ensayados.

En general, se observa que durante la conservación frigorífica la AT tiende a disminuir muy lentamente, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sólo en los frutos C, la AT disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a los 30 días de almacenamiento (P30₀). En los frutos tratados este parámetro no se modificó durante todo el período de estudio.

Tabla 20. Evolución de la AT expresada como g ác. cítrico/100 g fruta (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	1,04± 0,04 a	0,93 ±0,03abc	0,81 ± 0,04 ced	0,82±0,03bcde	0,77± 0,05 def
D	0,95± 0,05 ab	0,86± 0,03bcd	0,87 ± 0,07 bcd	0,80±0,08cdef	0,80±0,06cdef
HS	0,87± 0,02bcd	0,78 ± 0,02def	0,72 ± 0,03 ef	0,73±0,02 def	0,77± 0,09 def
HS+D	0,80±0,02cdef	0,75 ± 0,03def	0,81 ± 0,02 cde	0,72±0,03 ef	0,67± 0,03 f
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

A la temperatura de conservación de 9°C (**Tabla 21**), los resultados observados son similares a los obtenidos durante la conservación a 2°C. Así, la acidez del jugo tiende a disminuir durante el transcurso de la conservación en los

distintos tratamientos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Al comparar los tratamientos entre sí, sólo se detectaron diferencias significativas en los tratamientos térmicos (HS y HS+ D), inmediatamente después de ser aplicados (M1₀), los cuales estaban disminuidos respecto del C.

Tabla 21. Evolución de la AT expresada como g ác. cítrico/100 g fruta (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	1,04± 0,04 a	0,87±0,04 bcde	0,75±0,07 defg	0,74±0,03 defg	0,67 ± 0,07 g
D	0,95± 0,05 ab	0,89±0,02 bc	0,84±0,04 bcde	0,81±0,06 cdefg	0,76 ± 0,04 defg
HS	0,87±0,02 bcd	0,78±0,05 cdefg	0,74±0,06 efg	0,74±0,03 defg	0,68 ± 0,05 fg
HS+D	0,80±0,02cdef	0,74±0,03 defg	0,75±0,06 defg	0,71±0,07 fg	0,70 ± 0,03 fg
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

La bibliografía indica que en distintas frutas tales como manzanas, frutillas y nectarinas la aplicación de altas temperaturas, previo a la conservación en frío, produce una reducción de la AT (Klein & Lurie, 1990, 1992; Lay-Yee & Rose, 1994; Garacia *et al.*, 1995). En cítricos, también se ha observado un efecto similar por la aplicación de tratamientos térmicos (Miller & McDonald, 1991; Shellie & Mangan, 1998; Burdon *et al.*, 2007). En este trabajo de tesis, en concordancia con los resultados reportados por otros autores, se observó una disminución significativa en la AT inmediatamente después de aplicados ambos tratamientos térmicos (HS y HS+ D).

El ácido cítrico representa el 85–95 % del total de los compuestos presentes en el jugo de los frutos cítricos, y es el compuesto determinante del valor de la AT. Desde el punto de vista tecnológico, el valor de AT no es utilizado como parámetro

independiente, sino que es usado fundamentalmente para calcular el índice de madurez ($IM = SST/AT$). A su vez, el IM es utilizado para determinar el momento oportuno de la cosecha, ya que estaría indicando el balance entre los sabores dulce y ácido.

Burdon *et al.* (2007), observaron que la exposición de mandarina “ Satsuma” a altas temperaturas producía una alteración en el metabolismo ácido, causando una reducción en la AT de hasta un 30%, debida principalmente a la reducción al ácido cítrico. En relación a los factores que influyen sobre la variación de este parámetro, estos autores fundamentan que el grado de disminución de la AT sería altamente dependiente del estado metabólico de la fruta al momento de la cosecha. En cambio, Paull & Chen (2000) establecen que el efecto de un tratamiento térmico sobre la AT estaría ligado principalmente a la temperatura utilizada y a la duración del tratamiento aplicado, siendo independiente de la especie/variedad utilizada.

En relación a la variación de la AT durante la conservación, Murata (1977) observó una disminución del ácido cítrico durante el almacenamiento de mandarinas a bajas temperaturas y postuló que la tasa de recambio (*turnover*) del ácido cítrico era alta durante el almacenamiento. Por lo tanto, la disminución de AT parecería estar ligada al hecho que el metabolismo de los ácidos orgánicos se continúa luego que la fruta es cosechada, utilizándose estos compuestos como sustratos energéticos (Kato & Kubota, 1978). Sin embargo, en este trabajo de tesis si bien se observó una disminución ($p < 0.05$) de la AT inmediatamente después de aplicados los tratamientos térmicos, esta disminución no fue significativa durante la conservación a cualquiera de las dos temperaturas ensayadas. Es probable que el efecto de las temperaturas de conservación haya sido el de atenuar las diferencias originadas por los tratamientos aplicados.

Considerando la gran importancia que poseen los ácidos orgánicos desde el punto de vista sensorial, y la influencia de los tratamientos térmicos sobre los mismos, sería interesante realizar a futuro estudios más detallados determinándose la composición en ácidos del jugo de frutos sometidos a diferentes condiciones. Esta información permitiría comprender mejor el efecto, sobre cada ácido en particular, de la aplicación de los tratamientos térmicos y conocer la evolución de los mismos a las distintas temperaturas de conservación.

3.1.1.6 Índice de madurez

La **Tabla 22** muestra la evolución de los valores de IM en los frutos de mandarinas sometidos a los diferentes tratamientos durante la conservación a 2°C. En esta tabla se observa en general para todos los tratamientos, que el IM de los frutos tiende a aumentar a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, aunque muchas de las diferencias observadas no son estadísticamente significativas. Los mayores valores de IM fueron registrados siempre en los frutos sometidos a los tratamientos térmicos (HS y HS+D), siendo la diferencia estadísticamente significativa a los 15 días (M15₀) y a los 45 días (M45₀) de conservación. Al final de los ensayos (M60₀), solamente el tratamiento combinado mostró valores significativamente mayores de IM ($p < 0.05$) que el resto de los tratamientos.

Tabla 22. Evolución del IM (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀
C	9,9 ± 0,5 i	11,1 ± 0,5 ghi	11,9 ± 0,3 efg	12,1 ± 0,5 efg	12,4 ± 0,5 cdefg
D	10,3 ± 0,2 hi	11,7 ± 0,3 fgh	12,1 ± 0,7 efg	12,3 ± 1,0 defg	13,0 ± 0,8 bcdef
HS	11,0 ± 0,3 ghi	13,4 ± 0,2 abcd	13,9 ± 0,2 abcd	14,0 ± 0,2 abc	13,3 ± 1,3 bcde
HS+D	12,3 ± 0,2 defg	13,0 ± 0,1 bcdef	13,3 ± 0,2 bcde	14,4 ± 0,4 ab	15,1 ± 0,7 a
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

En la **Tabla 23** se observan los valores de IM correspondientes a las mandarinas conservadas a 9°C. Debido a que a esta temperatura de conservación la interacción tratamiento-tiempo (Tto*Ti) no fue significativa ($p > 0.05$), la comparación de medias entre los factores tratamiento y tiempo de conservación fue realizada en forma independiente, correspondiendo las letras en minúscula a las diferencias entre

tratamientos (Tto), y las mayúsculas a las diferencias entre tiempos de conservación (Ti) (ver detalles al pie de tabla). A diferencia de los resultados obtenidos con los frutos almacenados a 2°C, a esta temperatura de almacenamiento el IM aumentó consistentemente ($p < 0.05$) en los frutos tratados durante el periodo de almacenamiento estudiado.

Si se comparan los tratamientos entre sí, el tratamiento térmico sólo o combinado con el desverdizado, fue el que presentó los mayores valores de IM, siendo sus diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre sí y respecto de los tratamientos C y D, en cada uno de los periodos de almacenamiento analizados.

Tabla 23. Evolución del IM (medias y desvíos estándar) en mandarinas “ Nova ” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Período de muestreo					Tto
	M1 ₀	M15 ₀	M30 ₀	M45 ₀	M60 ₀	
C	9,9 ± 0,5	11,0 ± 0,7	12,5 ± 0,6	12,7 ± 0,4	13,9 ± 0,9	c
D	10,3 ± 0,2	11,5 ± 0,1	12,2 ± 0,3	12,7 ± 0,6	13,3 ± 0,6	c
HS	10,9 ± 0,3	13,1 ± 0,3	14,3 ± 0,3	14,6 ± 0,5	15,2 ± 1,0	b
HS+D	12,3 ± 0,2	13,9 ± 0,3	14,3 ± 0,6	15,3 ± 1,4	15,5 ± 0,7	a
Ti	D	C	B	AB	A	
Nivel de Significancia del ANOVA						
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti		
	*	*	*	NS		

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. ANOVA * $p < 0.05$; NS: no significativo

Letras distintas en **minúscula** indican diferencias significativas por **tratamiento** ($p < 0.05$ LSMEANS) y letras distintas en **mayúscula** indican diferencias significativas por **tiempo** ($p < 0.05$ LSMANS).

Una revisión bibliográfica mostró que en frutos como pomelos (Porat *et al.*, 2000b), distintas variedades de naranja (Schirra *et al.*, 2004) y mandarinas “ Satsuma ” (Hong *et al.*, 2007), sometidos a almacenamientos prolongados a bajas temperaturas, se obtuvieron valores de IM del orden de los obtenidos en este trabajo de tesis.

Durante la maduración fisiológica de los frutos en el árbol, el valor de IM tiende a aumentar a medida que se acerca la fecha de recolección, ya sea por la dilución del ácido cítrico durante el crecimiento del fruto o por su metabolización durante el proceso de respiración (Mazzuz, 1996). A fin de tener una referencia acerca del significado práctico de los valores de IM, puede mencionarse que una relación de 8-10 es considerada un valor de “ madurez mínima” , mientras que los frutos con una relación comprendida entre 10 y 16 son considerados de “ calidad aceptable” . Si la fruta permanece en el árbol, los SST continúan aumentando mientras que la acidez disminuye. Al alcanzar un valor de SST/AT de 20 ó mayor, el fruto se transforma eventualmente en sobremaduro presentando un sabor demasiado dulce (Samson, 1986). Para las naranjas y las mandarinas, el valor límite es de aproximadamente 13; por encima de este valor la pérdida de la acidez acorta el período de comercialización (Mazzuz, 1996). En este sentido, uno de los beneficios potenciales de la aplicación de tratamientos térmicos en frutos cítricos es que estos pueden incrementar el valor de IM entre un 10 y 30% (Klein & Lurie, 1992), otorgándole de esta forma un sabor más dulce a los frutos, característica que los hace más atractivos para muchos de los consumidores. En concordancia con esto, los resultados presentados en esta tesis muestran que los frutos sometidos a los tratamientos térmicos alcanzaron, luego de 60 días de conservación (M60₀), valores elevados de IM (>13) a cualquiera de las dos temperaturas evaluadas (**Tablas 22 y 23**). Si bien estos valores están próximos al límite fijado para mandarinas y podrían reducir el período de comercialización, esta dificultad podría ser controlada en experimentos futuros aplicando tratamientos de menor intensidad (relación tiempo-temperatura).

3.1.1.7 Alteraciones fisiológicas

- **Daño por frío**

Es bien conocido que muchos de los síntomas del DF permanecen latentes a la salida de la conservación y sólo se manifiestan durante la exposición a temperaturas por encima del umbral crítico de daño (Lyons & Breidenbach, 1987). Por lo tanto el objetivo de exponer los frutos a 20°C (TA) luego de la conservación frigorífica en

esta tesis, fue poner de manifiesto el potencial daño inducido por la exposición a bajas temperaturas.

La sola exposición de los frutos de mandarina a 2°C durante un período de 60 días no indujo el desarrollo de las típicas lesiones de DF (*pitting*). Sin embargo, cuando la fruta fue transferida a TA se constató la presencia de frutos con DF en los frutos sometidos al tratamiento de desverdizado (D), aunque es importante destacar que el valor del IDF en estos casos no fue superior a 0,025 (**Fig. 20**). En cambio, cuando la fruta se mantuvo a 9°C no se registraron síntomas asociados a esta alteración, ni a la salida de la conservación ni luego de someterlos a las condiciones de comercialización (7 días a 20°C).

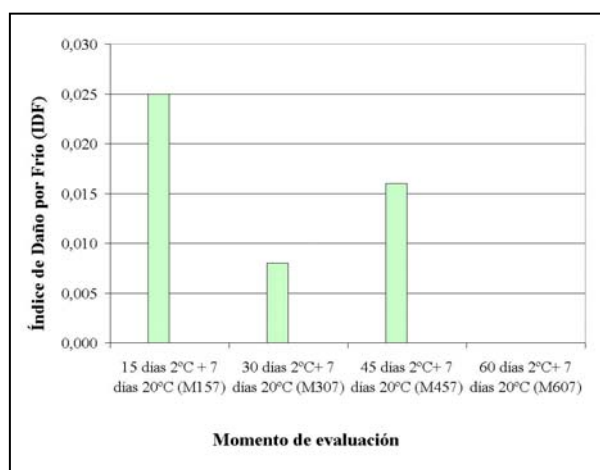
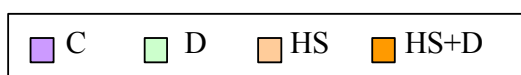


Figura 20. IDF en mandarinas “ Nova” luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C). Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: control (C), tratamiento de desverdizado con 5 ppm de etileno a 20°C durante 48 h (D), tratamiento térmico por 48 h a 36°C (HS) y tratamiento térmico por 48 h a 36°C seguido de tratamiento de desverdizado (HS+D).



Debe tenerse en cuenta que no todas las variedades de cítricos presentan la misma susceptibilidad al DF. Diversos autores han identificado a los cultivares de mandarinas “ Nova” y “ Fortuna” como susceptibles al DF (Cuquerella *et al.*, 1990;

Martínez-Jávega *et al.*, 1991, 1992), y por este motivo se eligió la variedad “ Nova” como modelo experimental en el presente trabajo de tesis. Sin embargo, los resultados de los ensayos realizados con esta variedad muestran que no fue posible poner de manifiesto los síntomas de DF, aún luego de 60 días de conservación a 2°C. Este resultado se verificó tanto en las frutas control (C) como en frutas expuestas a los diferentes tratamientos térmicos, imposibilitando en consecuencia evaluar el efecto protector de los tratamientos térmicos en nuestro modelo experimental. Sólo algunos de los frutos sometidos al tratamiento de desverdizado (D) sufrieron lesiones leves, y además éstas solamente se manifestaron luego de exponer los frutos durante 7 días a 20°C. Este último dato es coincidentes con lo informado en la bibliografía, donde se demuestra que la aplicación exógena de etileno, previo al almacenamiento de frutas cítricas a bajas temperaturas, potencia el desarrollo de las lesiones típicas de DF (Vázquez *et al.*, 2003; Lafuente & Zacarias, 2006). Es posible que, si la aplicación del tratamiento de desverdizado no fuera acompañada por otra práctica que atenuara su efecto, se incrementaría la susceptibilidad de los frutos al DF (**Fig. 20**).

Un aspecto de gran importancia a ser considerado en futuros estudios es el hecho de que la variedad “ Nova” no se haya comportado como susceptible al DF, este hecho marca la importancia de realizar este tipo de estudios en forma local y no considerar únicamente los resultados de investigaciones realizadas en otros lugares. Es sabido que la respuesta fisiológica de los frutos a las bajas temperaturas de almacenamiento presenta en general una gran complejidad. Diversos autores coinciden en que el comportamiento mostrado durante la conservación en frío depende tanto de factores pre- como pos-cosecha (Grierson & Hatton, 1977; Martínez-Jávega *et al.*, 1987). En relación a esto, Fidler (1968) indica que la susceptibilidad de los tejidos al DF puede ser alterada de manera crítica por distintos factores como la especie, el cultivo, y las condiciones morfológicas y fisiológicas del fruto en el momento de la exposición al frío, etc. En el caso de nuestra región, las condiciones ambientales de la misma, dentro de las cuales pueden mencionarse a las temperaturas diurnas y nocturnas, el tipo de suelo, y las contingencia climatológicas, podrían haber influido en el comportamiento diferencial observado para la variedad “ Nova” . Debe destacarse que esta variedad es utilizada a menudo como modelo

experimental en estudios de DF, habiendo sido informado por Martínez-Jávega *et al.* (1991) que mandarinas de esta variedad cultivadas en Gandía (Valencia, España), se comportaron como muy sensibles al frío durante la conservación a temperaturas de hasta 6°C. En consecuencia, la resistencia mostrada por estas mandarinas, cultivadas en la región de Entre Ríos, hace necesaria la evaluación de un modelo experimental alternativo que presente una probada sensibilidad a esta alteración en nuestras condiciones de producción.

- **Efecto de los tratamientos sobre las podredumbres**

Aún cuando se aplicaron compuestos antifúngicos durante el empaque de los frutos a efecto de prevenir el desarrollo de alteraciones patológicas, se incluyó en el presente trabajo la evaluación de podredumbres. De esta manera se logra un informe más detallado de la salud de los frutos.

Los resultados de este estudio indican la ausencia de podredumbres durante la exposición de las mandarinas “Nova” por un período de 60 días tanto a 2 como a 9°C. Únicamente fue detectado este síntoma en los frutos que fueron primero conservados a 9°C y luego expuestos por una semana a 20°C. En consecuencia, sólo se presentan los resultados correspondientes a las evaluaciones realizadas en esta última condición (**Fig. 21**). En la figura se observa que las manifestaciones de podredumbres comienzan recién a partir de los 30 días de almacenamiento en los tratamientos D, HS y HS+D. En este último tratamiento, y sólo hacia el final del período estudiado (HS+D; M60₇), el incremento de las podredumbres es más elevado. Es importante destacar que el porcentaje total de frutos con esta alteración no superó el 5%, valor considerado muy bajo a los fines comparativos.

Investigaciones previas (McCornack, 1972; Brown, 1986), sugieren que el desverdizado de la fruta con etileno (50µl/l) induce durante el almacenamiento un sustancial incremento del porcentaje de frutas con alteraciones patológicas causadas por *Diplodia* y *Penicillium italicum*. Si bien en esta tesis se encontró que las frutas sometidas al tratamiento de desverdizado (D) presentaron un cierto aumento en el porcentaje de podredumbres, este aumento fue menor al 3% (D; M30₇).

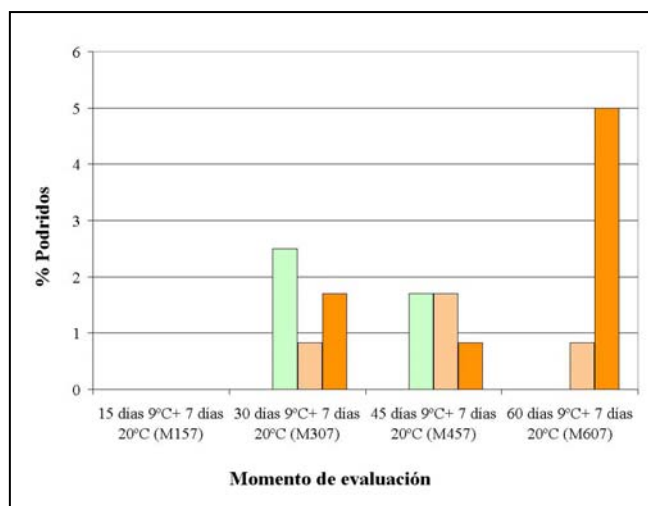
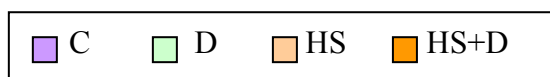


Figura 21. Porcentaje de podredumbres en mandarinas “ Nova” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C). Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: control (C), tratamiento de desverdizado con 5 ppm de etileno a 20°C durante 48 h (D), tratamiento térmico por 48 h a 36°C (HS) y tratamiento térmico por 48 h a 36°C seguido de tratamiento de desverdizado (HS+D).



Desde el punto de vista microbiológico, la elevada acidez de los frutos cítricos ($\text{pH} < 4,5$) es uno de los factores intrínsecos más importantes que determina que el microorganismo causante de las podredumbres sea el hongo. Si bien las bajas temperaturas reducen sustancialmente la tasa de germinación de esporas y el crecimiento de patógenos, a la temperatura de 0°C se observa aún el crecimiento de algunas especies como *Botrytis*, *Alternaria* o *Penicillium italicum*. El agregado de compuestos antifúngicos al agua de lavado de la fruta, reduce como máximo un 99% (en algunos casos sólo el 90%) la flora superficial de las mismas (1-2 reducciones logarítmicas) (Brackett, 1999). Desafortunadamente, este valor es menor al requerido por las normas de seguridad de los alimentos (99.99683%) (Sapers, 2001). Además, la susceptibilidad de los cítricos a las enfermedades de poscosecha aumenta durante el almacenamiento prolongado debido a que los patógenos provocan cambios fisiológicos en las frutas (Eckert & Ogawa, 1988). Como control “ no químico” para prevenir la podredumbre ocasionada por los microorganismos, la literatura indica que

la aplicación de tratamientos térmicos previo al almacenamiento frigorífico es altamente efectiva (Couey, 1989). En los ensayos realizados en esta tesis, sólo se detectó un bajo porcentaje de podredumbres durante la simulación de la comercialización en aquellos frutos que fueron almacenados a 9°C, especialmente en el tratamiento combinado (HS+ D) y hacia el final del período de evaluación (M60₇). Si bien 9°C es considerada una temperatura óptima para la conservación de las mandarinas, no deja de ser una temperatura inductora del desarrollo de microorganismos. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, puede afirmarse que en general los tratamientos aplicados no ocasionaron un aumento relevante del porcentaje de podredumbres.

3.1.1.8 Evaluación del efecto de los tratamientos aplicados sobre los parámetros determinantes de la calidad en frutos

La aplicación del Análisis Discriminante (AD) permite visualizar en forma conjunta los resultados obtenidos con las variables fisiológicas desde una perspectiva más integrada, en la cual ninguna variable posee *a priori* un peso estadístico determinado.

La **Fig. 22** muestra el resultado del AD de las muestras de mandarina en sus respectivos tratamientos utilizando los datos de las variables fisiológicas (IC, PP, %jugo, SST, AT e IM). El método de selección por pasos (*stepwise*) optó por las variables índice de color (IC) e índice de madurez (IM) como las de mayor peso para diferenciar los tratamientos. Se obtuvieron dos funciones discriminantes (FD1 y FD2) que explican el 85,3% y 14,7% de la varianza total respectivamente. Estas dos funciones discriminantes permitieron clasificar correctamente las muestras de mandarinas “ Nova” en sus respectivos grupos (tratamientos) con un nivel de éxito en la clasificación del 93,8%. La validación cruzada, procedimiento en el cual se analiza la robustez del método discriminante aplicado previamente, consiste en seleccionar un subconjunto entre los datos originales (muestra de validación), calcular luego una nueva función discriminante con los datos restantes, y utilizar esa nueva función para clasificar los datos de la muestra de validación. En este caso, el resultado que se obtuvo fue “ exitoso” en un 89,6%.

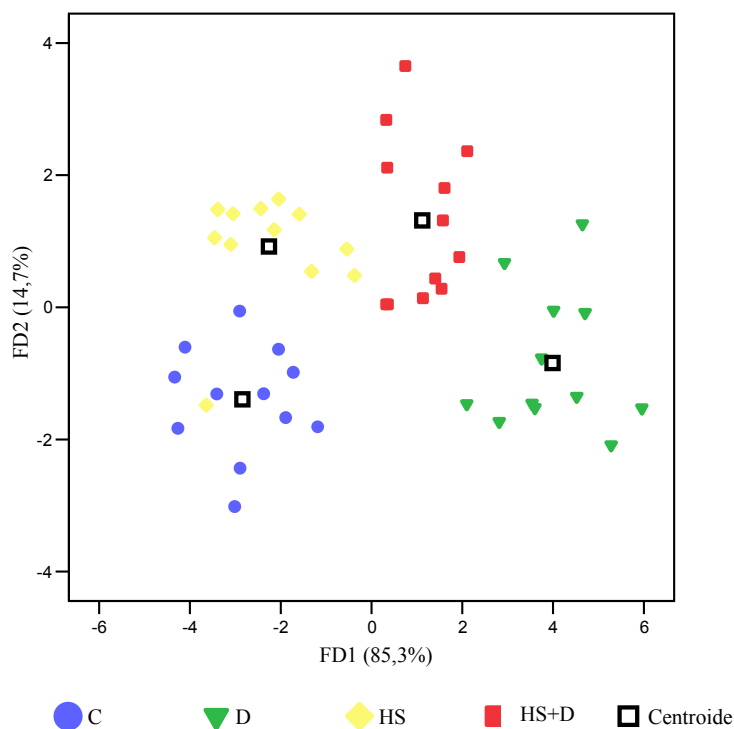


Figura 22: AD de las muestras de mandarinas “ Nova” durante la conservación a 2°C

Se obtuvieron las siguientes funciones discriminantes (coeficientes estandarizados):

$$dF1: 0,008*IM + 1,000*IC$$

$$dF2: 1,000*IM + 0,003*IC$$

El centroide del grupo (tratamiento) representa el valor medio de las funciones discriminantes en dicho grupo.

Consecuentemente, se pueden establecer las siguientes funciones de Fisher:

$$C = -6,407 - 8,400*IC - 2,133*IM$$

$$D = -9,690 + 11,742*IC - 1,222*IM$$

$$HS = -4,359 - 6,646*IC + 1,360*IM$$

$$HS+D = -2,875 + 3,304*IC + 1,995*IM$$

Es importante señalar que las variables seleccionadas por el AD, IC e IM, son sencillas de medir experimentalmente, y se las utiliza en forma habitual en la evaluación de los frutos en poscosecha.

Las funciones discriminantes de Fisher definieron claramente los 4 tratamientos y le asigna a las variables IC e IM el mayor peso para esta definición. En el análisis de los datos de IC (**Tabla 8**), el ANOVA logró también diferenciar claramente los tratamientos ensayados. Este resultado es coincidente con la selección de IC realizado por el AD, dando en consecuencia un mayor peso a la medición de esta variable a través de dos enfoques estadísticos diferentes. Sin embargo, cuando esta misma situación se analiza para el IM (**Tabla 22**), los resultados de ambos análisis, univariado y multivariado, no son similares ya que no se observa una clara diferenciación entre los tratamientos por el análisis estadístico de ANOVA. El AD se realiza teniendo en cuenta el conjunto de datos de todas las variables analizadas, y sobre esta base realiza una clasificación más completa de los tratamientos.

La ventaja del uso de este AD es que permitirá disponer de información *a priori* de las variables seleccionadas y proponer modificaciones experimentales que permitan discriminar entre tratamientos, a fin de diseñar ensayos futuros bajo condiciones experimentales similares a la de la presente tesis.

En el análisis de AD de los frutos conservados a 9°C (**Fig. 23**), se utilizaron las mismas variables fisiológicas que durante el análisis a 2°C. Las dos funciones discriminantes (FD1 y FD2) que se obtuvieron explican el 93,7% y 6% de la varianza total, respectivamente. La clasificación de cada muestra en su grupo de pertenencia (tratamiento) fue exitosa en un 72,9% y en un 64,6% luego de la validación cruzada. El método de selección por pasos, optó en este caso por el IC, el IM y el volumen de jugo, como las variables de mayor peso para la diferenciación de los tratamientos.

Se obtuvieron las siguientes funciones discriminantes (coeficientes estandarizados):

$$dF1: 1,144*IC - 0,930*IM + 0,401*Vol. de jugo$$

$$dF2: - 0,491*IC + 0,125*IM + 0,763*Vol. de jugo$$

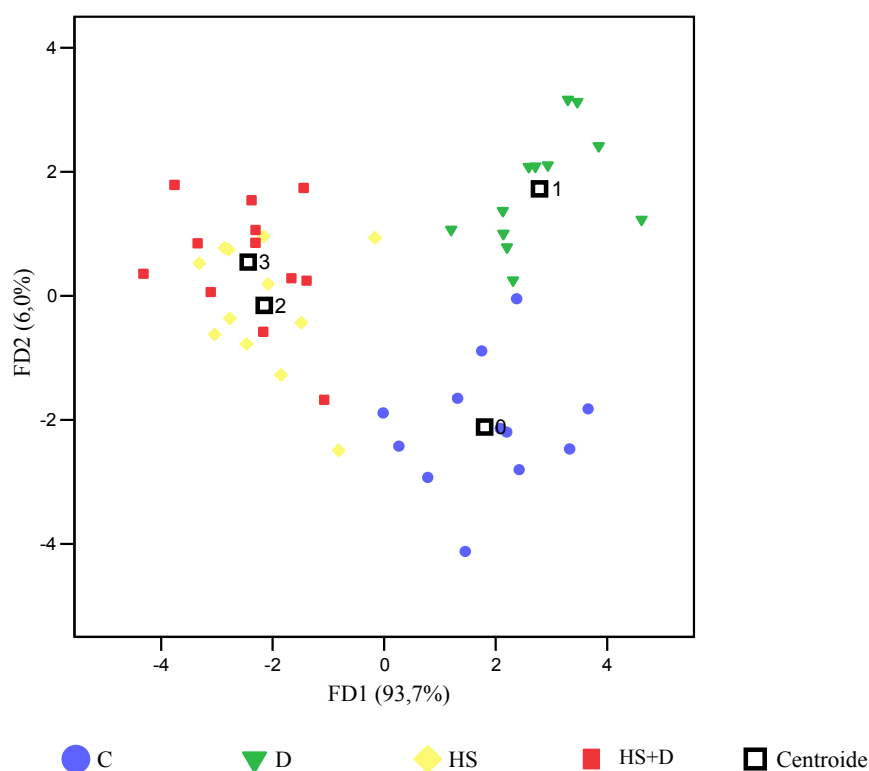


Figura 23: AD de las muestras de mandarinas “ Nova” durante la conservación a 9°C

Las funciones de Fisher obtenidas fueron:

$$C = -2,526 - 1,262*IC - 1,332*IM + 1,656*Vol. \text{ de jugo}$$

$$D = -6,682 + 5,645*IC - 4,358*IM + 1,100*Vol. \text{ de jugo}$$

$$HS = -3,743 - 3,593*IC + 2,622*IM - 1,398*Vol. \text{ de jugo}$$

$$D + HS = -3,885 - 3,313*IC + 3,067*IM - 1,358*Vol. \text{ de jugo}$$

Cuando el almacenamiento se realizó a 9°C, el AD incorporó la variable “volumen de jugo” para la clasificación de las muestras en sus respectivos tratamientos, denotando la necesidad de una tercera variable para lograr una correcta clasificación. A pesar de este recurso, el éxito obtenido en la clasificación fue menor que con los frutos conservados a 2°C (64,6% vs. 89,6%). La **Fig. 23** muestra también que los frutos correspondientes a los tratamientos térmicos (HS y HS+D) no fueron diferenciados en forma eficiente. Es probable que esta mayor temperatura de conservación sea responsable de inducir un importante grado de

homogeneidad en el estado fisiológico de los frutos sometidos a tratamiento térmico, independientemente que se aplique o no el tratamiento de desverdizado.

3.1.2 Efecto de los tratamientos térmicos sobre la acumulación de las proteínas de estrés

Diversas investigaciones llevadas a cabo en el área hortícola incluyeron el estudio detallado de fenómenos bioquímicos que tienen lugar en el interior de los frutos durante la conservación (Lay-Yee *et al.*, 1990; Watkins *et al.*, 1997). Sin embargo, un problema que se presenta con frecuencia es la dificultad en el aislamiento y posterior procesamiento de las proteínas de los tejidos vegetales, que ocurre como consecuencia de la presencia de diversos compuestos interferentes (fenoles, pectinas, compuestos altamente acídicos, proteinasas; Barraclough *et al.*, 2004), y de estructuras protectoras propias de los vegetales (pared celular). A fin de evitar estos inconvenientes, se recurre a menudo a técnicas, comúnmente utilizadas para la extracción de proteínas de tejidos animales y microorganismos, modificadas para tejido vegetal; o a técnicas diseñadas especialmente para sortear estas dificultades. Entre las modificaciones se incluyen, la extracción con fenol (Peck *et al.*, 2001; Abdi *et al.*, 2002) y la utilización del SDS (Santoni *et al.*, 1998). En el caso de las muestras con un alto contenido de fenoles (extracto de hojas o frutas) es necesario el agregado de PVPP en forma de dispersión a fin de que precipite y arrastre consigo las sustancias interferentes (Barraclough *et al.*, 2004).

3.1.2.1 Selección del método de extracción de las proteínas del flavedo: Polvos Cetónicos

En esta tesis se seleccionó como primer paso para la extracción de proteínas la preparación de polvos cetónicos a partir del flavedo de los cítricos. Esta técnica brinda la ventaja de preservar la actividad enzimática y la estructura de las proteínas, estabilizándolas frente a los procesos de proteólisis. A modo de ejemplo, la **Fig. 24** muestra el elevado grado de homogeneidad de un polvo cetónico obtenido a partir de una muestra de flavedo de mandarinas.



Figura 24: Polvo cetónico de una muestra representativa del flavedo de mandarinas

3.1.2.2 Análisis del perfil de los extractos proteicos mediante estudios electroforéticos e inmunológicos

Los extractos proteicos, obtenidos a partir de los polvos cetónicos correspondientes a los frutos sometidos a los diferentes tratamientos y tiempos de conservación, fueron analizados mediante las técnicas de SDS-PAGE y *Western blot*.

La **Fig. 25** muestra el análisis de los extractos de mandarina correspondientes al control (C), obtenidos en los diferentes períodos de muestreos durante la conservación a 2°C (M₀) y luego de la simulación de la comercialización (M₇). En la línea correspondiente a los extractos proteicos de mandarinas recién cosechados (cosecha), en la región de bajo peso molecular, se observa una banda proteica de gran intensidad de aproximadamente 26–27 kDa (señalada con flecha), y otras dos bandas de menor intensidad de PM aproximados de 21 kDa y 30 kDa (señaladas con flechas). Un perfil similar se observa luego de 15 días de conservación frigorífica, comportamiento que no se modifica luego de exponer a los frutos por una semana a 20°C (M15₀ y M15₇). A partir de los 30 días, las bandas de menor intensidad comienzan a hacerse más notorias, especialmente la correspondiente a 21 kDa. Este resultado se verifica en las dos condiciones evaluadas (M30₀ y M30₇). A partir de ese momento y hasta el final del período ensayado (M60₀ y M60₇), este perfil se mantiene invariable. Contrariamente, en la región próxima a los 70 kDa no se visualizan cambios en los perfiles proteicos de los extractos obtenidos en los distintos períodos de muestreo.

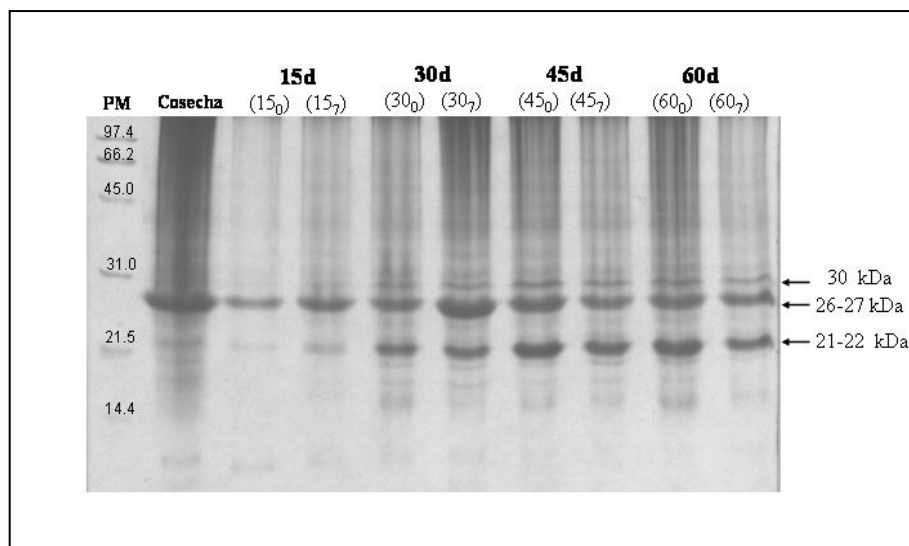


Figura 25. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” control (C) durante al conservación a 2°C. Los frutos fueron analizados quincenalmente durante la conservación frigorífica por un período de 60 días (M15₀, M30₀, M45₀ y M60₀) y luego de ser sometidos a la simulación de las condiciones de comercialización (M15₇, M30₇, M45₇ y M60₇)

El análisis por SDS-PAGE de las muestras de mandarinas conservadas a 9°C, mostró perfiles proteicos similares a los observados en las muestras conservadas a 2°C (figura no mostrada). Tampoco se encontraron diferencias en los perfiles proteicos de las muestras analizadas a la salida de la conservación y luego de la simulación de la comercialización (7 días a 20°C).

Dado que no se observaron diferencias entre los extractos proteicos de frutos muestreados inmediatamente después de la salida de conservación, y los correspondientes a frutos muestreados luego del periodo de simulación de la comercialización en ninguno de los casos estudiados, a partir de este punto sólo se mostrarán los análisis por SDS-PAGE de los extractos obtenidos inmediatamente después de la salida de conservación, tanto a 2°C como a 9°C.

La **Fig. 26** muestra el análisis por SDS-PAGE de los extractos de mandarinas sometidas al tratamiento de desverdizado (D) y conservadas a 2°C. En el gel se observa la presencia de una banda de gran intensidad de aproximadamente 26–27 kDa (señaladas con flecha). Esta banda ya se observa en los frutos recién cosechados, y se mantiene invariable inmediatamente después de la aplicación del

tratamiento de desverdizado (D), luego 24 h a 20°C (M1₀), y durante todo el período de conservación frigorífica (60 días). Se observan también otras bandas de menor intensidad, tanto en la región de mayor como de menor PM (señaladas con flechas), cuyas características son similares tanto en frutas recién cosechadas como en las obtenidas en los diferentes periodos de conservación analizados.

Los extractos proteicos de las muestras de mandarinas sometidas al tratamiento de D y conservadas a 9°C (figura no mostrada), mostraron perfiles proteicos similares al obtenido durante la conservación a 2°C (**Fig. 26**).

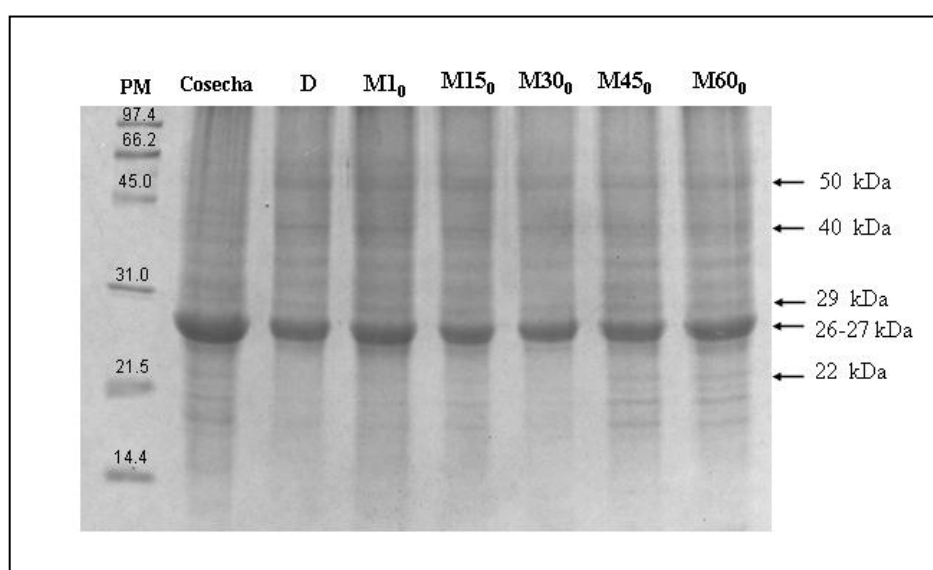


Figura 26. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de mandarinas “Nova” sometidas al tratamiento de desverdizado (D), durante la conservación a 2°C. Los frutos fueron analizados inmediatamente después de aplicado el tratamiento desverdizado (D y M1₀), y quincenalmente durante la conservación a 2°C por un período de 60 días (M15₀, M30₀, M45₀ y M60₀)

La **Fig. 27** muestra el análisis por SDS-PAGE de los extractos de mandarinas sometidas al tratamiento térmico (HS) y conservadas a 2°C. Al igual que las muestras C, se observa una banda mayoritaria de aproximadamente 26–27 kDa (señaladas con flecha) en las fruta recién cosechada. También se observan dos bandas importantes con PMs de 21 kDa y 29 kDa, aunque de menor intensidad que la de 26 kDa (señaladas con flechas). Se detectan otras bandas de menor intensidad en la zona

bajo PM. Este mismo perfil se mantiene inmediatamente después de aplicado el tratamiento térmico (HS), luego 24 h a 20°C (M1₀), y durante los diferentes muestreos realizados hasta el final de los ensayos (M60₀). En la región próxima a los 70 kDa se observan, a diferencia del C y del tratamiento D, dos bandas de aproximadamente 55 y 65 kDa (señaladas con flechas), cuya intensidad relativa se mantuvo sin cambios en los diferentes períodos de muestreo analizados.

El análisis por SDS-PAGE de las muestras de mandarinas sometidas al tratamiento HS y conservadas a 9°C (figura no mostrada), mostró un perfil proteico similar al de las frutas conservadas a 2°C (Fig. 27).

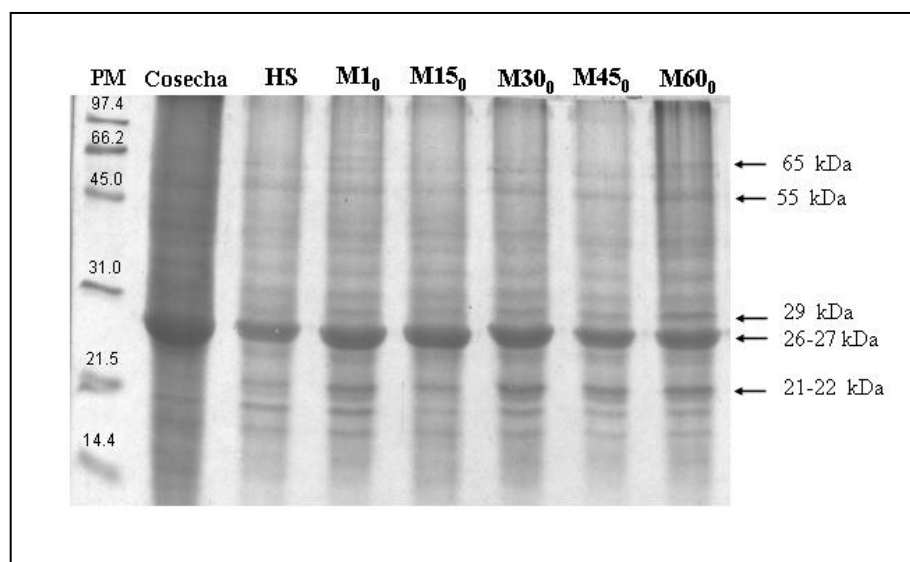


Figura 27. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de mandarinas “Nova” sometidas al tratamiento térmico (HS), durante la conservación a 2°C. Los frutos fueron analizados inmediatamente después de aplicado el tratamiento (HS y M1₀), y quincenalmente durante la conservación a 2°C por un período de 60 días (M15₀, M30₀, M45₀, y M60₀)

La Fig. 28 muestra el análisis electroforético de los extractos de mandarinas, sometidas al tratamiento térmico combinado (HS+D) y conservadas a 2°C. El perfil proteico es similar al observado para las muestras de mandarinas sometidas al tratamiento de desverdizado (D) (Fig. 26), destacándose la presencia de una banda proteica en la zona de 26-27 kDa (señalada con flecha). Puede observarse también en esta figura, bandas de menor intensidad en otras áreas del gel, aunque no se

aprecian cambios en el perfil proteico entre las muestras recién cosechadas y las muestras obtenidas en los distintos periodos analizados.

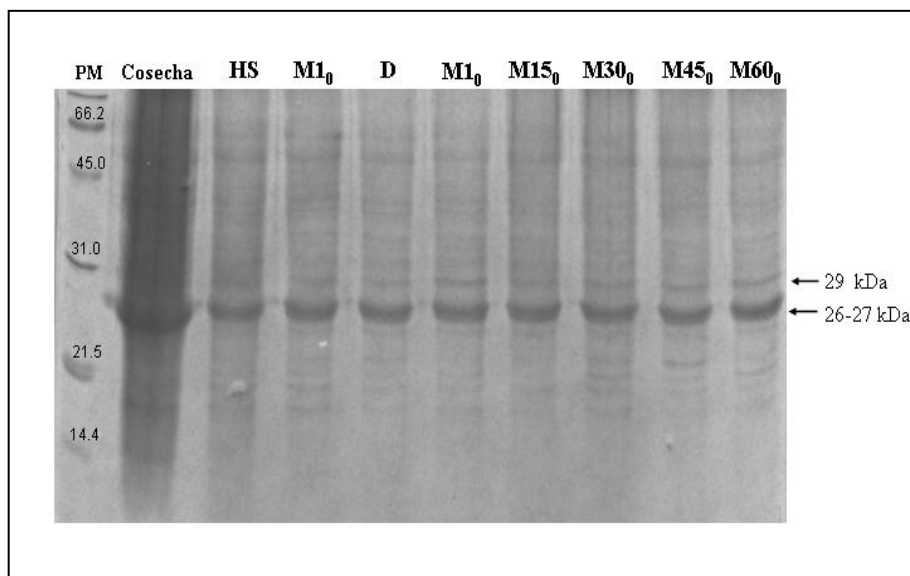


Figura 28. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” sometidas al tratamiento combinado (HS+D), durante la conservación a 2° C. Los frutos fueron analizados inmediatamente después de aplicado el tratamiento térmico (HS y M1₀), luego de aplicado el tratamiento de desverdizado (D y M1₀) y quincenalmente durante la conservación a 2°C por un período de 60 días (M15₀, M30₀, M45₀, y M60₀).

En resumen, en los frutos control se detectó en todos los periodos estudiados una banda proteica correspondiente a la proteína de 26 kDa de intensidad importante, y en mucha menor medida las bandas proteicas de 21 y 29 kDa. La aplicación de los tratamientos térmicos incrementó la cantidad de estas dos últimas proteínas, cantidad que permaneció aproximadamente constante durante los diferentes periodos de muestreo. Por otra parte, la banda de 26 kDa permaneció constante y con intensidad similar a la de la cosecha durante los 60 días de almacenamiento. Respecto de las proteínas de alto PM (70 kDa), no fue posible visualizar estas proteínas por la técnica de SDS-PAGE, tanto en la cosecha como luego de aplicados los tratamientos térmicos, ni durante todo el período de conservación a ambas temperaturas evaluadas.

Con el propósito de corroborar estos resultados de modo de inferir el efecto de los tratamientos térmicos sobre los frutos almacenados a bajas temperaturas, se decidió utilizar una técnica de detección de mayor especificidad y sensibilidad como es el *Western blot*.

Así, la **Fig. 29** muestra el análisis por *Western blot* de los extractos proteicos de mandarinas control (C) y tratadas térmicamente (HS= 48 hs a 36°C). En el caso del C los frutos fueron analizados en la cosecha (cos.), luego de 24 h a 20°C (M1₀) y en dos períodos durante la exposición a 2°C (M15₀ y M30₀). En el caso del tratamiento térmico, la fruta se analizó inmediatamente después de su aplicación, luego 24 h a 20°C (M1₀), y en dos oportunidades durante la conservación frigorífica a 2°C por un período de hasta 30 días (M15₀ y M30₀). La membrana fue revelada con un antisuero de conejo, obtenido en nuestro laboratorio (Ab-HSPC1) a partir de una proteína de estrés mayoritaria de 21 kDa aislada de tomates *colt 45* sometidos a tratamiento térmico (Polenta, 2005).

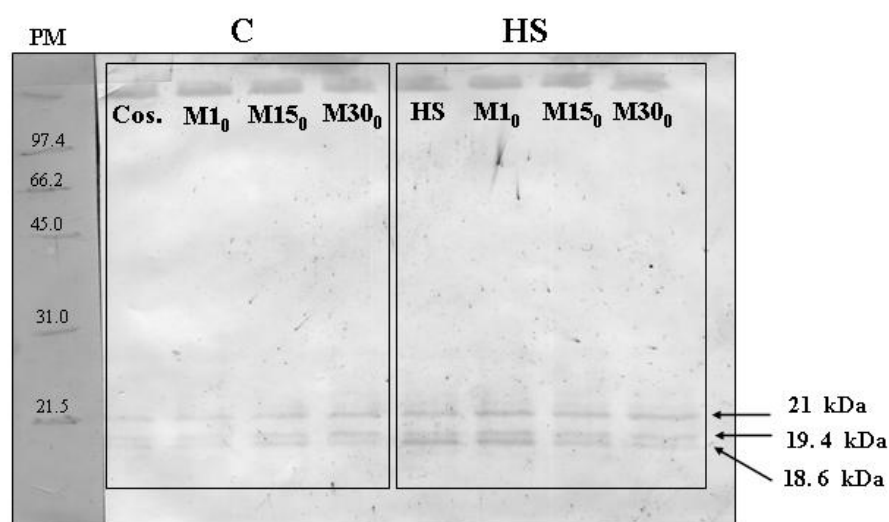


Figura 29. Análisis por *Western blot* de los extractos proteicos de mandarinas “Nova”, control (C) y sometidos al tratamiento térmico (HS). Los frutos fueron analizados en la cosecha (Cos.), después de aplicado el tratamiento (HS), 24 h después de la cosecha (M1₀) o de aplicado el tratamiento térmico (M1₀), y durante la conservación a 2°C por un período de hasta 30 días (M15₀, M30₀). La membrana fue revelada con el antisuero policlonal (Ab-HSPC1) contra una proteína de estrés de 21 kDa purificada de tomates sometidos a tratamiento térmico.

Esta figura muestra, en todos los casos analizados, tres bandas proteicas que inmunoreaccionaron con el anticuerpo policlonal (Ab-HSPC1). Los PM de las mismas, estimados por comparación con el patrón de referencia, fueron de 18.6, 19.4 y 21 kDa (señaladas con flecha). La evaluación semicuantitativa por densitometría óptica de la intensidad de estas bandas (datos no mostrados) permitió establecer que las intensidades de dichas bandas proteicas en los frutos control (C) fueron similares desde la cosecha hasta los 15 días de conservación (M15₀), mientras que a los 30 días (M30₀) se detectó un ligero incremento. Los frutos sometidos al tratamiento térmico (HS) presentaron un aumento apreciable de la intensidad de estas bandas proteicas luego de su aplicación, manteniéndose a niveles elevados a las 24 h de tratadas (M1₀) y durante la conservación frigorífica. Los resultados hasta aquí obtenidos: el aumento de la intensidad de las tres bandas proteicas inducidas por la aplicación del tratamiento térmico, la detección inequívoca por un Ac específico (Ab-HSPC1) de las proteínas correspondientes a dichas bandas, y el bajo PM de las mismas, permiten inferir que estas proteínas pertenecen a la familia de la sHSPs descriptas para el reino vegetal (Vierling, 1991).

La **Fig. 30** muestra el análisis por *Western blot* de los extractos proteicos de mandarinas control (C) y tratadas térmicamente (HS= 48 hs a 36°C). En el caso de C, los frutos fueron analizados inmediatamente después de la cosecha (cos.), luego de 24 h a 20°C (M1₀) y durante la conservación a 2°C (M15₀). En el caso de los frutos tratados térmicamente, los muestreos fueron realizados inmediatamente después de aplicado el tratamiento (HS), luego de 24 h de exposición a TA (M1₀), y durante la conservación frigorífica a 2°C por un período de hasta 15 días (M15₀). La membrana fue revelada en este caso, con un anticuerpo monoclonal comercial anti-HSP70, obtenido a partir de una proteína de estrés aislada de cerebro de vaca.

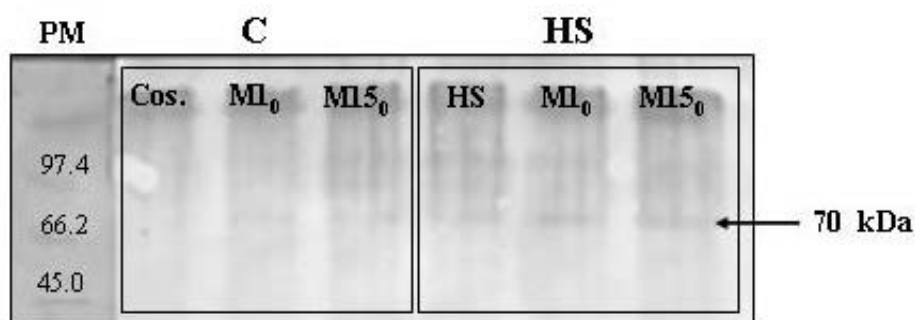


Figura 30. Análisis por *Western blot* de los extractos proteicos de mandarinas “Nova”, control y sometidos al tratamiento térmico (HS). Los frutos fueron analizados en la cosecha (Cos.), después de aplicado el tratamiento (HS), a las 24 h después de la cosecha (M1₀) o de aplicado el tratamiento térmico (M1₀) y durante la conservación a 2°C por un período de 15 días (M15₀). La membrana fue revelada con el Ac monoclonal comercial anti-HSP70.

En todos los casos analizados (notar que la intensidad es muy baja en la cosecha = Cos.), se observa una única banda proteica que inmunoreaccionó con el anti-HSP70. El PM de la proteína, estimado por comparación con el patrón de referencia, fue de 70 kDa (señaladas con flecha). Los resultados que muestra esta figura permiten deducir que el tratamiento térmico fue capaz de inducir la síntesis de proteínas compatibles con los miembros de la familia de las HSP70 (PM estimado 70 kDa, reacción con anti-HSP70 monoclonal) y que la intensidad de esta banda se mantuvo durante los 15 días del ensayo).

El estudio del perfil proteico de los extractos de frutos sometidos a los diferentes tratamientos es considerado de gran importancia, ya que suministra información acerca de los posibles cambios bioquímicos inducidos por la aplicación de los tratamientos y permite de esta manera establecer el mecanismo asociado al efecto ejercido por dichos tratamientos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan en general con lo informado en la bibliografía en cuanto a la inducción térmica de proteínas de estrés de bajo PM. En este sentido, puede observarse tanto en los análisis de SDS/PAGE como los de *Western blot*, que los cambios más notorios involucran proteínas cuyos PM están comprendidos en el rango de los 21–30 kDa. Es importante destacar que en todas las muestras de mandarinas analizadas, frutas recién cosechadas, frutas

tratadas, así como también durante la conservación frigorífica y luego de la simulación de la comercialización, se detectó una banda de intensidad significativa de aproximadamente 26 kDa. Esta situación sugiere que esta banda correspondería a una proteína que se expresa en forma constitutiva. Tanto esta banda como las tres bandas de proteínas de bajo PM (18.6, 19.4 y 21 kDa) inducibles por la aplicación de los tratamientos por calor serían también miembros de la familia de las sHSPs. Según Vierling (1991), este grupo de HSPs sería en vegetales el más importante desde el punto de vista funcional. La función de las HSPs en la tolerancia a las altas temperaturas, podría estar relacionada con su actividad, ampliamente conocida, de chaperonas moleculares. Estas proteínas protegerían a las células de los efectos nocivos de la exposición a temperaturas extremas (Waters *et al.*, 1996). Se cree que la actividad de chaperona molecular permitiría controlar el correcto plegamiento proteico, el ensamblado oligomérico, el transporte de proteínas a través de membranas, la eliminación –por degradación– de otras proteínas inestables y evitaría la incorrecta interacción entre polipéptidos no nativos, producto de agregaciones irreversibles (Boston *et al.*, 1996; Ganea, 2001).

Si bien la aplicación de tratamientos térmicos en frutas surgió de manera empírica como una forma de controlar las podredumbres, posteriormente se comprobó que los mismos podían ser eficaces para prevenir el DF. Con el objetivo de explicar el efecto observado sobre una base más racional, se han llevado a cabo en los últimos años distintas investigaciones en el área de fisiología vegetal y poscosecha para establecer el fundamento bioquímico de la tolerancia al DF inducida por los tratamientos térmico. Estas investigaciones se han basado principalmente en tres hipótesis. La primera de las hipótesis estudiadas postula que la protección inducida por los tratamientos térmicos contra el DF, estaría relacionada con cambios en la composición de los ácidos grasos de las membranas de las plantas expuestas a temperaturas elevadas. Esta teoría surgió por haberse comprobado que las plantas de regiones tropicales y subtropicales presentaban en sus membranas una mayor proporción de ácidos grasos saturados en comparación con aquellas que crecían en regiones templadas (Lyons, 1973). Por otro lado, las plantas que fueron sometidas a un período de aclimatación a bajas temperaturas incrementaban la proporción de ácidos grasos insaturados (Raison, 1985). Entre los estudios llevados a cabo en este

sentido, experimentos realizados con mandarina “Fortuna”, arrojaron evidencias de que la alta sensibilidad al DF podría estar relacionada con una reducción de la habilidad para modificar la composición de los lípidos de la membrana en respuesta al frío (Mulas *et al.*, 1996).

Otra de las teorías surgida en los últimos años postula que la resistencia al DF estaría correlacionada con la protección brindada por las enzimas del sistema antioxidante (Sala & Lafuente, 1999, 2000). De esta forma, un adecuado balance entre la formación y la eliminación de las especies reactivas es crítico para la supervivencia de la célula (Mittler, 2002). Esta teoría sostiene que el DF es mediado por radicales libres del oxígeno, los cuales serían los agentes causantes de los daños secundarios producidos en las membranas y en los fotosistemas (Sala & Lafuente, 1999). Shewfelt & Erickson (1991) propusieron que la peroxidación lipídica podría alterar las propiedades físicas de las membranas lipídicas y, de esta forma, provocar un mal funcionamiento de las proteínas unidas a ellas, contribuyendo en última instancia al desarrollo de los síntomas visibles del proceso de DF.

Sin embargo, la teoría más difundida y aceptada relaciona la tolerancia al DF con la acumulación de las HSPs inducidas por los tratamientos de estrés térmico (Vierling, 1991; Parsell & Lindquist, 1993; Sabehat *et al.* 1998). Estas proteínas tendrían precisamente la función de proteger al fruto preservando, por un lado, estructuras específicas como las membranas, y por otro lado, la función de proteínas específicas (Brodl, 1989). Teniendo en cuenta esta última hipótesis, en la presente tesis se decidió profundizar en el estudio de la respuesta de las HSPs en frutos cítricos sometidos a los tratamientos térmicos.

Entre las distintas investigaciones que relacionan la acumulación de las HSPs inducida por los tratamientos térmicos con la tolerancia al DF, Sabehat *et al.* (1996) encontraron que en tomates se inducía la transcripción de ARNm correspondientes a las HSP17 y la traducción de las proteínas HSP17 y HSP23, las cuales se mantendrían en concentraciones elevadas durante el posterior almacenamiento a temperaturas inductoras de daño. Posteriormente, Kadyrzhanova *et al.* (1998) trabajando con esta misma especie, lograron identificar y clonar un ADNc, el cual se expresa por la aplicación de un GT (2 días a 42°C) y que a su vez, es regulado en forma positiva (*up-regulated*) durante la conservación a bajas temperaturas. Este gen

codifica para una proteína de 17.6 kDa que presenta una elevada homología con sHSPs de otros vegetales (alfalfa, soja y poroto). Los autores postularon que la proteína 17.6 kDa sería la responsable del efecto protector encontrado en tomates, ya que los frutos no tratados térmicamente presentaban niveles de expresión de la misma muy bajos, y manifestaban además lesiones de DF luego de la frigoconservación.

Si bien la síntesis de HSPs es una respuesta altamente conservada entre los diferentes organismos, en el caso de los vegetales, los aspectos cualitativos y cuantitativos de esta respuesta pueden variar entre las distintas especies. En el mismo grupo de investigación en el que se llevó a cabo el presente trabajo de tesis, Polenta (2005) detectó, mediante estudios de SDS-PAGE, una banda de gran intensidad en la región de 21 kDa en los extractos de tomates de la variedad *colt 45* sometidos a tratamiento térmico. Esta banda, que estaba ausente en el control (frutos recién cosechados), podía detectarse a partir de los 30 min de aplicado el tratamiento y continuaba incrementando su intensidad en forma marcada luego de 72 h de exposición al calor. Es importante destacar que dicha banda permanecía visible en los extractos proteicos de esos mismos frutos aún luego de 20 días de almacenamiento a 2°C. Esta banda, denominada HSPC1, fue aislada y luego secuenciada, y finalmente por comparación de esa secuencia con diferentes bancos de datos se logró su identificación. Se verificó que la misma era efectivamente, un miembro de la familia de las sHSPs (clase I), que poseía un 99,9% de homología con la proteína de 17.6 kDa de *Lycopersicon esculentum* (datos no publicados). Se sabe que el género *Lycopersicon* es particularmente tolerante a un amplio rango de condiciones ambientales y nutricionales. Entre los atributos que se encuentran presentes en diversas variedades comerciales de tomate, se destacan la resistencia a pestes y enfermedades (Hobson & Grierson, 1993).

En relación a los aspectos cualitativos, Collins *et al.* (1995) observaron en porotos tratados térmicamente la inducción de varias HSPs, las que permanecían a altos niveles en el tejido durante el posterior período de almacenamiento en frío. Sin embargo, únicamente las HSP79 y HSP70 eran sintetizadas *de novo*. Estos resultados sugerirían que el mecanismo de protección en poroto estaría asociado preferentemente al aumento en la síntesis de las HSP70.

En cuanto a los aspectos cinéticos de la respuesta, es sabido que la síntesis de HSPs puede ser inducida dentro de los 10–30 min posteriores a un incremento agudo de la temperatura (Ougham & Howarth, 1988; Polenta, 2005). En relación con la magnitud de la inducción, Schöffl & Key (1982) demostraron en tejidos de porotos de soja que los ARNm correspondientes a las sHSPs, se acumulaban a niveles próximos a las 20.000 copias de cada proteína por célula. Para estimar el efecto de la temperatura sobre la síntesis de estas proteínas, Kimpel & Key (1985) expusieron plantas de porotos a un incremento gradual de la temperatura (3°C/h), llegando hasta los 40°C. Se observó que a partir de los 34°C se acumulaban ARNm correspondientes a las HSPs a un nivel similar al observado durante una situación de estrés, y a partir de dicha temperatura la acumulación continuaba hasta los 45°C a una velocidad menor. Estos resultados muestran claramente que los fenómenos bioquímicos asociados a la aplicación de un GT no constituyen simplemente una respuesta al cambio abrupto de la temperatura, sino que forman parte de un mecanismo complejo sometido a diversos controles, que refleja a su vez la capacidad de adaptación de los organismos ante nuevas situaciones ambientales (Gurley & Key, 1991).

En cuanto al efecto de las temperaturas utilizadas en los tratamientos sobre la expresión individual de las distintas proteínas de estrés, Florissen *et al.* (1996) expusieron tejido de palta durante 4 h a temperaturas comprendidas en el rango 22–44°C. Los autores observaron que a partir de los 26°C se inducía significativamente la síntesis de proteínas con PM de 20, 42.5, 55, 74, 82 y 92 kDa. Se detectaron también bandas más tenues en el rango de 25–28 kDa pero la expresión de estas proteínas se incrementaba en forma gradual hasta los 38°C, y por encima de esta temperatura la cantidad de proteínas disminuía abruptamente. A partir de los 44°C se interrumpía la síntesis de todas las proteínas. Estos resultados indicarían que la temperatura óptima para la inducción de las HSPs en paltas estaría en el rango de los 34–38°C. Por otra parte, los mismos autores establecieron que el tiempo mínimo requerido para la máxima inducción de las HSPs a 38°C era de 120 min. En maíz, Cooper & Ho (1983) encontraron que los PM de HSPs sintetizadas durante un GT variaban entre 18 y 87 kDa; mientras que en algodones expuestos en el campo a temperaturas de 40°C se detectó la inducción de 8 HSPs con PM entre 21 y 100 kDa (Burke *et al.*, 1985). La acumulación de sHSPs inducibles por calor fue también

descrita en distintas especies de frutas, dentro de las cuales puede mencionarse las frutillas (Civello *et al.*, 1997), las manzanas (Ritenour *et al.*, 2001) y las papayas (Paull & Chen, 1990).

Una característica de gran importancia de las sHSPs es que las mismas son sintetizadas por las plantas no sólo como respuesta a un estrés por calor, sino también ante un amplio rango de situaciones de estrés como frío, UV, baja concentración de oxígeno, contaminantes químicos, detergentes no iónicos, salinidad, daño mecánico, infección por patógenos y heridas (Craig, 1985; Ali & Banu, 1991; Meir *et al.*, 1996; Sabehat *et al.*, 1998; Hamilton & Coleman, 2001; Polenta, 2005). Consecuentemente, se ha postulado la existencia de mecanismos de adaptación cruzada, los que explicarían que la exposición a un estrés moderado es capaz de inducir no solo la resistencia contra ese tipo de estrés, sino que además mejoraría la tolerancia a otros tipos de estrés (Wang *et al.*, 2003). Dado que en el presente trabajo de investigación fueron detectadas en frutos recién cosechados proteínas compatibles con las sHSPs, se propone que las mismas debieron haber sido sintetizadas como consecuencia de la exposición de los frutos a diferentes situaciones de estrés experimentadas en el campo en períodos previos a la cosecha.

Se concluye también en base a los resultados obtenidos, que para la detección de las HSP70 se requiere de técnicas de mayor sensibilidad, ya que sólo fue posible evidenciar una banda proteica próxima a 70 kDa (HSP70) mediante reacción con el Ac policlonal anti-HSP70 en un *Western blot*.

3.1.2.3 Cuantificación de las proteínas de estrés

Otro objetivo de gran importancia dentro de la presente tesis, fue la realización de un análisis de las proteínas de estrés que comprenda no sólo aspectos cualitativos sino también cuantitativos. Debe destacarse que si bien en los últimos años se han publicado un gran número de trabajos que identifican distintos tipos de proteínas de estrés, un aspecto limitante para el empleo de las mismas con fines tecnológicos ha sido la falta de metodologías que permitan evaluar cuantitativamente la cantidad acumulada de estas proteínas. La posibilidad de contar con este tipo de datos permitirá la toma de decisiones sobre una base más racional, especialmente en

la etapa de optimización de los tratamientos de estrés, lo que favorecerá una mayor difusión de esta tecnología en el área de poscosecha de las frutas.

Para la cuantificación de las HSPs inducidas por los tratamientos se optó por un método inmunológico (técnica de *dot blot*) en la que se utilizaron dos anticuerpos: antisuero de conejo (Ab-HSPC1) contra la proteína de estrés de 21 kDa purificada en nuestro laboratorio a partir de frutos de tomate sometidos a tratamientos de estrés por calor (Polenta, 2005) y Ac monoclonal comercial contra la HSP70. El revelado inmunológico incluyó anticuerpos secundarios comerciales conjugados con fosfatasa alcalina. Las membranas fueron luego escaneadas por densitometría, y las intensidades fueron analizadas mediante el programa de análisis de imágenes *Quantity One*®. A los efectos comparativos se tomó como valor de referencia igual a 1, al promedio de la intensidad de la señal medida en los frutos recién cosechados.

- **Cuantificación de las sHSPs**

La **Fig. 31** muestra el análisis por *dot blot* realizado de los extractos proteicos de mandarinas “Nova” control y sometidas a tratamiento térmico, evaluados durante la conservación a 2°C. En este análisis se utilizó como Ac primario, al antisuero de conejo Ab-HSPC1.

Los resultados indican que en el control (C), la intensidad de las manchas de los extractos de frutos expuestos a temperaturas inductoras del DF (2°C) fue bastante elevada y permaneció relativamente constante durante el período evaluado.

En los frutos sometidos al tratamiento de HS, se encontró un aumento importante (2,3 veces respecto de la cosecha) de la intensidad de esta mancha a los 15 días de frigoconservación (M15₀). Este valor fue solo disminuyendo lentamente durante el resto del período de conservación. Es importante destacar que en este período de muestreo (M30₀, M45₀ y M60₀) la intensidad se mantuvo siempre elevada en comparación con la cosecha. Por su parte, en los frutos sometidos al tratamiento combinado (HS+D), la acumulación de proteínas a lo largo de todo el período de frigoconservación fue sensiblemente inferior a la observada en el tratamiento térmico sólo (HS), siendo los valores obtenidos similares a los del C. En el tratamiento de desverdizado (D) (datos no mostrados), no se encontraron diferencias del nivel de proteínas en relación con el control en todo el período estudiado.

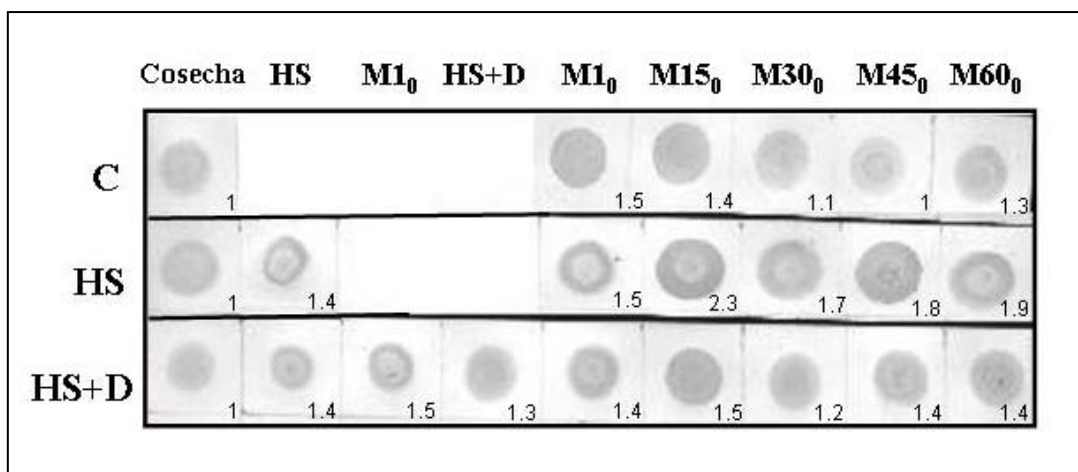


Figura 31. Análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS y HS+D, durante la conservación a 2°C, y revelados con el Ab-HSPC1 (sHSPs). Los frutos fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h a 20°C (M1₀), después de aplicado el tratamiento térmico (HS), luego de aplicado el tratamiento de desverdizado (HS+D), y durante la conservación a 2°C por un periodo de hasta 60 días (M15₀, M30₀, M45₀ y M60₀). Los números en el interior de cada cuadro indican cantidades de sHSP relativas a la cosecha. Los valores corresponden al promedio de dos mediciones.

La **Fig. 32** muestra el análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de mandarinas conservadas a 9°C, revelados también con el Ab-HSPC1. Se observa en esta figura una reducción importante de la cantidad de sHSPs de los frutos C a las 24 h de cosechados. No se encontraron diferencias de intensidad importantes entre el control y el resto de los tratamientos ensayados. Solo se observó un ligero aumento (1,4 respecto de la cosecha) 24 h después de la aplicación del tratamiento térmico (HS, M1₀). Es importante destacar que un aumento similar se observa luego de aplicado el tratamiento por calor en las muestras tratadas HS+D (M1₀), aunque la aplicación del tratamiento de desverdizado a posteriori redujo este valor al 50%. En general, durante la conservación a la temperatura de 9°C se observó, independientemente del tratamiento, una reducción de la cantidad de sHSPs a medida que se incrementó el período de conservación. La cantidad de sHSP luego de 60 días a 9°C fue similar a la presente en el C, y en todos los casos, aproximadamente un 50% menor en comparación a los frutos recién cosechados. Es probable que esta temperatura de conservación (próxima a la temperatura óptima de conservación de

los frutos cítricos) no produzca cambios importantes en la cantidad detectada de proteína de estrés de bajo PM. Sólo en el caso particular del tratamiento por calor, inmediatamente después de aplicado, se incrementó la acumulación de estas proteínas, aunque esta cantidad se redujo luego durante la conservación.

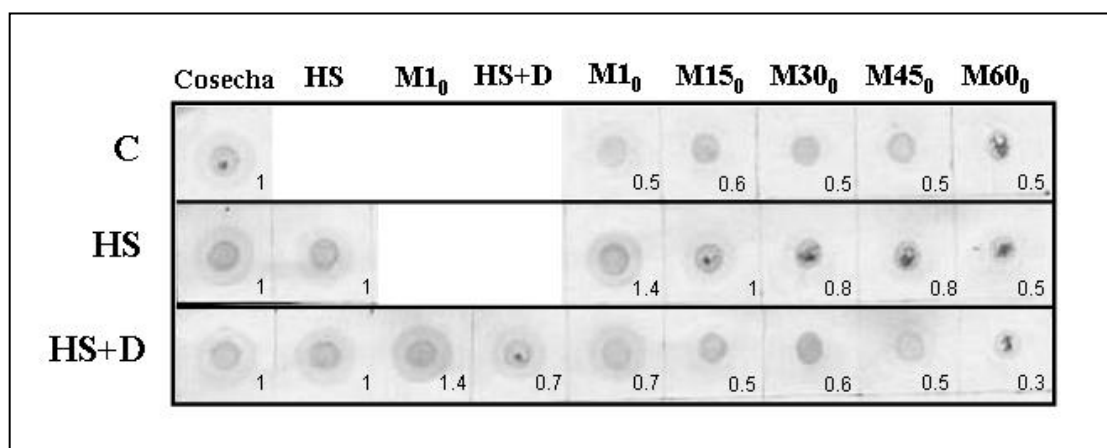


Figura 32. Análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova ” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS y HS+D, durante la conservación a 9°C, revelados con el Ab-HSPC1 (sHSPs). Los frutos fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h a 20°C (M1₀), después de aplicado el tratamiento térmico (HS), luego de aplicado el tratamiento de desverdizado (HS+D), y durante la conservación a 9°C por un periodo de hasta 60 días (M15₀, M30₀, M45₀ y M60₀). Los números en el interior de cada cuadro indican cantidades de sHSP relativas a la cosecha. Los valores corresponden al promedio de dos mediciones.

- **Cuantificación de las HSP70**

La **Fig. 33** muestra el análisis por *dot blot* realizado sobre los extractos proteicos de mandarinas conservadas a 2°C. El revelado de estas membranas fue realizado utilizando el Ac monoclonal comercial anti-HSP70.

Los resultados en todos los casos analizados, muestran una disminución apreciable en la cantidad detectada de HSP70 en comparación con la cosecha luego de la aplicación de los tratamientos o de la exposición de los frutos a 20°C por 24 h (valores relativos de aproximadamente 0,3). Estas bajas cantidades se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del periodo de conservación frigorífica ensayado.

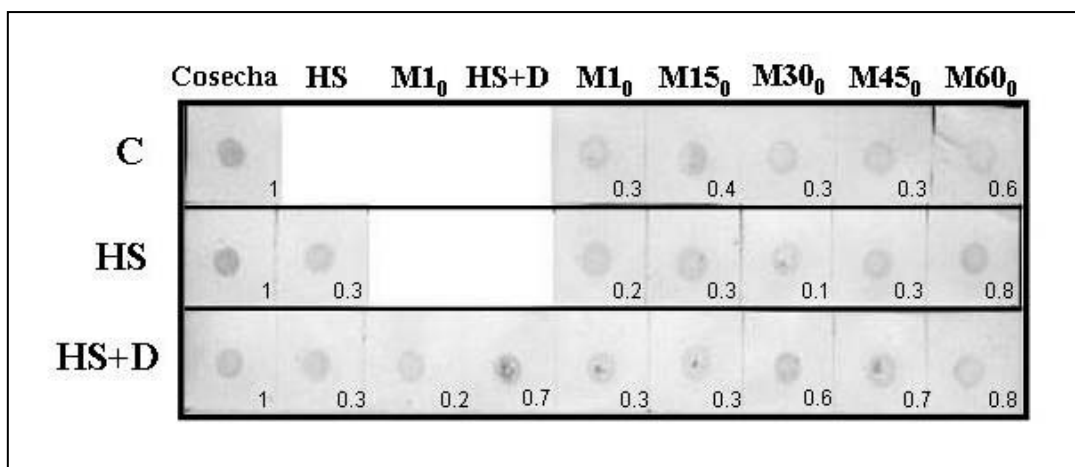


Figura 33. Análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de mandarinas “ Nova” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS y HS+D, durante la conservación a 2°C, revelados con el Ac-HSP70 comercial. Los frutos fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h a 20°C (M1₀), después de aplicado el tratamiento térmico (HS), luego de aplicado el tratamiento de desverdizado (HS+D), y durante la conservación a 9°C por un período de hasta 60 días (M15₀, M30₀, M45₀ y M60₀). Los números en el interior de cada cuadro indican cantidades de HSP70 relativas a la cosecha. Los valores corresponden al promedio de dos mediciones.

La **Fig. 34** muestra el análisis por *dot blot* realizado sobre los extractos proteicos de mandarinas conservadas a 9°C. Para el revelado de estas membranas también se utilizó también el Ac monoclonal comercial anti-HSP70.

Los resultados muestran la presencia de niveles similares de HSP70 en el C y en los frutos luego de tratados. Durante la conservación los valores detectados fueron ligeramente inferiores a los determinados en la cosecha.

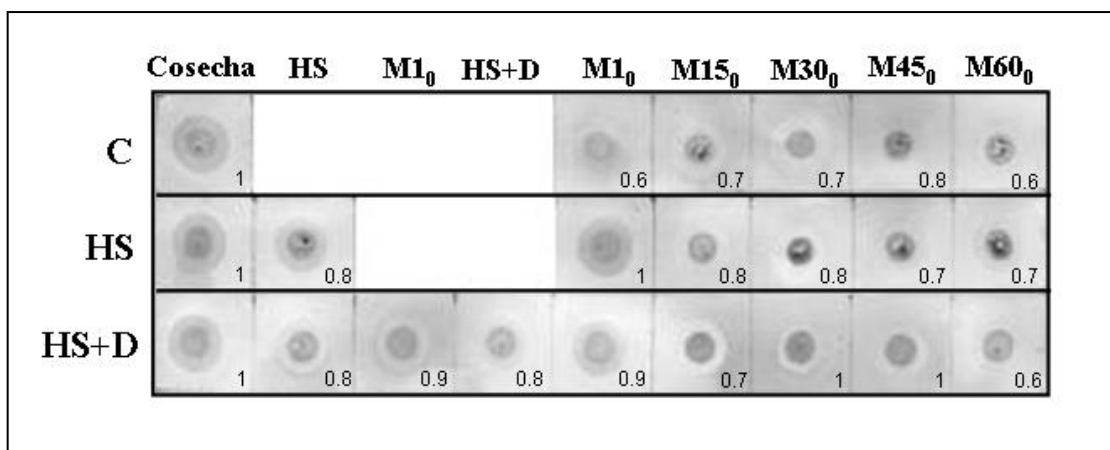


Figura 34. Análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de mandarinas “Nova”, control (C) y sometidos a los tratamientos HS y HS+D, durante la conservación a 9°C, revelados con el Ac-HSP70 comercial. Los frutos fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h a 20°C (M1₀), después de aplicado el tratamiento térmico (HS), luego de aplicado el tratamiento de desverdizado (HS+D), y durante la conservación a 9°C por un periodo de hasta 60 días (M15₀, M30₀, M45₀ y M60₀). Los números en el interior de cada cuadro indican cantidades de HSP70 relativas a la cosecha. Los valores corresponden al promedio de dos mediciones.

El resultado de los análisis inmunológicos (tanto *Western blot* como *dot blot*) confirma la reactividad cruzada existente entre las HSPs de distintas especies, probablemente como consecuencia del alto grado de conservación evolutiva que presentan este grupo de proteínas, habiéndose detectado su presencia en organismos tan distintos como bacterias, plantas y en animales incluyendo los seres humanos (Lindquist & Craig, 1988, Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996). Así, las proteínas de los extractos de mandarinas reaccionaron tanto con el Ac policlonal obtenido contra una sHSPs purificada partir de tomates tratados térmicamente, como con el Ac monoclonal comercial obtenido contra una HSP70 de cerebro de vaca. Esta reactividad cruzada fue informada previamente por otros autores (Rensing & Maier, 1994; Dunlap & Matsumura, 1997; Ritenour *et al.*, 2001). Por ejemplo, Ritenoir *et al.* (2001), obtuvieron un Ac contra una HSP de 18.1 kDa de arveja, el cual fue capaz de reconocer en manzanas, otras tres proteínas relacionadas de PMs 20.9, 22.0 y 22.5 kDa. De la misma manera, Dunlap & Matsumura (1997) produjeron un Ac policlonal contra la secuencia de aminoácidos más conservada de la HSP70, el cual reaccionó en forma cruzada con numerosas proteínas inducibles por calor, de PM entre 65 y 82 kDa, en especies tan diferentes como peces, sapos, calamar y plantas de arroz.

Por otra parte, el análisis de los resultados corrobora la presencia de niveles basales de las sHSPs y de las HSP70 en el fruto recién cosechado. Es probable que los niveles obtenidos se correspondan con algunos miembros de estas familias que se expresan en forma constitutiva, o representen a proteínas que fueron inducidas por algún tipo de estrés durante el desarrollo del fruto en la planta.

Respecto a las sHSPs, las mandarinas que fueron sometidas al tratamiento térmico (HS) mostraron un aumento de estas proteínas inmediatamente después de la aplicación del GT y a los 15 días de conservación (**Fig. 31**). Estos niveles, permanecieron luego relativamente elevados durante el resto del período de conservación frigorífica. Aún cuando se observó un aumento de estas proteínas en respuesta al estrés térmico aplicado, no fue posible relacionarlo con la tolerancia al DF, debido a que los frutos “control” no sufrieron este tipo de alteraciones fisiológicas. Dado que tanto en el control, en la cosecha como durante la conservación frigorífica, se detectaron niveles elevados de sHSPs, se podría inferir que estos niveles de proteínas serían suficientes para otorgar protección al fruto contra el estrés por bajas temperaturas, evitando así el desarrollo de daños fisiológicos durante la frigoconservación.

Durante la conservación a 9°C (**Fig. 32**), no se encontraron diferencias importantes en la cantidad de sHSPs entre los frutos C y tratados térmicamente, siendo estas cantidades similares luego de 60 días de conservación. Es probable que la conservación a una temperatura no inductora de DF (9°C) haya contrarrestado el efecto del tratamiento térmico, no detectándose diferencias entre el C y los frutos sometidos a GT.

El creciente interés científico por el estudio de las sHSPs, refleja la importancia que se les asigna a estas proteínas en el mecanismo de protección de vegetales ante distintos tipos de estrés (Vierling, 1991; Parsell & Lindquist, 1993). En este sentido, resulta altamente sugestivo el hecho que la síntesis de las sHSPs resulte prioritaria frente a otras proteínas, llegando a acumularse hasta alcanzar más del 1% del total proteico en situaciones de estrés (Waters *et al.*, 1996). Estas altas concentraciones favorecerían el replegado y la estabilización de proteínas desnaturalizadas (Ganea, 2001). Se cree que la base bioquímica de la función que presentan las sHSPs radica en la alta afinidad que exhiben frente a péptidos y

proteínas parcialmente plegadas, formando este mecanismo parte de una respuesta de tipo general no habiéndose demostrado hasta el momento especificidad por ningún sustrato en particular (Fink, 1999). Además de esta función principal, se especula que las sHSPs podrían tener también otras funciones, como por ejemplo actuar como antioxidantes durante el estrés por sal (NaCl) protegiendo el transporte electrónico del Complejo I de la cadena respiratoria en mitocondrias (Hamilton y Heckathorn, 2001).

En cuanto a las HSP70, también se detectaron niveles basales de estas proteínas en la cosecha. Sugiriendo que podrían tratarse de proteínas constitutivas, ya que actualmente se sabe que existen dos tipos principales de proteínas de 70 kDa: los miembros que se expresan en forma constitutiva (llamados HSC70), y los que se expresan en forma inducible (HSP70). En este sentido, Ritenour *et al.* (2001), trabajando con manzanas expuestas al sol lograron identificar, a partir de extractos proteicos de la piel de estos frutos, hasta 4 proteínas distintas pertenecientes a la familia HSP70. Estos autores sugieren que en frutas existen múltiples miembros de la familia de 70 kDa, algunas de las cuales son expresadas constitutivamente y no aumentan por la aplicación del tratamiento térmico. Por su parte, Ortiz & Cardemil (2001), en un estudio realizado sobre leguminosas encontraron que un mismo Ac reconocía dos tipos de HSP70, una de 69 kDa que se expresaba en forma constitutiva y otra de 71 kDa que era inducible por un GT. Debe destacarse que establecer con precisión el mecanismo de regulación asociado a este tipo de respuesta excede los objetivos planteados por el presente trabajo de tesis, ya que sería necesario la realización de otro tipo de ensayos, como por ejemplo *Northern blot*, a fin de detectar la cantidad de ARNm al inicio de los ensayos, después de aplicados los tratamientos térmicos y durante los diferentes períodos de muestreo, y de esta forma poder discriminar si el mecanismo de regulación es producido por cambios a nivel de la transcripción o de la traducción.

Resulta de interés el hecho que durante la conservación a 2°C, se haya detectado una disminución importante de las HSP70 tanto en el C como en los frutos tratados térmicamente (HS, HS+D). Es posible que los niveles detectados al momento de la cosecha estuvieran asociados al estrés provocado por las condiciones ambientales que se manifestaron durante el desarrollo de los frutos en la planta. Por

lo tanto, la posterior exposición de los mismos a bajas temperaturas hizo que las HSP70 acumuladas fueran utilizadas para mantener la conformación y la estructura de proteínas de interés metabólico, que pudieron ser afectadas por el estrés resultante de la exposición a esas temperaturas. Debe destacarse que en los cultivos a campo son frecuentes las situaciones de estrés debidas a cambios ambientales, tales como fluctuaciones de temperatura, escasez de agua, salinidad, condiciones previas de crecimiento, etc. (Levitt, 1980; Paull, 1990; Wang *et al.*, 2003). Debemos considerar también el estrés mecánico, el cual es producto de los procedimientos realizados durante el manejo de la fruta como ser, en la cosecha, en el transporte, durante las operaciones de clasificación y selección, en el empaque, etc. (Shewfelt, 1986). Por lo tanto, es posible que cualquiera de estas situaciones o combinaciones de ellas, sean las responsables de la inducción de la síntesis de este grupo de proteínas previo a la cosecha.

Durante la conservación a 9°C (**Fig. 34**), no se encontraron diferencias importantes en las cantidades detectadas de proteínas de HSP70 entre los frutos C y tratados, siendo a los 60 días de conservación similares entre los tres tratamientos, aunque menores a la cantidad analizada al momento de la cosecha. Es probable que este resultado se deba al uso de una mayor temperatura de conservación (9°C), situación que presupone una situación de menor estrés.

Las HSP70 son los miembros más conservados de las familias de las proteínas de estrés, habiéndose identificado este tipo de proteínas tanto en bacterias primitivas como en organismos superiores. Ellas participan en procesos de gran importancia como la translocación, la importación y el plegamiento proteico. Por ejemplo, se ha comprobado que poseen la capacidad de limitar el daño celular luego de una situación de estrés, previniendo el agregado proteico y reestableciendo las funciones de proteínas desnaturalizadas (Parsell & Lindquist, 1993). Sorger (1991) ha sugerido que algunas de las HSP70 podrían actuar como transductor de señal en la síntesis de otras HSPs, basándose en el hecho que detectó un nivel basal de expresión de estas proteínas a 25°C. Se ha informado también que las HSP70 estarían además involucradas en la termotolerancia adquirida (Guy & Li, 1998). En este sentido, en ensayos realizados en uvas por Zhang *et al.* (2005) se detectó, mediante un Ac policlonal contra las HSP70, un aumento considerable en la expresión de estas

proteínas en frutos sometidos a GT (38°C por 10 h) y conservados a temperaturas inductoras de DF, por lo que se postuló que estas proteínas conferían tolerancia a las bajas temperaturas.

La ausencia de alteraciones fisiológicas en los frutos control luego de 60 días de conservación a temperaturas altamente inductoras (2°C) encontrada en esta tesis (3.1.1.7), y el hecho que las mandarinas “Nova” son consideradas como una variedad altamente susceptible al frío (Cuquerella *et al.*, 1990; Martínez-Jávega *et al.*, 1991, 1992), estaría indicando un comportamiento diferencial de esta variedad influido por las condiciones climáticas particulares de cada región. Estas diferencias ponen de relieve la importancia de realizar este tipo de ensayos localmente, y no basarse únicamente en investigaciones realizadas en regiones con características climáticas potencialmente distintas.

3.1.3 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO EN MANDARINAS

Los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo, en donde se evaluó el efecto de la aplicación de los tratamientos térmicos sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos de mandarinas, permiten arribar a las siguientes conclusiones:

✓ Los frutos sometidos al tratamiento de desverdizado (D) alcanzaron en todos los casos mayores valores de IC que el resto de los frutos, tanto durante la conservación a 2°C como a 9°C, como durante la simulación de la comercialización. En consecuencia, puede afirmarse que este tratamiento, como era de esperarse, fue el que produjo la mayor incidencia sobre la evolución del color en los frutos de mandarina.

✓ Los frutos sometidos al tratamiento combinado (HS+D) fueron los que manifestaron una mayor PP a ambas temperaturas de conservación evaluadas, siendo esta pérdida más importante durante la simulación de la comercialización, donde el fruto se somete a TA.

✓ El porcentaje de jugo de las mandarinas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Seguramente debido a la disminución paralela de tanto el peso como el volumen de líquido.

✓ En relación a los parámetros relacionados con el sabor, no se encontraron diferencias en el contenido de SST entre el C y los tratamientos ensayados, a ninguna de las dos temperaturas evaluadas. Sin embargo, los tratamientos térmicos (HS y HS+D) redujeron significativamente la acidez del jugo inmediatamente después de su aplicación. Durante el transcurso de la conservación, la AT mostró una tendencia a disminuir en todos los tratamientos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

✓ En general el IM mostró una tendencia a aumentar durante el almacenamiento a ambas temperaturas, principalmente como consecuencia de la disminución del parámetro AT. El tratamiento combinado fue el que presentó los mayores valores de IM al final del período de estudio. En todos los tratamientos estudiados, los valores de IM obtenidos en los frutos al final de la conservación

pueden considerarse como aceptables, de acuerdo con los rangos mencionados en la bibliografía.

✓ Si bien la variedad “ Nova” ha sido tradicionalmente considerada como sensible al frío, los frutos utilizados en el presente trabajo de tesis no manifestaron síntomas de DF durante todo el período de estudio, incluso cuando fueron conservados a temperaturas altamente inductoras de DF. Si bien este hallazgo pone de relieve la importancia de realizar investigaciones para cada condición climática en particular, la ausencia de DF en las mandarinas control no permitió sacar conclusiones en cuanto a la efectividad de los tratamientos térmicos. Algunos de los frutos tratados presentaron alteraciones fisiológicas menores, no relacionadas con las bajas temperaturas, siendo su intensidad proporcional al tratamiento aplicado y al período de conservación.

✓ Independientemente de la ausencia de daño en los frutos control, pudo comprobarse que la evaluación de calidad y cantidad de las proteínas de estrés es una herramienta altamente promisoría, ya que mediante la utilización de técnicas electroforéticas e inmunológicas fue posible detectar diferencias (algunas de magnitud relativamente baja) en la acumulación de las HSPs entre los extractos de frutos control y de frutos tratados térmicamente.

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN POMELOS

3.2.1 Evaluación de la calidad

Debido al requerimiento de los países importadores de aplicar tratamientos cuarentenarios para el control de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*) en cítricos, se ha detectado una alta incidencia de DF en frutos sensibles. Dicho tratamiento consiste en la exposición de los frutos a temperaturas cercanas al punto de congelación, entre 0 y 2°C, aún a sabiendas de los efectos perjudiciales de la calidad que éstas causan.

Es bien conocido que la exposición de frutos de pomelos a temperaturas entre 0–8°C resulta en el desarrollo de las típicas lesiones de DF (Porat, 2004). En cambio, para reducir o evitar el desarrollo de esta sintomatología durante el almacenamiento se sugieren diferentes rangos. Por ejemplo, para Eckert & Eaks (1989) éstas temperaturas estarían comprendidas entre 10–16°C si se aplican por un período de hasta 16 semanas. Mientras que Martínez-Jávega (2002), sugiere el rango de 11–12°C si el período se extiende hasta 12 semanas. En el presente trabajo de tesis se tomó la temperatura de 9°C (por encima del umbral de daño) para la conservación de los pomelos por un período de 8 semanas, próxima a la sugerida por Eckert & Eaks (1989), con el propósito reducir la incidencia de podredumbres.

3.2.1.1 Color

Para la evaluación del color en pomelos, se utilizaron dos parámetros: el ángulo Hue (h°) y el valor Croma (C^*). El color o tonalidad de la fruta es definido por el parámetro h° , representando un valor de 0° al color rojo-púrpura y un valor de 90° al color amarillo. Valores mayores de 90° corresponden a tonalidades más verdosas. El parámetro C^* define la intensidad del color, correspondiendo valores cercanos a cero para los colores más apagados y cercanos a 60 para colores más brillantes (McGuire, 1992).

La **Tabla 24** muestra la evolución de h° para los pomelos conservados a 2°C. Los resultados indican que a esta temperatura no se produjo una variación marcada del color. Los valores de h° no mostraron diferencias significativas a lo largo del período de conservación, tanto para los frutos control como para los tratados térmicamente. Luego de 24 hs de conservación frigorífica se observa un menor valor

de h° ($p < 0.05$) en los frutos tratados térmicamente por 48 hs en comparación con C y HS24, y esta diferencia se mantiene hasta los 15 días de conservación. Luego de este período, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres tratamientos ensayados.

Tabla 24. Evolución del h° (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediatamente después de ser aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	92,0 ± 0,3 a	91,5 ± 0,3 ab	91,9 ± 0,3 a	91,7 ± 0,3 ab	91,3 ± 0,3 abc
HS24	91,9 ± 0,3 a	89,8 ± 0,3 d	91,7 ± 0,3 ab	91,1 ± 0,3 bc	92,0 ± 0,3 a
HS48	91,1 ± 0,3 bc	90,8 ± 0,3 c	91,0 ± 0,3 bc	91,4 ± 0,3 abc	91,5 ± 0,3 ab
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Tabla 25. Evolución del h° (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₇	P30 ₇	P45 ₇	P60 ₇
C	92,2 ± 0,3 abcd	91,9 ± 0,3 deg	92,8 ± 0,3 ab	91,0 ± 0,3 fj	90,8 ± 0,3 i
HS24	91,9 ± 0,3 deg	92,0 ± 0,3 dh	92,5 ± 0,3 abd	91,6 ± 0,3 c fgh	92,0 ± 0,3 d
HS48	91,2 ± 0,3 egi	92,1 ± 0,3 cd	92,2 ± 0,3 abch	92,3 ± 0,3 abcd	91,8 ± 0,3 c fgh
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	NS	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Durante el período de simulación de la comercialización (**Tabla 25**), los frutos de pomelos tampoco presentaron un cambio definido de color. Sólo los frutos C mostraron una reducción de h° ($p < 0.05$) hacia los 45 y 60 días de conservación. Durante el período completo de ensayo de conservación no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos.

En cuanto a la evolución del parámetro C^* durante la conservación a 2°C (**Tabla 26**), si bien también se encontraron diferencias significativas entre algunos tratamientos y en algunos períodos de muestreo particulares, estas diferencias carecen de importancia práctica. En el caso del análisis realizado durante la simulación de la comercialización (**Tabla 27**), dado que la interacción tratamiento-tiempo ($T_{to} * T_i$) no fue significativa ($p > 0.05$), la comparación de medias entre los factores tratamiento y tiempo de conservación fueron analizados en forma independiente, correspondiendo las letras en minúscula a las diferencias significativas entre tratamientos (T_{to}), y en mayúscula para las diferencias entre tiempos de conservación (T_i) (ver detalles al pie de tabla). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni en los distintos períodos de muestreo que fueran de importancia práctica.

Tabla 26. Evolución del C^* (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	40,1 ± 0,1 fg	40,0 ± 0,1 bcd	40,3 ± 0,1 abc	41,0 ± 0,1 bcd	40,7 ± 0,1 de
HS24	40,2 ± 0,1 f	39,6 ± 0,1 g	41,3 ± 0,1 abc	40,4 ± 0,1 ef	40,9 ± 0,1 cd
HS48	40,0 ± 0,1 fg	41,0 ± 0,1 bcd	41,5 ± 0,1 a	40,9 ± 0,1 ed	41,3 ± 0,1 ab
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Tabla 27. Evolución del C* (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Período de muestreo					Tto
	P1 ₀	P15 ₇	P30 ₇	P45 ₇	P60 ₇	
C	40,0±0,2	40,7±0,2	40,3±0,2	40,6±0,2	40,5±0,2	a
HS24	40,2±0,2	40,4±0,2	40,1±0,2	40,1±0,2	39,9±0,2	b
HS48	40,0±0,2	40,6±0,2	40,1±0,2	40,5±0,2	40,4±0,2	ab
Ti	C	A	BC	AB	BC	
Nivel de Significancia del ANOVA						
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti	Covariable	
	*	*	*	NS	*	

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. *ANOVA, $p < 0.05$; NS: no significativo.

Letras disintas en **minúscula** indican diferencias significativas por **tratamiento** ($p < 0.05$ LSMEANS) y letras distintas en **mayúscula** indican diferencias significativas por **tiempo** ($p < 0,05$ LSMEANS).

Durante la conservación a 9°C (Tabla 28), se encontraron diferencias significativas en el parámetro h° entre los distintos tratamientos para la mayoría de los tiempos evaluados. Al comparar los frutos C con los frutos tratados en el período P1₀, se observa que los primeros mostraron valores significativamente superiores ($p < 0.05$) a los tratados. En cambio, esta relación se revierte a partir de los 30 días siendo el color de los frutos C más amarillento. A esta temperatura, el color de la fruta durante el almacenamiento evolucionó desde tonalidades ligeramente verdosas a más amarillentas, disminuyendo el h° desde valores comprendidos entre 91 y 93 para el tiempo inicial (P1₀) hasta valores comprendidos en el rango 80–85 al final del período evaluado (P60₀). Los frutos control (C), fueron los que presentaron la mayor variación en este parámetro a esta temperatura de conservación. Un análisis general de la evolución del ángulo sugiere principalmente, que el efecto de los tratamientos térmicos sobre el color de los frutos fue el de retrasar la evolución del color.

Tabla 28. Evolución del h° (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	93,2 ± 0,3 a	91,3 ± 0,3 b	86,6 ± 0,3de	83,3 ± 0,3 g	80,3 ± 0,3 i
HS24	90,9 ± 0,3 b	91,8 ± 0,3 b	89,0 ± 0,3 c	85,9 ± 0,3 ef	82,2 ± 0,3 h
HS48	91,6 ± 0,3 b	91,1 ± 0,3 b	89,7 ± 0,3 c	87,5 ± 0,3 d	85,2 ± 0,3 f
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Durante la simulación de la comercialización (Tabla 29), los pomelos exhibieron un comportamiento similar al mostrado durante el almacenamiento refrigerado (Tabla 28). Inmediatamente después de aplicados los tratamientos (P1₀) los frutos C mostraron valores superiores a los tratados ($p < 0.05$), situación que nuevamente se revierte hacia los 30 días de conservación. Durante el periodo de simulación de la comercialización, el valor h° fue disminuyendo paulatinamente tanto en los frutos C como en los tratados. Sin embargo, al cabo de 60 + 7 días (P60₇) los tres tratamientos ensayados convergieron a valores similares.

Tabla 29. Evolución del h° (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh ” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₇	P30 ₇	P45 ₇	P60 ₇
C	95,3 ± 0,4 a	94,0 ± 0,4 a	90,9 ± 0,4 bc	83,3 ± 0,4 h	84,6 ± 0,4 gh
HS24	90,5 ± 0,4 bc	90,6 ± 0,4 bc	89,4±0,4 bcd	88,1 ±0,4 def	86,8 ± 0,4 fg
HS48	91,6 ± 0,4 b	91,7 ± 0,4 b	89,3 ± 0,4 cd	88,7±0,4 cde	86,3 ± 0,4 fg
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	NS	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$. NS: no significativo

En cuanto a la evolución del parámetro C^* durante el almacenamiento a 9°C (Tabla 30), si bien se encontraron diferencias significativas para algunos periodos de muestreo, en la práctica los valores fueron muy similares entre sí, no teniendo estas diferencias importancia práctica. Durante la simulación de la comercialización (Tabla 31), la interacción Tto*Ti no fue significativa, así como tampoco hubo diferencias entre los tratamientos ($p > 0.05$). Luego de aplicados los tratamientos y hasta los 30 días de almacenamiento la intensidad de color fue similar ($p > 0.05$). Recién a partir de los 45 días (P45₀) se encontraron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en la presente tesis en cuanto a la evolución del parámetro h° señalan que si los frutos son conservados a la temperatura de 2°C , los tratamientos aplicados no producen un efecto notorio en el color de los pomelos, independientemente del tiempo de conservación. Estos resultados son compatibles con trabajos realizados por Millar & McDonald (1991, 1992), donde se observó que estos mismos frutos sometidos a tratamientos térmicos prácticamente no mostraron diferencias en el color respecto de los no tratados, durante 4-5 semanas de estudio. En cambio, si los pomelos (tanto tratados como control) son conservados a 9°C , el color de los mismos (medido por el parámetro h°) disminuye en forma significativa

($p < 0.05$) a partir de los 30 días de conservación (**Tabla 28**), mostrando una ligera tendencia hacia colores menos verdosos. Si bien esta situación se observó en los tres tratamientos, fue más notoria en los frutos C. Una explicación posible a estos resultados se deba a la utilización de una mayor temperatura de conservación (9°C), la cual estimularía, en cierta medida, la síntesis de los pigmentos carotenoides (temperatura óptima para la síntesis de carotenoides: 18°C , Cuquerella 1997). Así, los frutos "control", alcanzaron menores valores de h° (frutos con color menos verdoso). En cambio, es posible que la alta temperatura utilizada en los frutos tratados térmicamente (37°C), haya inhibido la síntesis de los compuestos carotenoides y/o la degradación de la clorofila, y en definitiva estos mecanismos llevarían a un mayor valor de h° .

Tabla 30. Evolución del C^* (medias y errores estándar) en pomelos " Marsh", inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	39,6 ± 0,1 g	40,1±0,1cde	39,9 ± 0,1 de	41,3 ± 0,1 a	40,5 ± 0,1 b
HS24	39,4 ± 0,1 g	41,6± 0,1 a	40,2 ± 0,1 bd	39,5 ± 0,1 g	40,5 ± 0,1 bc
HS48	39,8 ± 0,1 efg	40,2± 0,1 bd	40,2 ± 0,1 bd	40,1 ± 0,1 df	40,2 ± 0,1 bd
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	NS	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$. NS: no significativo

Tabla 31. Evolución del C* (medias y errores estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	39,6 ± 0,2	40,1 ± 0,2	39,7 ± 0,2	40,5 ± 0,2	41,0 ± 0,2
HS24	39,4 ± 0,2	39,6 ± 0,2	40,2 ± 0,2	40,3 ± 0,2	40,8 ± 0,2
HS48	39,8 ± 0,2	39,9 ± 0,2	40,1 ± 0,2	40,4 ± 0,2	40,8 ± 0,2
Ti	C	C	C	B	A
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	Covariable
	*	NS	*	NS	*

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. *ANOVA, $p < 0.05$; NS: no significativo

Letras distintas en **mayúscula** indican diferencias significativas por **tiempo** ($p < 0,05$ LSMEANS).

3.2.1.2 Pérdida de peso

La **Tabla 32** muestra la PP durante la conservación de los pomelos “ Marsh” a 2°C, y la **Tabla 33**, este mismo parámetro luego de la simulación de la comercialización (+ 7 días a 20°C). Los resultados indican que la PP estuvo afectada significativamente tanto por el período de almacenamiento como por los tratamientos aplicados. A partir de los 15 días de frigoconservación (P15₀) se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres tratamientos analizados (**Tabla 32**), siendo los frutos sometidos al tratamiento térmico largo (HS48) los que manifestaron la mayor PP. En los frutos control (C) la PP fue aumentando paulatinamente durante la conservación a bajas temperaturas, alcanzando un 2,2% al final del período evaluado (P60₀). En cambio, los frutos tratados térmicamente sufrieron un mayor grado de deshidratación, siendo los porcentajes proporcionales a la severidad del tratamiento aplicado: 2,7 y 3,6% al final de la conservación (P60₀) para los tratamientos HS24 y HS48, respectivamente.

Cuando la fruta estuvo expuesta a TA luego de la conservación frigorífica, para simular condiciones de comercialización (**Tabla 33**), el grado de deshidratación sufrido fue aún mayor. A partir de los 15 días de almacenamiento (P15₀), el tratamiento HS48 fue el que produjo el efecto más severo ($p < 0.05$), llevando las PP

al orden de 4.0-4.6%. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los frutos correspondientes a los tratamientos C y HS24.

Tabla 32. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh ” , durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo			
	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	0,7 ± 0,2 g	1,2 ± 0,3 f	1,8 ± 0,3 e	2,2 ± 0,5 d
HS24	1,6 ± 0,3 ef	1,9 ± 0,2 de	2,2 ± 0,4 d	2,7 ± 0,4 c
HS48	3,0 ± 0,4 bc	3,0 ± 0,5 bc	3,2 ± 0,4 b	3,6 ± 0,6 a
Nivel de Significancia del ANOVA				
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti
	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Tabla 33. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh ” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreo			
	P15 ₇	P30 ₇	P45 ₇	P60 ₇
C	2,3 ± 0,5 d	2,8 ± 0,5 cd	3,1 ± 0,5 c	3,6 ± 0,6 b
HS24	2,6 ± 0,4 cd	2,9 ± 0,3 c	2,9 ± 0,5 c	3,7 ± 0,5 b
HS48	4,1 ± 0,6 ab	4,0 ± 0,6 b	4,1 ± 0,5 b	4,6 ± 0,7 a
Nivel de Significancia del ANOVA				
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti
	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Las **Tablas 34** y **35** muestran la PP de los pomelos sometidos a los diferentes tratamientos durante la conservación a 9°C, y luego de la exposición por otros 7 días a 20°C, respectivamente. En forma similar a los frutos que fueron conservados a 2°C, el tratamiento por calor aplicado previo al almacenamiento de la fruta incrementó la PP en relación a C. A los 15 días de la conservación (P15₀) ya se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control (C) y ambos tratamientos térmicos (**Tabla 34**). Sin embargo, hacia los 60 días de conservación a esta temperatura las PP fueron similares para los tres tratamientos señalando la importancia de la selección y control de la temperatura durante la conservación. En los frutos control (C), la PP fue aumentando durante la conservación ($p < 0.05$), alcanzando el valor de 3,3 % al final del período evaluado (P60₀). En el caso de los frutos tratados térmicamente, este porcentaje aumentó paulatina pero significativamente durante el período estudiado, alcanzando valores del orden de 3.7–3.8% hacia los 60 días.

Durante el período de simulación de la comercialización (**Tabla 35**) los porcentajes de PP fueron aún superiores a los registrados durante la conservación a 9°. Si bien se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los frutos control (C) y los tratados térmicamente hasta los 30 días de conservación (P30₇), al final de los ensayos (P60₇) la PP de los pomelos convergió a valores similares (4,5%), independientemente del tratamiento aplicado.

Si comparamos el efecto de ambas temperaturas de conservación (no se aplicó un análisis estadístico) sobre la PP, se destaca que a la temperatura de 9°C, el efecto de los tratamientos sobre los frutos se hace relativamente mas notable tanto en los frutos expuestos a TA durante 7 días como en los no expuestos.

Tabla 34. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo			
	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	1,3 ± 0,1 g	2,2 ± 0,3 f	2,7 ± 0,4 de	3,3 ± 0,5 bc
HS24	2,4 ± 0,4 ef	3,1 ± 0,4 cd	3,0 ± 0,4 cd	3,8 ± 0,5 a
HS48	2,5 ± 0,5 ef	3,1 ± 0,4 cd	3,6 ± 0,5 ab	3,7 ± 0,5 ab
Nivel de Significancia del ANOVA				
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti
	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05 LSMEANS)
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, p< 0.05

Tabla 35. Evolución de la PP expresado en porcentaje (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 9°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C)

Tratamiento	Períodos de Muestreo			
	P15 ₇	P30 ₇	P45 ₇	P60 ₇
C	2,6 ± 0,3 f	3,4 ± 0,4 e	3,8 ± 0,6cde	4,5 ± 0,7 ab
HS24	3,5 ± 0,6 e	4,1 ± 0,4 abc	3,6 ± 0,4 de	4,6 ± 0,6 a
HS48	3,6 ± 0,6 de	4,0 ± 0,5 bcd	4,5 ± 0,5 ab	4,5 ± 0,6 ab
Nivel de Significancia del ANOVA				
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto*Ti
	*	*	*	*

Medias con letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05 LSMEANS)
Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, p< 0.05

Ensayos realizados por Porat *et al.* (2000a) con pomelos “ Star Ruby” , sometidos a diferentes tratamientos térmicos poscosecha, sugirieron que el efecto de los tratamientos sobre la fruta dependía de las características de los tratamientos. Así, estos autores observaron que tanto el preacondicionamiento térmico como el

tratamiento de GT incrementaban significativamente la PP de los frutos; por el contrario, los tratamientos por inmersión en agua caliente no tenían efecto sobre este parámetro. A ese respecto, Porat *et al.* (2000a) sugieren que el responsable de la mayor PP sería el tiempo de exposición de los frutos durante los tratamientos térmicos. De esta manera, la inmersión en baño de agua que se realiza en forma rápida (segundos o minutos) produciría una menor PP comparada con aquellos tratamientos en los que se necesita una cámara (preacondicionamiento y GT) y que son sustancialmente más largos (horas ó días). Diversos autores informan que los tratamientos cortos aplicados poscosecha, en general no influyen en los parámetros de calidad de las frutas, mientras que los tratamientos largos disminuyen significativamente la AT e incrementan la PP y el IM (Hatton & Cubbedge, 1983; Porat *et al.*, 2000a; Schirra *et al.*, 2004; Fallik, 2004). Coincidentemente, los resultados obtenidos en la presente tesis indican que los tratamientos térmicos aplicados producen la deshidratación de los frutos durante el período de conservación, en una magnitud proporcional a la intensidad de los mismos.

Las bajas temperaturas de conservación provocarían también una reducción del peso. En el caso particular de los pomelos, se ha comprobado que el flavedo es más poroso bajo refrigeración que a TA. Este aumento de la porosidad facilitaría el aporte de oxígeno hacia la membrana, pero al mismo tiempo favorecería la salida de agua, provocando de esta forma una mayor deshidratación del fruto (Nordby & McDonald, 1991).

Teniendo en cuenta los valores de PP registrados en los frutos de pomelos sometidos a los tratamientos térmicos propuestos en la presente tesis, se podría experimentar con el uso de envoltorios durante la conservación con el objeto de minimizarlas.

3.2.1.3 Porcentaje de Jugo

La **Tabla 36** representa la variación del porcentaje de jugo durante la conservación de pomelos a 2°C. Solamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el factor tiempo. No hubo interacción entre los factores tratamiento y tiempo, ni tampoco hubo diferencias significativas entre tratamientos.

El porcentaje de jugo en los frutos sometidos a los diferentes tratamientos fue disminuyendo lentamente a lo largo del período de conservación ($p < 0.05$), llegando a valores comprendidos entre 30 y 32% de jugo al cabo de 60 días de conservación (M60₀). Este resultado coincide con el aumento de PP observado durante el almacenamiento, particularmente al final del período de estudio.

La **Tabla 37** muestra el análisis del % de jugo durante la conservación de pomelos a 9°C. La interacción entre los factores tratamiento y tiempo fue significativa ($p < 0.05$). Sin embargo, las medias entre los diferentes tratamientos no mostraron una tendencia definida en cada uno de los tiempos evaluados, ni tampoco en cada tratamiento individual durante los diferentes períodos estudiados. Independientemente de este comportamiento fluctuante, al final del período ensayado los porcentajes de jugo de los tres tratamientos fueron muy similares entre sí y cercanos al 38%. Es importante destacar también aquí que el porcentaje de jugo de los pomelos conservados a 9°C durante todo el período ensayado fue siempre igual o mayor que los porcentajes mínimos establecidos por la reglamentación argentina para su comercialización en el mercado externo (35%, IASCAV, 1993).

Tabla 36. Evolución del porcentaje de jugo (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh ” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	35,9 ± 2,4	37,9 ± 0,4	34,4 ± 1,4	32,1 ± 0,9	32,2 ± 1,9
HS24	40,3 ± 2,0	37,8 ± 1,5	35,8 ± 1,4	33,8 ± 1,8	32,5 ± 2,7
HS48	37,2 ± 1,2	36,1 ± 1,3	34,8 ± 1,5	33,7 ± 2,5	30,5 ± 2,8
Ti	A	AB	BC	CD	D
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	
	*	NS	*	NS	

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$; NS: no significativo

Medias con letras distintas en **mayúscula** indican diferencias significativas en el **tiempo** ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tabla 37. Evolución del porcentaje de jugo (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	35,9 ± 2,4 bcd	33,7 ± 0,8 d	35,3 ± 0,4 cd	34,3 ± 1,2 d	38,3 ± 0,7 abc
HS24	40,3 ± 2,0 a	38,6 ± 0,9 abc	36,8 ± 0,8abcd	40,1 ± 0,9 a	39,4 ± 0,4 ab
HS48	37,2 ± 1,2 abcd	35,7 ± 1,3 cd	35,7 ± 1,7 cd	36,8 ± 1,2 abcd	37,3 ± 0,3 abcd
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$.

3.2.1.4 Sólidos Solubles Totales

La **Tabla 38** muestra la evolución de los SST luego de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C por el período de 60 días. Los resultados indican que a esta temperatura de conservación, los SST no variaron en forma importante (solo fue significativa esta variación para casos puntuales), tanto entre los distintos tratamientos ensayados como entre los diferentes tiempos de evaluación dentro de un mismo tratamiento.

La **Tabla 39** muestra el contenido de SST de los pomelos sometidos a los diferentes tratamientos y conservados a 9°C. Inmediatamente después de aplicados los tratamientos (P1₀) se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los frutos C y los sometidos a los tratamientos térmicos, siendo los primeros los que presentaron los mayores valores de SST (12,2). Sin embargo, esta situación fue cambiando paulatinamente durante los diferentes períodos de muestreo obteniéndose valores similares para los tres tratamientos hacia los 15 días de conservación y revirtiéndose la relación hacia el final del muestreo.

Tabla 38. Evolución del contenido de SST, expresados en °Brix (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	12,2 ± 0,2 ab	10,7 ± 0,1 fg	10,8 ± 0,5 fg	10,7 ± 0,3 fg	10,8 ± 0,3 efg
HS24	11,4 ± 0,2 bcde	10,4 ± 0,2 g	11,6 ± 0,5 abcde	12,2 ± 0,4 a	12,1 ± 0,3 abc
HS48	11,2 ± 0,4 defg	11,6 ± 0,1 abcde	11,3 ± 0,1 cdef	11,1 ± 0,2 defg	11,7 ± 0,2 abcd
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05 LSMEANS).

Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, p< 0.05

Tabla 39. Evolución del contenido de SST expresados en °Brix (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	12,2 ± 0,2 a	12,0 ± 0,1 ab	11,4 ± 0,2 bc	11,2 ± 0,2 cd	10,7 ± 0,3 d
HS24	11,4 ± 0,2bcd	11,6 ± 0,1abc	11,5 ± 0,2abc	12,2 ± 0,2 a	11,5 ± 0,2abc
HS48	11,2 ± 0,4 cd	11,5 ± 0,1abc	11,3 ± 0,1bcd	11,3 ± 0,2 cd	11,6 ± 0,4abc
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05 LSMEANS). Tto: tratamiento,

Ti: tiempo. * ANOVA, p< 0.05

El análisis de los valores de SST obtenidos en los frutos de pomelos sometidos a los diferentes tratamientos y conservados tanto a 2°C como a 9°C, indica

que este parámetro no es afectado en forma importante por ninguno de los dos factores incluidos en el modelo (Tratamiento y Tiempo de conservación).

Según Mazzuz (1996), el momento óptimo para la cosecha de pomelos “ Marsh” , el contenido de azúcar debe ser elevado (SST>11). Para cumplir con este requerimiento son de gran importancia las características del clima y las prácticas de cultivo, ya que distintas investigaciones han informado que este parámetro no es afectado sustancialmente por los tratamientos poscosecha aplicados (Lurie & Klein, 1990; Miller & McDonald, 1991; Shellie & Mangan, 1998). Entre estas investigaciones, Porat *et al.* (2000a) estudiando el efecto de distintos tratamientos de poscosecha sobre pomelos “ Star Ruby” (preacondicionamiento térmico, tratamiento térmico en cámara, inmersión en baño caliente) indicaron que ninguno de los tratamientos ensayados modificó el contenido de SST. De la misma manera, Acedo *et al.* (2004) tampoco observaron diferencias significativas en el contenido de SST entre frutos de ananá que fueron tratados térmicamente (38°C por 24 h) y los C (no tratados). Los resultados obtenidos en esta tesis en cuanto a la evaluación de los SST en pomelos, concuerdan con lo informado para mandarinas en esta tesis, y por otros autores tanto en frutos cítricos (Schirra *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007) como en otros tipos de frutas como manzanas (Klein & Lurie, 1990; Klein *et al.*, 1990; Lui, 1978) y mangos (Jacobi & Giles, 1997).

3.2.1.5 Acidez total

La **Tabla 40** muestra la evolución de la AT en los frutos sometidos a los diferentes tratamientos y conservados a 2°C por un período de 60 días, y en la **Tabla 41** se presenta la misma variable evaluada durante la conservación a 9°C. Si bien la interacción entre los factores tratamiento y tiempo fue significativa ($p < 0.05$) para ambas temperaturas de conservación, en la práctica los valores de AT en pomelos fueron muy similares entre sí, tanto entre los tratamientos ensayados como para los diferentes períodos de muestreo dentro de un mismo tratamiento.

Tabla 40. Evolución de la AT expresada en g ác. cítrico/100g de fruta (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , inmediatamente después de aplicados los tratamientos y durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	2,2 ± 0,1 ab	2,0 ± 0,2 cd	2,1 ± 0,1 bcd	2,3 ± 0,1 abc	2,0 ± 0,1 cd
HS24	2,1 ± 0,1 bcd	1,9 ± 0,1 d	2,4 ± 0,2 a	2,4 ± 0,1 ab	2,2 ± 0,1abcd
HS48	2,1 ± 0,1abcd	2,1 ± 0,1 bcd	2,1 ± 0,1 bcd	2,1 ± 0,2 bcd	2,2 ± 0,1abcd
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Tabla 41. Evolución de la AT expresada en g ác. cítrico/100g de fruta (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	2,2 ± 0,1 bcd	2,5 ± 0,1 a	2,0 ± 0,1 de	2,2 ± 0,1 bcd	2,2 ± 0,1bcde
HS24	2,1 ± 0,1 cde	2,0 ± 0,1 e	2,2 ± 0,1 bcd	2,4 ± 0,1 ab	2,3 ± 0,1 bc
HS48	2,1 ± 0,1 cde	2,0 ± 0,1 de	2,0 ± 0,1 de	2,0 ± 0,1 cde	2,2 ± 0,1bcde
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Es interesante realizar un análisis conjunto del contenido de SST y la AT en frutas, ya que ambos son determinantes del sabor. Diversos autores han informado que la acidez es el parámetro realmente afectado por la aplicación de los tratamientos térmicos. Así, McCollum *et al.* (1993) en ensayos realizados con

mangos, observaron al cabo de 9 días de conservación a 21°C que los frutos sometidos a GT exhibían el mismo contenido de SST que los frutos C (no tratados), mientras que el contenido de ácido cítrico –principal componente de la acidez– era menor en los frutos tratados. Por otra parte, Schirra *et al.* (2004), trabajando con naranjas de la variedad “Bood” reportaron que la aplicación de tratamientos térmicos ya sea en cámara ó por inmersión no afectaba el contenido de SST, mientras que la AT era menor en la fruta tratada. Según Paull & Chen (2000), el efecto de los tratamientos térmicos sobre la AT, sería altamente dependiente de la temperatura utilizada y de la duración del tratamiento aplicado. En coincidencia con lo reportado previamente, los resultados en pomelos indican que el contenido de SST no fue modificado por los tratamientos térmicos. Los valores de AT en forma contraria a lo esperado, tampoco fueron afectados significativamente por los tratamientos aplicados. La razón de esta diferencia podría basarse en el hecho que en pomelos, en comparación con otros frutos, la concentración del ácido cítrico evoluciona más lentamente hacia valores menores (Mazzuz, 1996).

Así como ocurrió en mandarinas, la evolución de la AT de pomelos en el tiempo no disminuyó como se describe en la bibliografía (Murata, 1977). De esta forma, sería necesario realizar otro tipo de análisis para encontrar las razones de esta diferencia (composición de ácidos orgánicos, azúcares individuales, etc.).

3.2.1.6 Índice de madurez

La **Tabla 42** muestra los valores de IM de los pomelos sometidos a los diferentes tratamientos y conservados a 2°C. El análisis de varianza mostró la existencia de interacción ($p < 0.05$) entre los factores evaluados (tiempo y temperatura). Sin embargo, no se observaron diferencias importantes entre los tratamientos entre sí, así como entre los diferentes períodos de muestreos dentro de cada tratamiento.

La **Tabla 43** muestra la evolución del IM en los pomelos sometidos a los tratamientos por calor y conservados a 9°C. Nuevamente, la interacción entre los factores tratamiento y tiempo de conservación fue significativa ($p < 0.05$). Sin embargo, los valores de las medias de los tratamientos fueron muy similares entre sí y tampoco hubo diferencias a lo largo del período evaluado.

Tabla 42. Evolución del IM (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 2°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	5,5 ± 0,4 ab	5,4 ± 0,1 abc	5,3 ± 0,3 abc	4,7 ± 0,1 c	5,3 ± 0,2 abc
HS24	5,5 ± 0,1 ab	5,4 ± 0,2 ab	4,8 ± 0,2 bc	5,2 ± 0,2 abc	5,2 ± 0,1 ab
HS48	5,3 ± 0,1abc	5,6 ± 0,1 a	5,5 ± 0,3 ab	5,4 ± 0,3 abc	5,3 ± 0,3 abc
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

Tabla 43. Evolución del IM (medias y desvíos estándar) en pomelos “ Marsh” , durante la conservación a 9°C

Tratamiento	Períodos de Muestreo				
	P1 ₀	P15 ₀	P30 ₀	P45 ₀	P60 ₀
C	5,5 ± 0,4abcd	4,8 ± 0,1 e	5,7 ± 0,1 ab	5,0 ± 0,2 de	5,0 ± 0,1 de
HS24	5,5 ± 0,1abcd	5,9 ± 0,2 a	5,2 ± 0,2bcde	5,1 ± 0,1bcde	5,1 ± 0,1 cde
HS48	5,3 ± 0,1abce	5,7 ± 0,1 ab	5,6 ± 0,2abc	5,6 ± 0,4 abc	5,3 ± 0,2bcde
Nivel de Significancia del ANOVA					
	Modelo	Tratamiento	Tiempo	Tto.*Ti	
	*	*	*	*	

Medias con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ LSMEANS). Tto: tratamiento, Ti: tiempo. * ANOVA, $p < 0.05$

El IM se calcula como la relación entre los valores de SST y AT, esta relación permite ocasionalmente detectar diferencias entre los tratamientos aplicados que no fueron reveladas cuando se analizaron estos parámetros en forma individual. Es sabido que la evolución del IM (SST/AT) es el resultado de las dos velocidades relativas a las que se producen dos procesos metabólicos simultáneos: el incremento

en el contenido de carbohidratos totales y la disminución del contenido de los ácidos orgánicos, representados estos mayormente por el ácido cítrico (Davies & Albrigo, 1994).

En los ensayos realizados en el presente trabajo de tesis, no se encontró una variación importante del IM ni entre tratamientos ni durante la conservación a las dos temperaturas evaluadas.

El hecho que el valor de IM permanezca relativamente constante es probablemente producto de que los dos parámetros incluidos en la fórmula para su cálculo (SST y AT) no hayan sufrido variaciones. En los momentos anteriores a la cosecha, es sabido que el IM tiende a aumentar a medida que se acerca la fecha de recolección por disminución de la concentración del ácido cítrico, debido en parte a un efecto de dilución por el crecimiento del fruto y en parte a su metabolización como sustrato de la respiración. Es probable, que en el caso de los pomelos, una vez alcanzado un valor mínimo antes de la cosecha no se produzcan cambios posteriores durante la conservación poscosecha.

3.1.1.7 Alteraciones fisiológicas

- **Daño por frío**

La exposición de los frutos de pomelos a 2°C por un período de conservación de 2 meses provocó síntomas de DF en los frutos C, manifestándose principalmente como *pitting* (**Fig. 35A**). Este síntoma se detectó a partir de los 30 días de conservación (P30₀, IDF \cong 0,05), y fue aumentando su incidencia en forma paulatina durante los progresivos períodos de muestreo hasta llegar a valores de IDF = 0,8 a los 60 días de conservación (P60₀). Esta alteración fue reducida en forma exitosa por la aplicación de los tratamientos térmicos. Así, los frutos sometidos al tratamiento HS24 luego de 60 días de conservación frigorífica, presentaron valores muy bajos de IDF (0,2). El tratamiento térmico largo (HS48) ejerció una protección aún mayor sobre los frutos, dado que los mismos no mostraron síntomas de DF durante toda la conservación a 2°C.

Cuando la fruta conservada a 2°C fue transferida posteriormente a TA, a efectos de simular las condiciones de comercialización (**Fig. 35B**) e inducir la manifestación del daño, la incidencia del IDF se incrementó particularmente en los

frutos testigos (C), llegando a valores de IDF superiores a 0,9 al cabo de 60 días de almacenamiento (P60₀). En cambio, en el tratamiento HS24 se observaron frutos con DF recién a los 45 días de conservación (P45₇), llegando tan sólo a valores de IDF de 0,3 luego de 60 días de conservación (P60₇). Los frutos sometidos al tratamiento HS48 manifestaron lesiones de DF solamente al final de las evaluaciones (P60₇), siendo el valor de este índice muy bajo ($\cong 0,1$).

Durante todo el período en que los pomelos fueron conservados a 9°C, no se registraron síntomas asociados a esta alteración. Recién cuando la fruta fue transferida a TA, se detectaron algunos frutos con *pitting* en el tratamiento control (C), generando un IDF muy bajo (0,1) hacia el final del período evaluado (P60₇) (dato no mostrado). Resultado esperado en cítricos almacenados a una temperatura óptima (9°C).

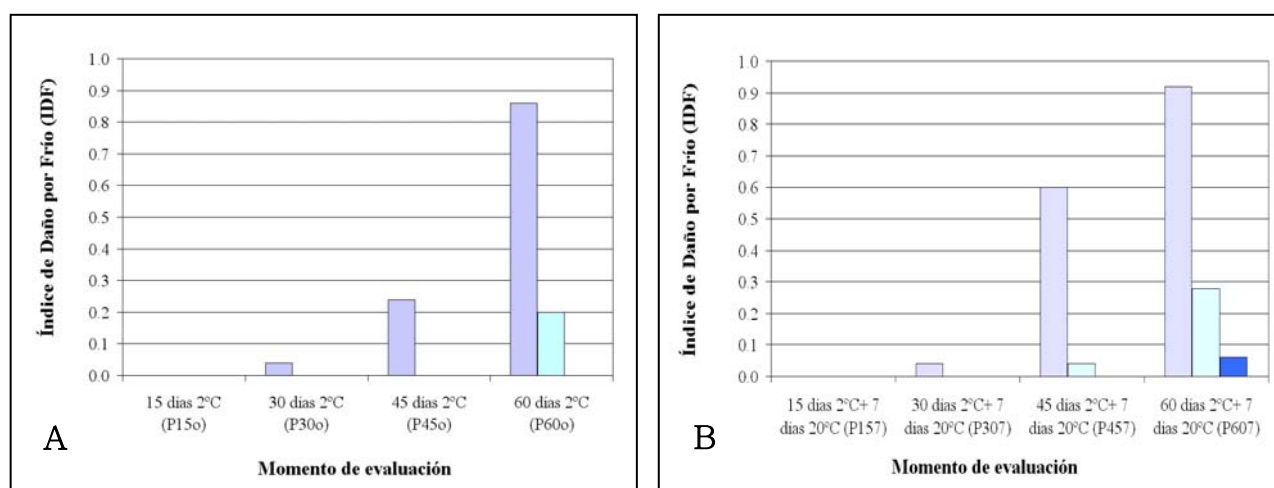
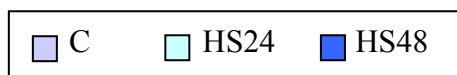


Figura 35. IDF en pomelos “ Marsh” luego de la conservación a 2°C y del período de comercialización (7 días a 20°C). Las frutas fueron analizadas quincenalmente durante la conservación a 2°C (**A**), y luego de la exposición a 20°C por 7 días (**B**). Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: control (C), tratamiento térmico por 24 h a 37°C (HS24) y tratamiento térmico por 48 h a 37°C (HS48).



Tanto en frutos cítricos como en otros cultivos la incidencia de DF impone una limitación en el manejo poscosecha, ya que obliga a almacenarlos a temperaturas relativamente altas (11–13°C; Kader & Arpaia, 2002) debido a la gran susceptibilidad

a las bajas temperaturas (0-8°C; Porat, 2004). En los últimos años, han sido sugeridos numerosos tratamientos poscosecha con el fin de mejorar la calidad final de los cítricos almacenados a bajas temperaturas (Wang, 1990; 1993). En este sentido, es importante resaltar el efecto benéfico de los tratamientos térmicos sobre la reducción de la incidencia del DF en diversas frutas. Entre ellos, se cuenta con los trabajos realizados en mandarinas “Fortuna” (Ben-Yehoshua *et al.*, 1987), en mangos (McCollum *et al.*, 1993), y en naranjas “Blood” (Schirra *et al.*, 2004).

En el caso particular de los pomelos “Star Ruby”, Hatton & Cubbedge (1982, 1983) observaron que el preacondicionamiento de estos frutos (7 días a 16°C) previo a su transferencia a bajas temperaturas, era capaz de reducir el DF en forma importante. Porat *et al.* (2000a,b), trabajando con los mismos frutos, observaron que la aplicación del tratamiento térmico por inmersión (62°C por 20 s) era también efectivo en reducir el desarrollo del daño. Mas aún, en un trabajo reciente Sapitnitskaya *et al.* (2006) observaron que la aplicación conjunta de ambos tratamientos (preacondicionamiento térmico seguido por inmersión en agua caliente) era capaz de reducir el desarrollo de DF en estos frutos de pomelo más efectivamente que su aplicación individual (98 y 93% después de 8 y 14 semanas a 2°C respectivamente, vs. 85%). Estos últimos autores sugirieron que los tratamientos térmicos activarían diferentes mecanismos defensivos contra el estrés por frío en forma simultánea, siendo la aplicación combinada de ellos de mayor efectividad posiblemente debido a un efecto sinérgico de ambos tratamientos.

Los resultados informados en este trabajo de tesis en cuanto a la efectividad de los tratamientos térmicos en reducir la incidencia del DF, coinciden con los reportados en la literatura. En este sentido, puede concluirse que la aplicación de cualquiera de los tratamientos térmicos ensayados (HS24 ó HS48), previa al almacenamiento, es capaz de reducir la incidencia de DF en pomelos “Marsh”, aún durante la conservación a temperaturas altamente inductoras de daño (2°C, **Fig. 35**). El control de DF fue dependiente de la intensidad del tratamiento aplicado, siendo el tratamiento térmico largo (HS48) el más efectivo en controlar el desarrollo de síntomas asociados a esta alteración (**Fig. 35**).

- Efecto de los tratamientos sobre las podredumbres

Durante la exposición de los pomelos a 2°C (Fig. 36A), sólo se detectaron frutos con podredumbres en el tratamiento HS24 a partir de los 15 días de conservación (P15₀); y en el tratamiento HS48 recién a los 45 días (P45₀). En ambos casos, los valores hallados fueron menores al 2%. Cuando la fruta fue transferida de una cámara a TA (Fig. 36B), se detectaron frutos con este tipo de manifestación en todos los tratamientos ensayados. Los frutos control (C) presentaron podredumbres a los 15 días de conservación (P15₇); y en los sometidos al tratamiento térmico (HS24, HS48) esta manifestación se detectó recién a partir de los 45 días (P45₇). Es importante destacar, que en todos los casos evaluados el porcentaje de frutos con podredumbres nunca superó el valor de 4%.

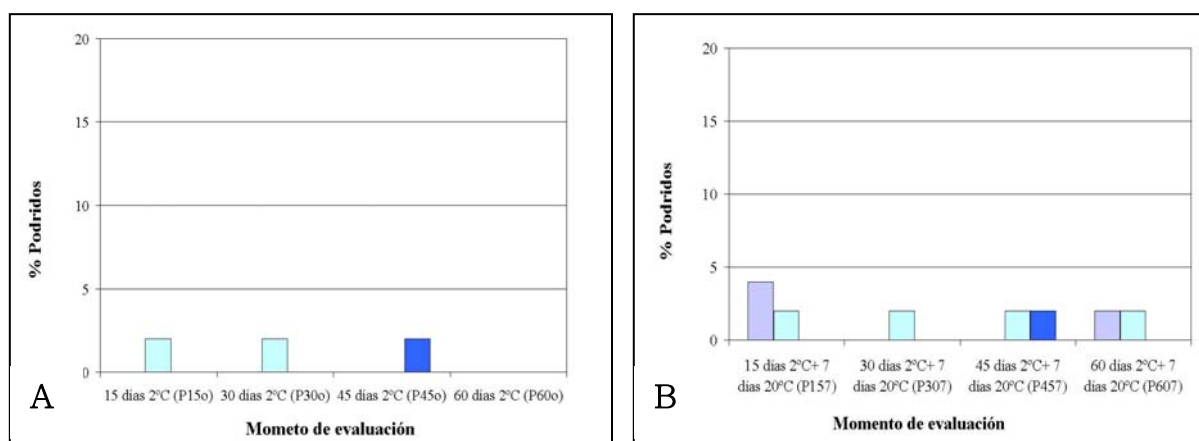


Figura 36. Porcentaje de podredumbres en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 2°C y del período de simulación de la comercialización (7 días a 20°C). Los frutos fueron analizados quincenalmente durante la conservación a 2°C (A), y luego de ser expuestos por 7 días a 20°C (B). Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: control (C), tratamiento térmico por 24 h a 37°C (HS24) y tratamiento térmico por 48h a 37°C (HS48).



Durante la conservación a 9°C (Fig. 37) se detectaron también frutos con podredumbres en los tres tratamientos aplicados, siendo estos porcentajes

sensiblemente mayores que a 2°C luego de 60 días de conservación (P60₀), aunque los valores en ningún caso superaron el 14%. En cambio, cuando los frutos fueron expuestos a TA luego de la conservación a 9°C (dato no mostrado), la incidencia de podredumbres aumentó en forma importante en los tres tratamientos ensayados, llegando a valores cercanos al 20%.

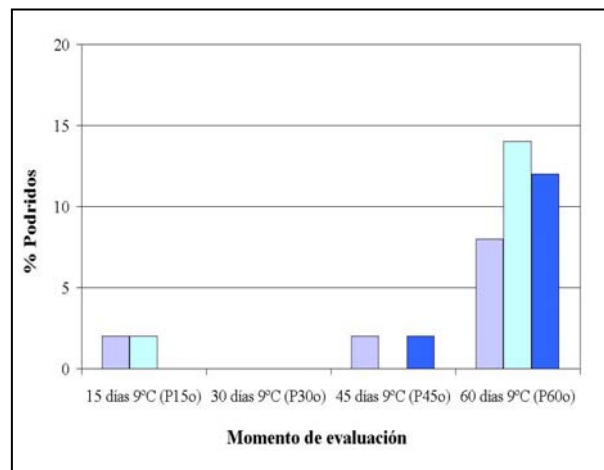
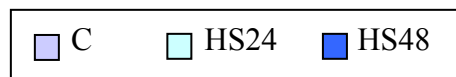


Figura 37. Porcentaje de podredumbres en pomelos “ Marsh” , luego de la conservación a 9°C. Las frutas fueron analizadas quincenalmente durante la conservación a 9°C. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: control (C), tratamiento térmico por 24 h a 37°C (HS24) y tratamiento térmico por 48h a 37°C (HS48).



A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, en relación con la presencia de alteraciones patológicas en pomelos, puede establecerse que la fruta conservada a 9°C (**Fig. 37**) fue más susceptible al ataque de microorganismos que aquella que estuvo conservada a 2°C (**Fig. 36**). Esta diferencia se hace más importante si el fruto es sometido luego a las condiciones de simulación de la comercialización (TA por 7 días). Si bien la temperatura de 9°C es considerada óptima para la conservación de los pomelos, es esencial no perder de vista que es una temperatura elevada para el desarrollo de los microorganismos, y que el lavado convencional con antifúngicos

podría no lograr una mejora importante de estos resultados, no siendo recomendable almacenar los frutos a 9°C si se aplicaron previamente tratamientos térmicos.

La susceptibilidad de los cítricos a las enfermedades de poscosecha aumenta durante el almacenamiento prolongado, debido a los cambios fisiológicos que los patógenos provocan en las frutas (Eckert & Ogawa, 1988). Por lo tanto, la aplicación de tratamientos térmicos con el objeto de aumentar la resistencia a los patógenos y disminuir las pérdidas poscosecha, se presenta también como una alternativa interesante. A este respecto, Del Río *et al.* (1992) observaron que la aplicación del tratamiento térmico de 70 h a 38°C, redujo en pomelos “ Marsh” la incidencia de podredumbres ocasionadas por *Penicilium digitatum* (luego de 40 días de almacenamiento a 20°C) y la incidencia de *Penicilium digitatum* y *Alternaria sp* en naranjas “ Navel” (luego de 30 días de almacenamiento a 20°C). Sin embargo, es aconsejable la realización de ensayos previos a fin de establecer las condiciones para un tratamiento óptimo, dado que los mismos son efectivos solamente en un rango estrecho de intensidad, mas allá de la cual pueden llegar a ser deletéreos. En este sentido, Ben-Yehoshua *et al.* (2000) informaron que la aplicación del tratamiento térmico por inmersión en pomelos logró reducir la incidencia de los patógenos cuando la temperatura de exposición se mantuvo en el rango de 51-54°C durante 2 min. A temperaturas inferiores el tratamiento resultó no ser efectivo, y a temperaturas superiores a 54°C se producía decoloración de la piel. En este mismo fruto, Porat *et al.* (2000a) observaron que la mejor combinación para prevenir el desarrollo de podredumbres era de 15 s a exactamente 62°C. Mediante esta combinación tiempo-temperatura, lograron una reducción de 3-4 log en las unidades formadoras de colonias (CFU) en comparación con la fruta no tratada.

Dado que la presencia de frutos cítricos con alteraciones fisiológicas es uno de los factores limitantes para su comercialización, se ha demostrado en esta tesis que la aplicación de los tratamientos térmicos ensayados (HS24 y HS48) previo a la conservación a bajas temperaturas (2°C) produjo un significativo control de la calidad de la fruta, logrando de esta forma extender la vida útil de los cítricos sin pérdida de la calidad, y brindando una mayor flexibilidad en su comercialización. Por otra parte, desde el punto de vista de la logística necesaria para el transporte y comercialización de estos frutos, la aplicación de estos tratamientos, además de incrementar la

tolerancia al DF, permitiría el almacenamiento conjunto con otros frutos con requerimientos de temperatura de conservación normalmente incompatibles entre sí. Por ejemplo, se podrían almacenar estos frutos cítricos con otros frutos resistentes al frío, dado que si bien son sensibles a las bajas temperaturas cuando son tratados térmicamente se hacen tolerantes. Además, la aplicación del tratamiento térmico permitiría el uso de bajas temperaturas de almacenamiento como tratamiento cuarentenario para el control de los insectos (ej. mosca de la fruta), con menor incidencia de DF (Klein & Lurie, 1991; Martínez-Jávega, 1999). Es más, la combinación de temperatura de conservación de 2°C (extensión de la vida útil por reducción de alteraciones patológicas) y tratamiento térmico (siendo HS48 más efectivo) utilizada para reducir o evitar el DF resulta en una alternativa interesante para conservar los pomelos hasta prácticamente 60 días poscosecha. Alternativa que es similar, desde el punto de vista del DF, a la conservación de los frutos a la temperatura óptima (9°C), aunque a esta última temperatura de conservación se encontró que se desarrollan otras patologías.

3.2.1.8 Evaluación del efecto de los tratamientos aplicados sobre los parámetros determinantes de la calidad en frutos.

La **Fig. 38** muestra el resultado del AD de las muestras de pomelos en sus respectivos tratamientos utilizando los datos de las variables fisiológicas (h° , C^* , PP, %jugo, SST, AT, e IM). El método de selección por pasos (*stepwise*) optó por las variables ángulo Hue (h°) y sólidos solubles totales (SST) como las de mayor peso para diferenciar los tratamientos. Se obtuvo una función discriminante (FD1) que explica el 92,5% de la varianza total. Esta función permitió clasificar a cada muestra en su grupo de pertenencia (tratamientos) en un 78% de los casos originales, y en un 75% luego de la validación cruzada.

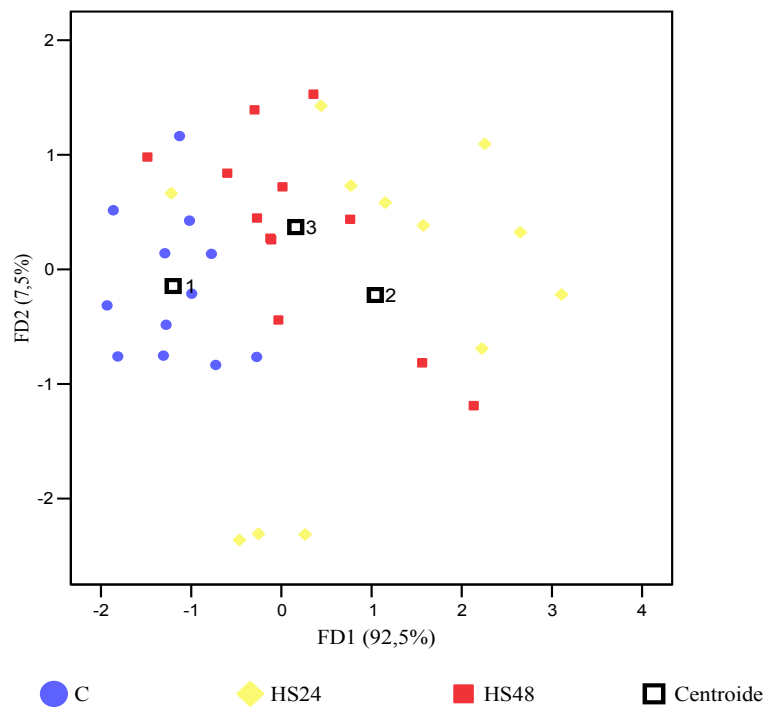


Figura 38. AD de las muestras de pomelos “ Marsh” durante la conservación a 2°C

Se obtuvo la siguiente función discriminante (coeficientes estandarizados):

$$dF1: - 0,651 \cdot h^{\circ} + 0,850 \cdot SST$$

Consecuentemente, se pueden establecer las siguientes funciones de Fisher:

$$C = - 1,829 - 1,349 \cdot SST + 0,744 \cdot h^{\circ}$$

$$HS24 = - 1,666 + 0,944 \cdot SST - 0,947 \cdot h^{\circ}$$

$$HS48 = - 1,179 + 0,405 \cdot SST + 0,203 \cdot h^{\circ}$$

En el análisis de AD de los frutos conservados a 9°C (**Fig. 39**), se utilizaron las mismas variables fisiológicas que en el análisis a 2°C. El método de selección por pasos optó en este caso por h° , IM y el % jugo, como las variables de mayor peso para la diferenciación de los tratamientos. Las dos funciones discriminantes (FD1 y FD2) obtenidas, explican el 82% y 18% de la varianza total respectivamente. La

clasificación de cada muestra en su grupo de pertenencia (tratamiento) fue exitosa en un 72,2% y en un 66,7% luego de la validación cruzada.

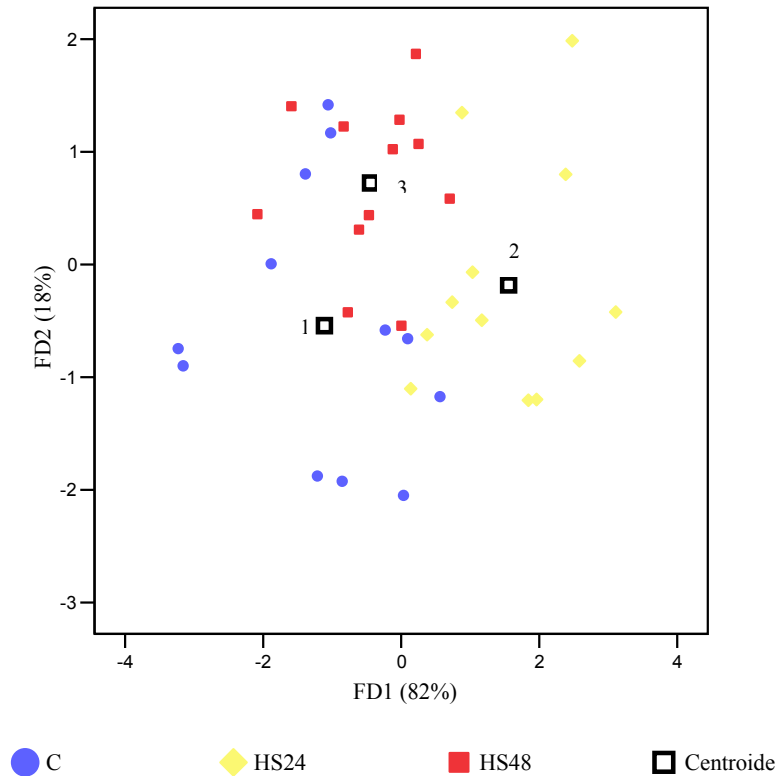


Figura 39. AD de las muestras de pomelos “ Marsh” durante la conservación a 9°C

Se obtuvieron las siguientes funciones discriminantes:

$$dF1: 1,301 * \% \text{ jugo} - 0,307 * IM + 0,902 * h^{\circ}$$

$$dF2: - 0,127 * \% \text{ jugo} + 1,094 * IM - 0,283 * h^{\circ}$$

Consecuentemente, se pueden establecer las siguientes funciones de Fisher:

$$C = - 1,865 - 0,831 * h^{\circ} - 0,281 * IM - 1,840 * \% \text{ jugo}$$

$$HS24 = - 2,328 + 1,425 * h^{\circ} - 0,751 * IM + 2,692 * \% \text{ jugo}$$

$$HS48 = - 1,460 - 0,593 * h^{\circ} + 1,032 * IM - 0,881 * \% \text{ jugo}$$

Es importante destacar que el AD en los frutos de pomelos tuvo en cuenta en la clasificación una variable de color (h°), en ambas temperaturas de conservación analizadas. Cuando la conservación se llevó a cabo a 2°C las funciones incorporaron

además de h° a los SST, mientras que a 9°C el AD incluyó además IM y % jugo. Durante la conservación de la fruta a 9°C , al igual que en el caso de las mandarinas, el AD requirió incorporar una tercera variable en la clasificación de las muestras en sus respectivos tratamientos. A pesar de este recurso, en la validación cruzada el éxito obtenido en la clasificación fue menor que con los frutos conservados a 2°C (75% vs. 66,7%). Del mismo modo, puede observarse que durante la conservación a 2°C (**Fig. 38**), los frutos correspondientes a los tres tratamientos estuvieron mejor agrupados, especialmente los frutos C, mientras que a 9°C (**Fig. 39**) la dispersión de los puntos correspondientes a los tres tratamientos fue mayor.

También en este caso, las variables seleccionadas por el AD (h° , SST, IM y % jugo) son sencillas de medir experimentalmente, y se las utiliza en forma habitual en la evaluación de los frutos en poscosecha.

Durante la conservación de los pomelos a 2°C , el análisis de varianza realizado tanto para el color (medido en h° , **Tabla 24**) como para el contenido de SST (**Tabla 38**) fue significativo ($p < 0.05$), las diferencias en valores absolutos son pequeñas. Sin embargo, el AD eligió a estas dos variables como las de mayor importancia para una discriminación entre los tratamientos. Esta misma situación se repitió para las mediciones realizadas durante la conservación de los pomelos a 9°C respecto de las variables seleccionadas por el AD: h° , % jugo, e IM (**Tabla 28**, **Tabla 37**, y **Tabla 43**, respectivamente). Se desprende de estos resultados, que el AD puede observar diferencias entre los tratamientos utilizando el conjunto de datos de las variables seleccionadas, en comparación con los análisis individuales (ANOVA) de las mismas.

3.2.2 Efecto de los tratamientos térmicos sobre la acumulación de las proteínas de estrés

3.2.2.1 Selección del método de extracción de proteínas del flavedo: Polvos Cetónicos

Se utilizó como primer paso para la extracción de proteínas la preparación de polvos cetónicos a partir del flavedo de los pomelos, siguiendo el mismo procedimiento realizado que en el caso de mandarinas (ver ítem **3.1.3.1**). Los polvos obtenidos utilizando cáscaras de pomelos presentaron las mismas características que los polvos cetónicos de mandarinas.

3.2.2.2 Análisis del perfil de los extractos proteicos mediante estudios electroforéticos e inmunológicos

Los extractos proteicos obtenidos a partir de los polvos cetónicos, correspondientes a los frutos de pomelo sometidos a los diferentes tratamientos y tiempos de conservación fueron analizados mediante las técnicas de SDS-PAGE y *Western blot*.

La **Fig. 40** muestra el análisis electroforético de los extractos de pomelos correspondientes al control (C), obtenidos en diferentes períodos de muestreo durante la conservación a 2°C (P₀). Se observa en los extractos de pomelo recién cosechados (cosecha) –en la región de bajo PM– una banda proteica de gran intensidad de aproximadamente 26-27 kDa (señalada con flecha). Se visualizan además, otras dos bandas mucho más tenues de PM aproximados de 22 y 29 kDa (señaladas con flechas). Un perfil similar se observa en los sucesivos períodos de muestreos hasta el final de los ensayos (P75₀). Contrariamente, en la región próxima a los 70 kDa no se detecta ninguna banda de intensidad observable ni en los frutos recién cosechados ni durante la conservación a 2°C.

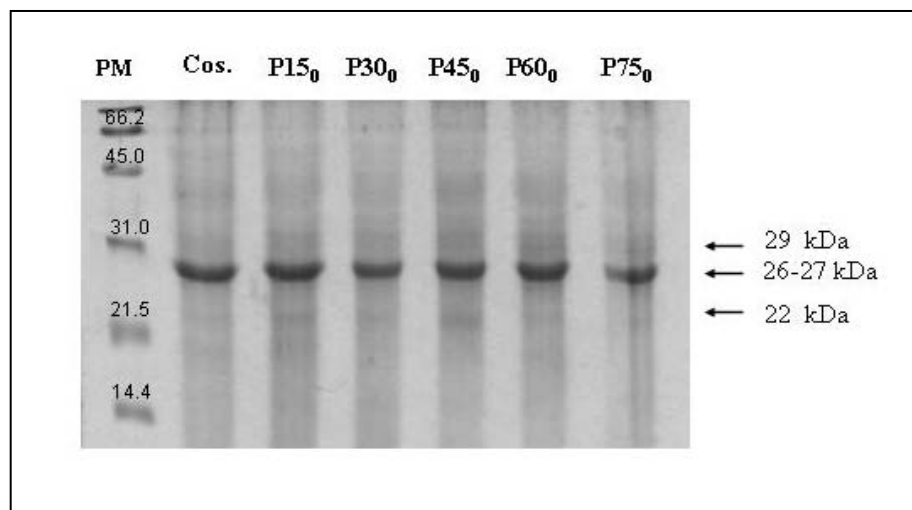


Figura 40. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C) durante la conservación a 2°C. Los frutos fueron analizados quincenalmente durante la conservación frigorífica por un período de 75 días (P15₀, P30₀, P45₀, P60₀ y P75₀).

El análisis por SDS-PAGE de estas mismas muestras de pomelos conservadas a 9°C (**Fig. 41**) describe un perfil proteico similar al observado en las muestras conservadas a 2°C (**Fig. 40**). Se observa también en la cosecha, la banda proteica de gran intensidad de aproximadamente 26-27 kDa (señalada con flecha), y otras dos bandas proteicas de 22 y 29 kDa de menor intensidad. Este perfil proteico se mantiene durante los diferentes períodos de muestreo hasta el final de los ensayos (P75₀).

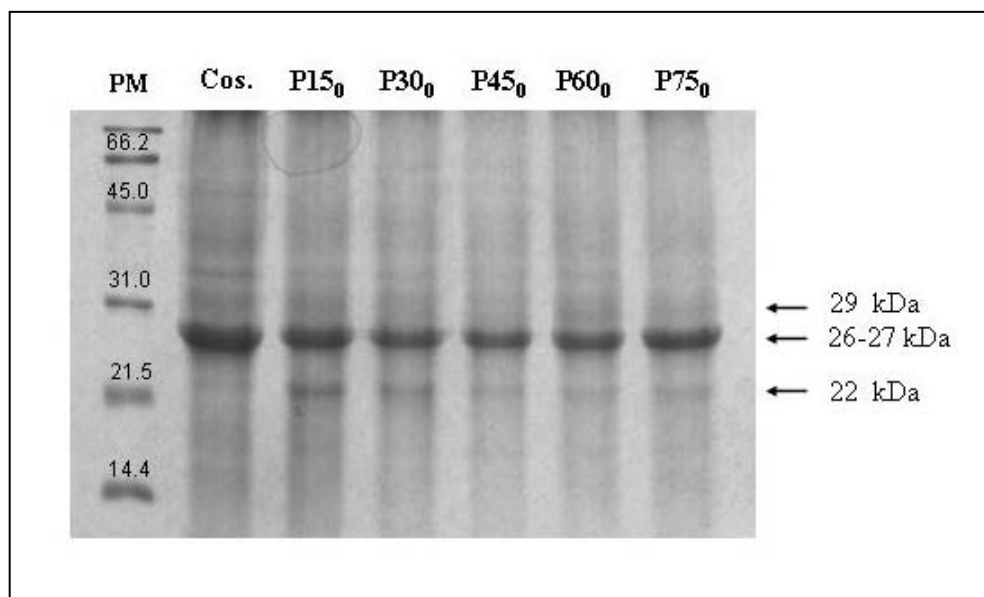


Figura 41. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C) durante la conservación a 9°C. Los frutos fueron analizados quincenalmente durante la conservación por un período de 75 días (P15₀, P30₀, P45₀, P60₀ y P75₀)

La **Fig. 42** muestra el análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos sometidos al tratamiento térmico por 24 h (HS24) y conservadas a 9°C. Al igual que en las muestras correspondientes al control, se observa una banda proteica de gran intensidad de aproximadamente 26-27 kDa presente en la fruta recién cosechada, la cual permanece invariable durante los sucesivos períodos de muestreos. También se visualizan las dos bandas de menor intensidad de PM aproximados de 22 kDa y 29 kDa (señaladas con flechas). A partir de los 15 días de conservación a esta temperatura (P15₀), la banda de 22 kDa comienza a hacerse más

intensa, manteniéndose con esa intensidad durante los sucesivos períodos de muestreo hasta el final de las evaluaciones (P75₀). Un comportamiento similar se observa con la banda de 29 kDa. Nuevamente, en la región próxima a los 70 kDa no se visualizan bandas de proteínas ni en la cosecha ni en los distintos períodos de muestreo.

El análisis por SDS-PAGE de las muestras de pomelos sometidas al tratamiento térmico por 24 h (HS24) y conservadas a 2°C, mostró un perfil proteico idéntico al observado en las muestras conservadas a 9°C (datos no mostrados).

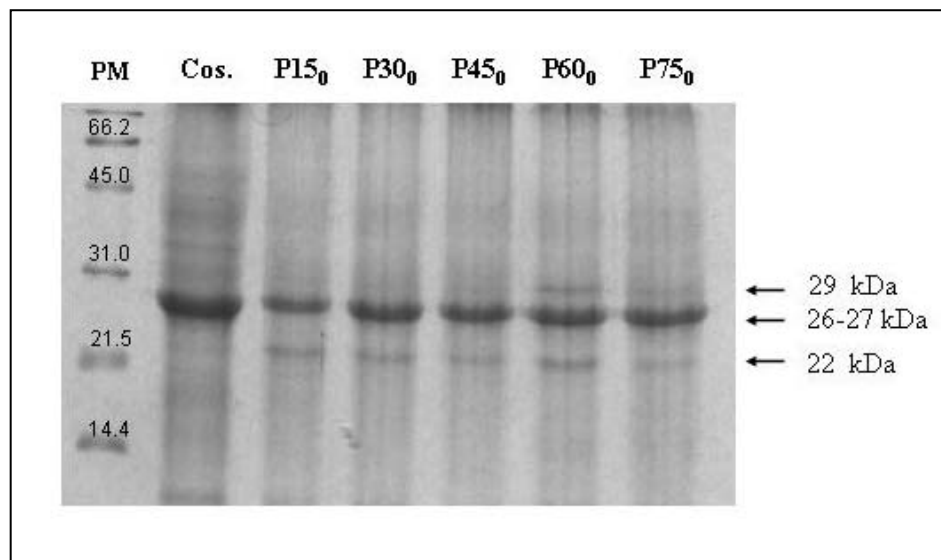


Figura 42. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” sometidos al tratamiento térmico por 24 h (HS24), durante la conservación a 9°C. Los frutos fueron analizados quincenalmente durante la conservación a 9°C por un período de 75 días (P15₀, P30₀, P45₀, P60₀ y P75₀)

La **Fig. 43** muestra el análisis por SDS-PAGE de las muestras de pomelos sometidas al tratamiento térmico por 48 h (HS48) y conservadas a 2°C. Al igual que en los frutos control (C), en la cosecha (cos.) se observa la banda proteica de alta intensidad de 26-27 kDa (señalada con flecha), la cual permanece constante durante todo el período de conservación. Luego de 24 h de aplicado el tratamiento térmico (P1₀), se visualizan además dos bandas proteicas cuyos PM corresponden a 22 kDa y 29 kDa (señaladas con flechas). Este mismo perfil proteico se observa en los

sucesivos períodos de muestreo. En forma coincidente a lo observado en las figuras anteriores, en la región próxima a los 70 kDa no se observaron bandas de proteínas en ninguno de los periodos muestreados.

Resultados similares fueron obtenidos con los extractos de pomelos tratados con HS48 y conservados a 9°C (datos no mostrados).

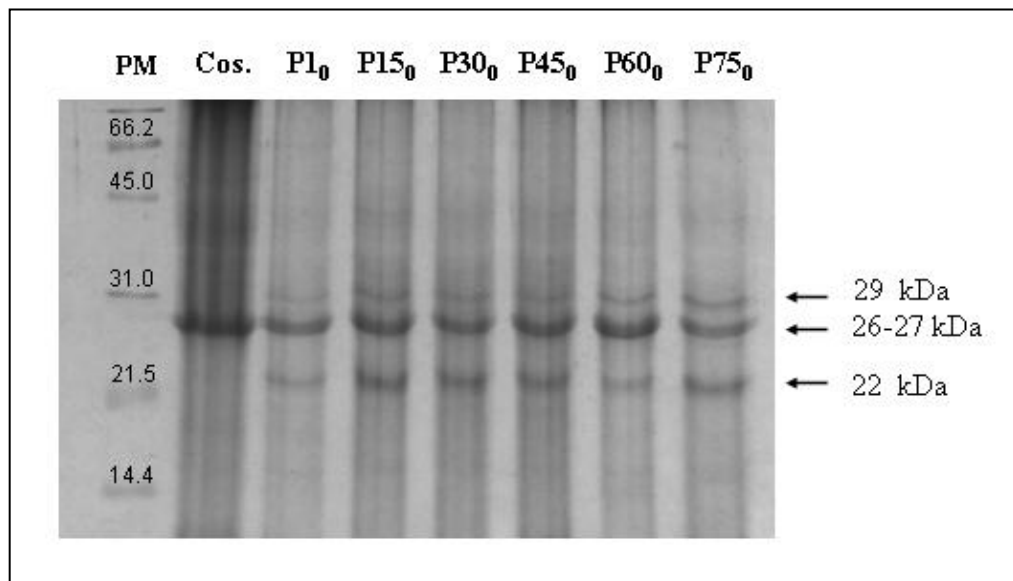


Figura 43. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” sometidos al tratamiento térmico por 48 h (HS48) durante la conservación a 2°C. Los frutos fueron analizados 24 h luego de aplicado el tratamiento térmico (P1₀), y quincenalmente durante la conservación frigorífica por un período de 75 días (P15₀, P30₀, P45₀, P60₀ y P75₀)

En resumen, en los frutos C siempre se detectó la banda proteica correspondiente a la proteína de 26 kDa de intensidad importante, y en mucha menor medida las bandas proteicas de 21 y 29 kDa. La aplicación de los tratamientos térmicos indujo la acumulación de estas dos últimas proteínas, las cuales permanecieron aproximadamente constantes durante los diferentes períodos de muestreo. Por otra parte, la banda de 26 kDa permaneció constante y con intensidad similar a la de la cosecha durante la conservación. Respecto de las proteínas de alto PM (70 kDa), no fue posible lograr su visualización por la técnica de SDS-PAGE,

tanto en la cosecha como luego de aplicados los tratamientos térmicos, ni durante todo el período de conservación a ambas temperaturas evaluadas.

A fin de corroborar fehacientemente la presencia de las sHSPs, los extractos proteicos fueron analizados por la técnica de *Western blot*. La **Fig. 44** muestra este análisis para el caso de los extractos proteicos de pomelos sometidos al tratamiento HS48, los cuales fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h de aplicado el tratamiento térmico (P1₀) y quincenalmente durante la conservación a 2°C por un período de 75 días (P15₀, P30₀, P45₀, P60₀ y P75₀). La membrana fue revelada con el antisuero de conejo obtenido en nuestro laboratorio (HSPC1), a partir de una proteína de estrés mayoritaria de 21 kDa aislada de tomates *colt 45* sometidos a tratamiento térmico (Polenta, 2005).

Puede observarse en todos los casos (si bien en la cosecha la señal es muy tenue), la presencia de dos bandas proteicas que reaccionaron inmunológicamente con el anticuerpo policlonal (Ab-HSPC1). Los PM de estas dos proteínas, fueron estimados en 18.5 y 21 kDa respectivamente (señaladas con flecha). Una evaluación semicuantitativa por densitometría óptica de la intensidad de dichas bandas (datos no mostrados) permitió establecer que luego de 24 h (20°C) de aplicado el tratamiento térmico (P1₀) se indujo un aumento del 100% en la intensidad de estas bandas proteicas respecto de la cosecha. En cambio, durante la conservación a 2°C la señal detectada fue disminuyendo progresivamente hasta los 75 días de conservación (P75₀). El hecho que estas dos proteínas hayan sido inducidas por el tratamiento térmico aplicado, unido a que pudieron ser detectadas por el Ab-HSPC1, y considerando además sus bajos PMs, autorizan a sugerir que las mismas son miembros (inducibles por calor) correspondientes a la familia de las sHSPs.

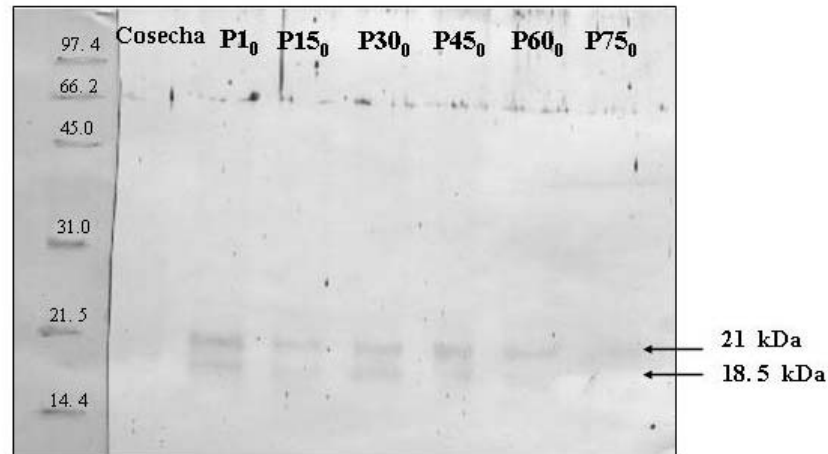


Figura 44. Análisis por *Western blot* de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” , sometidos al tratamiento HS48, durante la conservación a 2°C. Los frutos fueron analizados en la cosecha, 24 h de aplicado el tratamiento térmico (P1₀), y durante la conservación a 2°C por un período de hasta 75 días (M15₀, M30₀, M45₀, M60₀ y M75₀). La membrana fue revelada con el antisuero policlonal (Ab-HSPC1) obtenido contra una proteína de estrés de 21 kDa purificada de tomates sometidos a tratamiento térmico.

Los resultados obtenidos con los frutos de pomelos en el presente trabajo de tesis, concuerdan con lo informado en la bibliografía en cuanto a la inducción de proteínas de estrés de bajo PM obtenida por la aplicación de tratamientos térmicos. En este sentido, se observó tanto en los análisis de SDS/PAGE como en los de *Western blot*, que los cambios más notorios involucraron proteínas cuyos PM estaban comprendidos en el rango de los 21-30 kDa. Es importante destacar la detección de una banda de aproximadamente 26 kDa en todas las muestras analizadas, tanto en frutas recién cosechadas como en frutas tratadas, así como durante todo el periodo de conservación a ambas temperaturas evaluadas (2 y 9°C). Este hallazgo sugiere que la banda de 26 kDa correspondería a una proteína que se está expresando en forma constitutiva.

Es probable que las proteínas de bajo PM detectadas en los frutos de pomelo recién cosechados, en forma similar al caso de las mandarinas, hayan sido sintetizadas por haber experimentado situaciones de estrés en períodos previos al momento de la cosecha.

El patrón de síntesis de las proteínas inducidas por los tratamientos térmicos en pomelos es muy similar al obtenido en las muestras de mandarinas tratadas térmicamente, y similar también a los resultados discutidos previamente en la Sección 3.1.2.2. Como ya ha sido discutido previamente (resultado de mandarinas), el GT induce en vegetales la acumulación de HSPs con PM que varían en el rango de 21 y 100 kDa. Entre dichos vegetales pueden mencionarse las frutillas (Civello *et al.*, 1997), las manzanas (Ritenour *et al.*, 2001), las papayas (Paull & Chen, 1990), el maíz (Cooper & Ho, 1983) y el algodón (Burke *et al.*, 1985).

3.2.2.3 Cuantificación de las proteínas de estrés

Para la cuantificación de las HSPs inducidas por los tratamientos aplicados en pomelos, se optó también por el método inmunológico de *dot blot*, utilizándose los mismos reactivos y las etapas descritas en la Sección 3.1.2.3 correspondiente a mandarinas.

- **Cuantificación de las sHSPs**

La **Fig. 45** muestra el análisis por *dot blot* realizado sobre de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C), y sometidos a tratamiento térmico, evaluados durante la conservación a 2°C. En este análisis se utilizó como Ac primario, al antisuero de conejo Ab-HSPC1.

Los resultados indican que en los frutos C la intensidad de la señal obtenida durante la conservación a temperaturas inductoras de DF, permaneció relativamente constante durante todo el período evaluado. En los frutos sometidos al tratamiento HS24, luego de 24 h de aplicado (P1₀), se detectó un ligero incremento (1,4) de las sHSPs respecto de la cosecha (1,0). La máxima cantidad se detectó a los 15 días de conservación frigorífica (P15₀) siendo este valor de 1,7. A partir de este período la señal comienza a disminuir en forma lenta hasta llegar, luego de 75 días de conservación (P75₀), a valores similares a los obtenidos en la cosecha. En los frutos sometidos al tratamiento HS48 el aumento de la señal fue aún mas importante (2,3 veces respecto de la cosecha) luego de 24 h a TA (P1₀). Posteriormente, este valor fue disminuyendo en forma lenta durante la conservación hasta llegar a valores iguales a los obtenidos en la cosecha hacia el final de período analizado (P75₀).

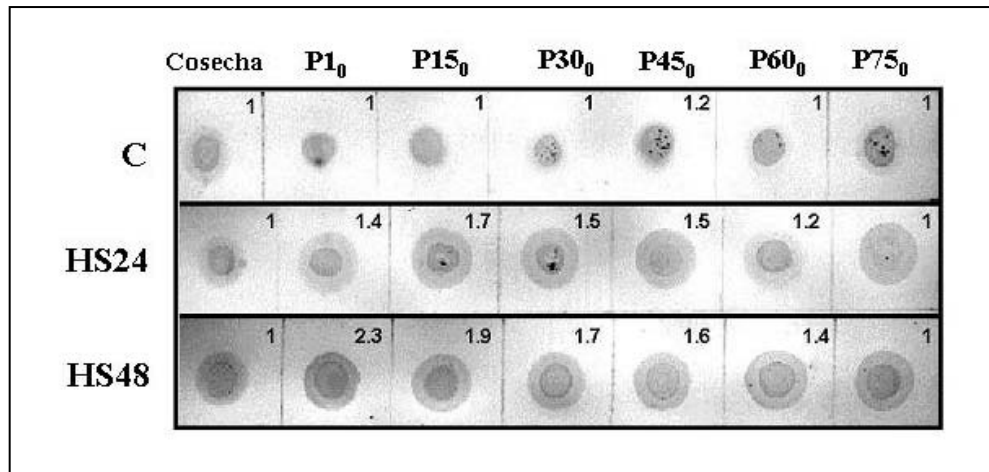


Figura 45. Análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh ” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS24 y HS48, durante la conservación a 2°C, y revelados con el Ab-HSPC1 (sHSPs). Los frutos fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h a 20°C (M1₀), y durante la conservación a 2°C por un período de hasta 75 días (M15₀, M30₀, M45₀, M60₀ y M75₀). Los números en el interior de cada cuadro indican cantidades de sHSP relativas a la cosecha. Los valores corresponden al promedio de dos mediciones.

Estos resultados corroborarían que efectivamente el tratamiento térmico es capaz de inducir la acumulación de miembros de esta familia de proteínas de estrés en forma proporcional a su intensidad, preparando al fruto para tolerar un almacenamiento a bajas temperaturas durante aproximadamente 75 días.

La **Fig. 46** muestra el análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de pomelos C y tratados térmicamente, durante la conservación a 9°C, revelados también con el Ab-HSPC1. Se observa en esta figura una disminución (valor de 0,6 en comparación con la cosecha) de la cantidad detectada de sHSPs luego de exponer a los frutos C a 20°C por 24 h (P1₀). El valor alcanzado en este momento se mantuvo aproximadamente constante hasta el final de la conservación (P75₀). En el tratamiento HS24, si bien se detectó recién a los 30 días de conservación (P30₀) un leve aumento en la cantidad de sHSPs (1,2 veces respecto de la cosecha), este aumento fue disminuyendo en los sucesivos períodos de muestreo hasta alcanzar valores de 0,5 al final de los ensayos (P75₀). En cambio, en el tratamiento HS48 se observó primero un aumento importante (2,4 veces respecto de la cosecha) al exponer los frutos tratados por 24 h a TA (P1₀). Luego, este valor disminuyó hasta un 50% a los 15 días de conservación (P15₀), y continuó descendiendo en los sucesivos períodos de muestreo hasta alcanzar valores inferiores a los obtenidos en

la cosecha. Estos resultados indicarían también que el efecto de la aplicación del calor es el de disparar la acumulación de HSPs (siendo este efecto más importante cuando la magnitud del calor entregado es mayor), acumulación que se iría reduciendo a esta temperatura de conservación (9°C) a medida que transcurre el tiempo. Como 9°C es una temperatura no inductora de DF, es probable que no sustente una mayor acumulación de sHSPs, y por lo tanto aquellas proteínas que fueron inducidas por calor se reducirían en el tiempo debido al recambio (“turnover”) proteico. En cambio, cuando el fruto es sometido, luego del tratamiento térmico, a un estrés continuo por frío (2°C) se observan los siguientes eventos. Cuando el tratamiento térmico es corto, la inducción de sHSPs es limitada, y luego de exponer los frutos 15 días a 2°C se logra una mayor acumulación. Por otro lado, cuando el estrés térmico es prolongado (HS48), se observa una acumulación más importante de estas proteínas, cantidad que se mantiene a niveles altos hasta los 30 días de conservación debido al estrés continuo por las bajas temperaturas de almacenamiento. Luego de este período, comienza la reducción a expensas de su función reparadora y/o del recambio proteico.

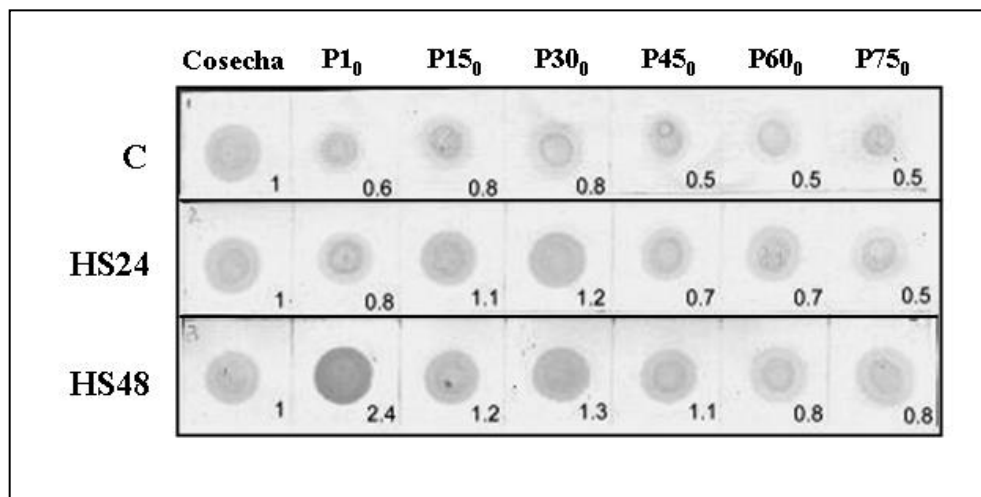


Figura 46. Análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh ” , control (C) y sometidos a los tratamientos HS24 y HS48, durante la conservación a 9°C, revelados con el Ab-HSPC1 (sHSPs). Los frutos fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h a 20°C (M1₀) y durante la conservación a 9°C por un período de hasta 75 días (M15₀, M30₀, M45₀, M60₀ y M75₀). Los números en el interior de cada cuadro indican cantidades de sHSP relativas al valor obtenido para los frutos recién cosechados. Los valores corresponden al promedio de dos mediciones.

- **Cuantificación de las HSP70**

Nuevamente, para corroborar fehacientemente los resultados que proponen los análisis de SDS-PAGE y *Western blot*, se optó por la cuantificación de las proteínas de estrés mediante la técnica de *dot blot*.

La **Fig. 47** muestra el análisis por *dot blot* realizado sobre extractos proteicos de pomelos C y tratados térmicamente, durante la conservación a 2°C. El revelado de estas membranas fue realizado utilizando el Ac monoclonal comercial anti-HSP70.

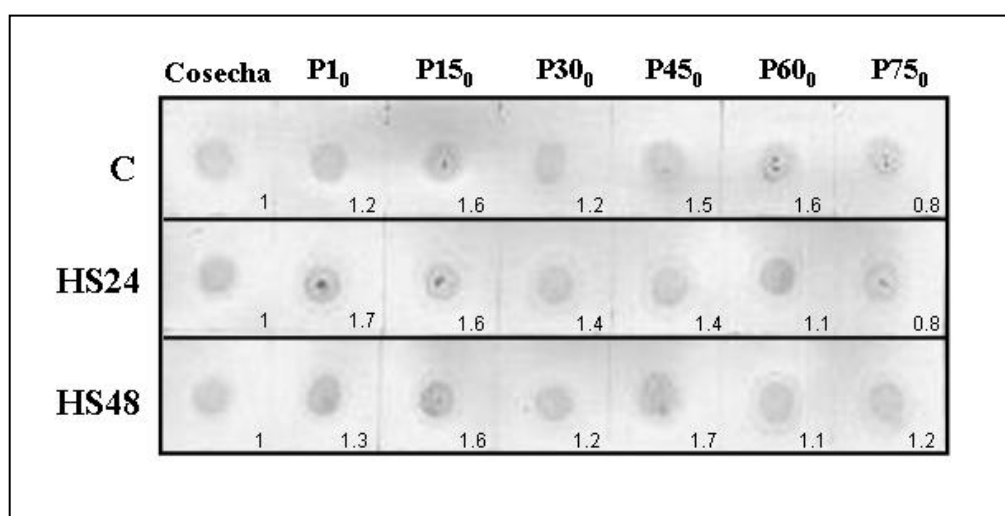


Figura 47. Análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C) y sometidos a los tratamientos HS24 y HS48, durante la conservación a 2°C, y revelados con el Ac-HSP70 comercial. Los frutos fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h a 20°C (M1₀) y durante la conservación a 9°C por un período de hasta 75 días (M15₀, M30₀, M45₀, M60₀ y M75₀). Los números en el interior de cada cuadro indican cantidades de sHSP70 relativas al valor obtenido para los frutos recién cosechados. Los valores corresponden al promedio de dos mediciones.

No se encontraron diferencias, en la cantidad de HSP70, entre la fruta control (C) y la sometida a los tratamientos térmicos durante la conservación a 2°C. En todos los casos analizados, tanto luego de la exposición de los frutos por 24 h a TA (P1₀) como durante la conservación a temperaturas inductoras de DF, la intensidad de las manchas en los frutos C, HS24 y HS48, permaneció relativamente constante durante el período evaluado. En el caso particular del tratamiento HS24, luego de la exposición de los frutos a TA por 24 h (P1₀), se observó un ligero aumento en la

cantidad de las HSP70. El valor alcanzado fue un 70% mayor de aquel medido en la cosecha. Sin embargo, a los 15 días de conservación frigorífica (P15₀), todos los tratamientos convergieron a un único valor (1,6 respecto de la cosecha). A partir de este momento las cantidades disminuyeron hasta alcanzar luego de 75 días de conservación, valores similares a la cosecha.

La **Fig. 48** muestra el análisis por *dot blot* realizado con los extractos proteicos de pomelos C y tratados térmicamente, durante la conservación a 9°C. Para el revelado de estas membranas también se utilizó el Ac monoclonal comercial anti-HSP70.

Los resultados indican que a esta temperatura de conservación tampoco se detectaron diferencias en la cantidad de HSP70, entre los frutos C y los tratados térmicamente. La cantidad detectada de HSP70 fue siempre similar a la de los frutos recién cosechados, siendo estos resultados similares a los obtenidos durante la conservación de 2°C.

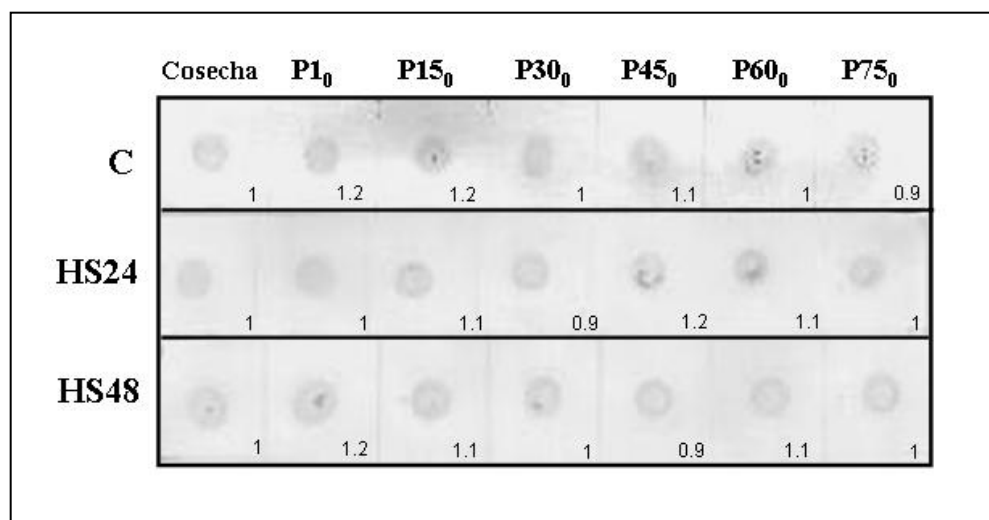


Figura 48. Análisis por *dot blot* de los extractos proteicos de pomelos “ Marsh” control (C) y sometidos a los tratamientos HS24 y HS48, durante la conservación a 9°C, y revelados con el Ac-HSP70 comercial. Los frutos fueron analizados en la cosecha, luego de 24 h a 20°C (M1₀) y durante la conservación a 9°C por un período de hasta 75 días (M15₀, M30₀, M45₀, M60₀ y M75₀). Los números en el interior de cada cuadro indican cantidades de sHSP relativas al valor obtenido para los frutos recién cosechados. Los valores corresponden al promedio de dos mediciones.

En el caso particular de las HSP70, estas proteínas no pudieron ser detectadas ni por la técnica de SDS/PAGE (Figs. 40-43) ni por la técnica de *Western blot*. Sin embargo, al utilizar la técnica de *dot blot* no solo fue posible identificarlas sino también cuantificarlas (Figs. 47 y 48). En la práctica, esta última técnica tiene la ventaja que requiere menos pasos, habida cuenta que las muestras de proteínas se siembran directamente sobre la membrana de nitrocelulosa. Esta característica metodológica facilitaría la detección de las HSP70, que podrían estar en baja proporción.

El resultado de los análisis inmunológicos (tanto *Western blot* como *dot blot*) refuerzan nuevamente el alto grado de reactividad cruzada existente entre las HSPs de distintas especies. De esta forma, las proteínas inducidas en pomelos reaccionaron tanto con el Ac policlonal obtenido contra la sHSPs purificada de tomates tratados térmicamente, como con el Ac monoclonal comercial obtenido contra una HSP70 de cerebro de vaca. Las sHSPs de plantas, si bien presentan una menor similitud estructural, todos los miembros de esta familia contienen la secuencia conservada de aproximadamente 100 aminoácido llamado “dominio α -cristalino” (ACD), localizado en el extremo C-terminal (Waters & Vierling, 1999; Ganea, 2001). En cuanto a la capacidad de estos anticuerpos de reaccionar con otras especies, Lund *et al.* (1998) identificaron y purificaron en maíz, dos proteínas (22 kDa) sintetizadas en respuesta al estrés térmico. Estos autores encontraron que la inyección individual de estas proteínas en ratones producía anticuerpos policlonales, los cuales eran capaces de reconocer a ambas proteínas con un alto grado de especificidad. Este resultado resultó ser similar al encontrado en el presente trabajo de tesis.

El hecho que existieran niveles basales de las sHSPs y de las HSP70, tanto en pomelos como en mandarinas recién cosechados podría relacionarse con la presencia de algunos miembros de estas familias que se expresan en forma constitutiva, o bien estos niveles basales podrían haber sido inducidos por algún tipo de estrés durante el desarrollo del fruto en la planta.

Respecto a las sHSPs en los frutos C, es interesante hacer notar el hecho de que la cantidad detectada de estas proteínas en la cosecha permaneció prácticamente

invariable durante la conservación a 2°C (**Fig. 45**). Desafortunadamente, estos niveles no serían suficientes para proteger los frutos ya que el lote mostró síntomas de DF a partir de los 30 días de conservación frigorífica (IDF ~ 0,05), llegando el nivel de daño a valores de 0,8 al cabo de 60 días de conservación. En cambio, los niveles de sHSP inducido por los tratamientos térmicos (HS24 y HS48) fueron mayores que los detectados en el C, siendo especialmente importante los niveles acumulados en los frutos sometidos al tratamiento térmico largo. Estos niveles permanecieron elevados durante la conservación frigorífica. Al analizar este último resultado en paralelo con la evaluación del daño fisiológico producido durante la exposición al frío, surge que los frutos tratados por calor mostraron una importante reducción de la incidencia de síntomas de DF. De esta forma, los pomelos sometidos al tratamientos HS24 presentaron valores de DF bajos (IDF = 0,2) a los 60 días de frigoconservación, mientras que los frutos sometidos al tratamiento HS48 no manifestaron ningún síntoma asociado con esta alteración durante todo el período analizado. Estos resultados constituyen, una fuerte evidencia de la relación existente entre la acumulación de las sHSPs y el desarrollo de la tolerancia al daño por frío.

Los niveles de sHSPs detectados durante la conservación a 9°C en los frutos C resultaron ligeramente inferiores a los de las sHSPs presentes en los frutos recién cosechados (**Fig. 46**). Contrariamente, los niveles detectados en los frutos sometidos al tratamiento térmico de 24 h (HS24) fueron ligeramente superiores a los de C. En forma similar, los frutos tratados por calor durante 48 h (HS48) respondieron incrementando de manera importante los niveles de estas proteínas luego de su aplicación. Durante la conservación, estos valores se aproximaron a los valores de los tratamientos C y HS24. Es interesante el hecho que aún cuando el tratamiento térmico largo fue más efectivo en inducir la acumulación de sHSP, el uso de una temperatura no inductora de DF (9°C) durante la conservación homogeneizó el efecto del tratamiento igualando los niveles de proteínas en todos los casos. Como era de esperar, no se detectaron síntomas asociados al DF en ninguno de los tratamientos durante la conservación a esta temperatura, ya que la misma está por encima del umbral de daño.

Los niveles basales de HSP70 detectados en la cosecha aumentaron sólo ligeramente en los frutos C durante la conservación a 2°C (**Fig. 47**). En los frutos

sometidos a tratamiento térmico durante 24 h y 48 h, se observa también un aumento ligero de las proteínas de estrés, sugiriendo que el tratamiento por sí mismo no fue capaz de inducir la acumulación de niveles adicionales de estas proteínas.

Durante la conservación a 9°C (**Fig. 48**), no se encontraron diferencias importantes en la cantidad de HSP70 entre los frutos recién cosechados, los frutos C y los tratados térmicamente, siendo estas cantidades similares luego de 60 días de conservación. Se estima también que el tratamiento *per se* no incrementó los niveles de estas proteínas y que la conservación a una temperatura no inductora de DF (9°C) no modificó la cantidad de HSP70 de los frutos C y los sometidos a GT.

Dado que las distintas familias de HSPs participan en forma cooperativa como parte de la respuesta adaptativa ante una situación de estrés, un análisis en forma conjunta de ellas permite obtener un panorama más detallado de esta respuesta. Así, dos familias de HSPs de plantas, las sHSPs y las HSP70, son de particular interés por la importante función que cumplen cada una de ellas frente a distintos tipos de estrés (Hamilton & Coleman, 2001). En el caso particular de las frutas, Sabehat *et al.* (1996) demostraron que tomates sometidos a tratamientos térmicos previo al almacenamiento a temperaturas inductoras del DF, provocaban la acumulación de tanto las HSP70 como de las sHSPs. Lurie *et al.* (1993) también encontraron que en tomates tratados por calor y luego conservados en frío, se inducía la síntesis de altos niveles del ARNm que codificaban para HSP70 y HSP17. La concentración de estas proteínas permanecía a altos niveles hasta los 21 días de conservación a 2°C. Entre las investigaciones en las que se analizó en forma conjunta distintas familias de HSPs se destaca la realizada por Hamilton & Coleman (2001) quienes utilizaron hojas de tabaco y evaluaron mediante Ac policlonales las concentraciones de HSPs de 21 kDa y la de 70 kDa. Los autores observaron que ambos tipos de proteínas se acumulaban ante la aplicación de distintas situaciones de estrés (tratamiento térmico, daño mecánico). Por otro lado, también se constataba un aumento en plantas expuestas a vapores de metil jasmonato, aunque no fueran expuestas a ninguna de las situaciones de estrés mencionadas. Este hecho sugiere que en la inducción de las HSPs participarían mediadores químicos, capaces de actuar a distancia, siendo el ácido jasmónico (AJ) el potencial encargado de esta función. Los jasmonatos son un grupo de reguladores del crecimiento recientemente investigados en plantas, que tienen la

capacidad de activar numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos –entre los que se encuentran la inducción de proteínas específicas (HSPs)– de una manera similar al efecto producido por el GT (Weidhase *et al.*, 1987). Los ensayos llevados a cabo por Hamilton & Coleman (2001), se basaron en resultados previos obtenidos en zucchini (Wang & Buta, 1994) y pomelos (Meir *et al.*, 1996), en los cuales se observó que los frutos que habían sido tratados previamente con bajas concentraciones de AJ y luego almacenados en frío manifestaban un marcado aumento de la tolerancia al frío.

Ha sido mencionado previamente la importancia práctica que la utilización de las HSPs posee en los estudios de monitoreo ambiental, sobre la base que su síntesis es inducida por la exposición a distintos tipos de estrés (Craig, 1985; Ali & Banu, 1991; Meir *et al.*, 1996; Hamilton & Coleman, 2001). Respecto de este punto de Pomerai (1996) argumenta que el estudio de una clase particular de HSPs, como indicador molecular, no provee de suficiente información ya que existe interrelación entre las funciones de las distintas familias. Bierkens (2000) coincide también en que el análisis combinado de varias clases de HSPs es más preciso para evaluar los mecanismos involucrados en la tolerancia al estrés. Así, teniendo en cuenta que no se encontraron en esta tesis diferencias en la cantidad acumuladas de HSP70 entre los frutos C y los tratados térmicamente, que en cambio se detectó un aumento importante en la señal de las sHSPs en estos últimos frutos, y que la aplicación de GT fue capaz de disminuir en forma importante los síntomas de DF (evaluaciones fisiológicas) en los frutos conservados a bajas temperaturas, podríamos afirmar que en pomelos “ Marsh” las proteínas responsables de la protección contra el DF durante la conservación a bajas temperaturas estarían relacionados con la familia de proteínas de bajo peso molecular.

La naturaleza conservada de las HSPs las hace útiles como marcadores moleculares de estrés, pudiendo estudiarse esta respuesta tanto a nivel del mensajero como de la proteína. El estudio a nivel de ARNm presentaría ciertas restricciones por el carácter transiente de la molécula, consecuentemente estos niveles estarían reflejando sólo una exposición a corto plazo (Sanders, 1993). En contraste, las HSPs una vez inducidas permanecen elevadas por un período largo, por

lo que el análisis de estas proteínas se presenta como más ventajoso que el de los transcritos. En este sentido, es importante destacar que para evaluar de manera precisa los niveles de HSPs es indispensable disponer de Ac específicos. Respecto a este punto, Sanders *et al.* (1994) en un estudio extensivo compararon la reactividad cruzada de diferentes Ac mono y policlonales, concluyendo que los Ac policlonales son más versátiles que los monoclonales para investigaciones ambientales que involucran el estudio de un amplio rango de especies. Un estudio similar fue llevado a cabo por Dunlap & Matsumura (1997), los cuales produjeron un Ac policlonal contra la región más conservada de la secuencia de aminoácidos de las HSP70. Este Ac reaccionó en forma cruzada contra proteínas inducidas por calor que poseían un rango de PM de 65 a 82 kDa, obteniendo respuestas similares en una amplia variedad de especies (peces, sapos, calamar, plantas de arroz). En el presente trabajo de tesis, en forma similar, con técnicas altamente específicas que incluyeron tanto anticuerpo monoclonales como policlonales, permitieron la determinación de la cantidad de proteínas de estrés inducida por los tratamientos aplicados. En consecuencia, se propone la cuantificación de proteínas de estrés como método para controlar o prevenir la aparición de desórdenes poscosecha en frutos cítricos, así como evaluar la intensidad del tratamiento de estrés aplicado, presentándose esta tecnología como altamente promisorio para la realización de estudios tecnológicos, fisiológicos y moleculares que permitan desarrollar estrategias para reducir la incidencia de daño por frío.

Alternativas más actuales, se basan en el aislamiento y en la identificación de los genes involucrados en la respuesta de los frutos cítricos al estrés, de modo de establecer fehacientemente cuáles son los responsables de este tipo de desórdenes (Pons *et al.*, 2005; González-Candelas *et al.*, 2005, Sapitnitskaya *et al.*, 2006). El escaneo exhaustivo de bibliotecas de ADNc obtenidas a partir de frutos sometidos a diferentes condiciones de estrés permitirá entender el complejo proceso metabólico involucrado en la respuesta al estrés, y podrá en un futuro cercano ser la base para el desarrollo de nuevos métodos que aseguren la calidad de la fruta mediante la reducción de las alteraciones fisiológicas poscosecha (Lafuente & Zacarías, 2006).

3.2.3 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO EN POMELOS

Los resultados obtenidos en la segunda parte del trabajo, en donde se evaluó el efecto de la aplicación de los tratamientos térmicos sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos de los frutos de pomelos, permiten arribar a las siguientes conclusiones:

✓ La evaluación del parámetro h° indicó que los tratamientos aplicados no produjeron un efecto notorio sobre el color de los pomelos, ni inmediatamente después de su aplicación ni durante la conservación a 2°C. En cambio, durante la conservación a 9°C, el efecto de los tratamientos térmicos sobre los frutos fue el de retrasar la evolución del color.

✓ Los tratamientos térmicos produjeron una relativamente baja deshidratación de los frutos tanto durante el período de conservación como durante la simulación de la comercialización. El porcentaje de deshidratación fue proporcional a la intensidad del tratamiento aplicado.

✓ Los parámetros relacionados con el sabor (SST, AT, IM) no fueron modificados por el efecto de los tratamientos, ni por las posteriores temperaturas de conservación.

✓ Los tratamientos térmicos utilizados redujeron la incidencia del DF durante la conservación a 2°C en forma proporcional a la intensidad del tratamiento aplicado. El tratamiento HS48 fue el más efectivo en controlar el desarrollo de DF dado que solo se detectaron frutos con esta alteración al final del período de simulación de la comercialización, siendo este índice prácticamente despreciable ($IDF \cong 0,1$).

✓ Durante la conservación a 2°C, el porcentaje de podredumbres en los frutos nunca superó el valor de 4% en ninguno de los tratamientos ensayados. En cambio a la temperatura de conservación de 9°C, la fruta fue más susceptible al ataque de microorganismos, particularmente en los frutos que fueron luego sometidos a la temperatura de simulación de la comercialización.

✓ La utilización de técnicas electroforéticas e inmunológicas permitió evaluar la cantidad de HSPs acumulada por la aplicación de GT. Se detectaron diferencias en la cantidad sHSPs presente en los extractos de frutos control y tratados térmicamente.

✓ La inducción de sHSPs por efecto del tratamiento de calor unida a la reducción del daño producido por las bajas temperaturas permite establecer una relación entre la respuesta generada por el tratamiento térmico y la mayor resistencia de los frutos cítricos al daño por frío. La ausencia de inducción de las HSP70 por efecto del tratamiento térmico sugiere que la familia de las proteínas de estrés de bajo peso molecular sería una de las responsables de la resistencia al DF.

✓ La ausencia de alteraciones fisiológicas en frutos sometidos al tratamiento térmico apoyan la elección de estos tratamientos para reducir el daño ocasionado por las bajas temperaturas.

4. CONCLUSIONES GENERALES

La tecnología poscosecha de frutas y hortalizas ha ido evolucionando con los avances tecnológicos en respuesta a la creciente exigencia de los consumidores en cuanto a la disponibilidad de productos en distintas épocas del año y a la calidad integral de los mismos. Por otra parte, en los últimos años se ha puesto un especial énfasis en el uso de tecnologías que eviten el empleo de compuestos químicos y respeten el medio ambiente. El control de la temperatura es una de las principales herramientas utilizadas para reducir el deterioro poscosecha de frutas y hortalizas ya que es sabido que las bajas temperaturas son capaces de disminuir la actividad enzimática y microbiana, reducir el ritmo respiratorio y retardar la maduración. Sin embargo, la mayoría de los frutos cítricos, por ser de origen subtropical, son susceptibles a las bajas temperaturas de almacenamiento, pudiendo manifestar luego de la conservación una serie de desordenes fisiológicos conocidos genéricamente con el nombre de daños por frío. La aplicación de tratamientos por altas temperaturas constituye una alternativa promisoría para evitar o prevenir el desarrollo de estos síntomas y prolongar la vida útil de las frutas. Sin embargo, gran parte de las investigaciones realizadas hasta la fecha en cuanto al uso de los mismos para reducir el daño por frío en frutos cítricos, ha sido mayoritariamente empírica utilizándose fundamentalmente variables fisiológicas para la evaluación de los resultados. Un problema surgido a partir de este enfoque es que no se conocen con suficiente profundidad aquellos fundamentos bioquímicos capaces de explicar los resultados obtenidos por la aplicación de los tratamientos térmicos, lo que limita la posibilidad de optimizar los mismos sobre bases racionales. El presente trabajo de tesis ha puesto de manifiesto la gran importancia que tiene el conocimiento de los fenómenos bioquímicos que se produce en los frutos sometidos a tratamientos térmicos, y posteriormente conservados a bajas temperaturas, destacándose las ventajas de la utilización de algunos de estos parámetros bioquímicos para la optimización de los tratamientos a aplicar. Los resultados obtenidos evidencian la complejidad de la respuesta de los frutos cítricos al estrés, lo que hace difícil su estudio como un fenómeno único.

En los ensayos se utilizaron frutos de mandarinas “ Nova” y pomelos “ Marsh” , como modelo experimental para la caracterización de la evolución del daño por frío durante el almacenamiento a bajas temperaturas. La comparación de los resultados de ambos modelos permitió demostrar que, a pesar de su conocida susceptibilidad al desarrollo de las lesiones de DF, cada especie presentó un comportamiento particular que dependió de la interacción con el medio ambiente. Este comportamiento diferencial destaca la importancia de la realización de ensayos en forma local, no siendo aconsejable basarse únicamente en la información bibliográfica. Esto puede verse claramente en el caso de las mandarinas “ Nova” , las cuales no manifestaron el desarrollo de síntomas de daño por frío en frutos no tratados, incluso cuando fueron conservados a temperaturas altamente inductoras de esta alteración. Si bien fue comprobada la acumulación de proteínas de estrés en respuesta a la aplicación de los tratamientos térmicos, al no manifestar los frutos “ control” síntomas de DF, no fue posible correlacionar de manera concluyente dicha acumulación con el efecto protector de los tratamientos térmicos.

En cambio, en el caso de los pomelos “ Marsh” , en los cuales se logró inducir la aparición de daño por frío en los frutos control, se comprobó la efectividad de los tratamientos térmicos en reducir la sintomatología asociada a esta alteración y pudo correlacionarse además la efectividad de los tratamientos con la acumulación de proteínas de estrés. Esta acumulación, especialmente de las HSPs de bajo PM (sHSPs), se produjo de manera rápida, manteniéndose a niveles elevados durante la posterior conservación a bajas temperaturas. En consecuencia, se postula que la cantidad de sHSPs acumulada podría ser utilizada en estos frutos como un indicador de la intensidad del tratamiento o de la continuidad del efecto protector. Es importante destacar, que la aplicación de los tratamientos térmicos que controlaron con éxito el DF, no modificaron las características de calidad de los frutos.

Desde el punto de vista evolutivo, se destaca el hecho de que se logró utilizar con éxito anticuerpos policlonales obtenidos a partir de una proteína mayoritaria inducida por estrés en tomates tratados térmicamente. Estos anticuerpos fueron capaces de reconocer diversas proteínas de estrés de bajo PM en ambos frutos, mandarinas y pomelos. De la misma manera, anticuerpos monoclonales comerciales

obtenidos contra una HSP70 de cerebro de vaca permitieron el reconocimiento de esta familia de proteínas en los cítricos mencionados.

Desde el punto de vista analítico, la utilización de los dos anticuerpos mencionados previamente permitió desarrollar métodos inmunológicos simples basados en las técnicas de *Western blot* y *dot blot* para detectar y/o cuantificar las HSPs generadas por los tratamientos de estrés aplicados. En el caso particular de las sHSPs, resulta altamente promisorio el hecho de haberse comprobado su utilidad como variable de monitoreo, resultando la técnica de *dot blot* la más conveniente por su simpleza y rapidez, y por permitir la cuantificación de todos los miembros de esta familia. Este resultado es sin duda el punto de partida para la realización de investigaciones futuras destinadas a desarrollar nuevos métodos, simples y fáciles, que permitan ajustar de manera precisa la intensidad de los tratamientos por calor.

Se desprende también de los estudios realizados, la importancia de optimizar ciertos aspectos tecnológicos relacionados con la aplicación de los tratamientos por altas temperaturas, teniendo en cuenta que si bien ellos demostraron ser efectivos para inducir una respuesta protectora, su aplicación en forma prolongada puede provocar una excesiva deshidratación de la fruta, disminuyendo en consecuencia el peso de la misma y ocasionando alteraciones en la calidad de los frutos. Un ejemplo de esta situación es lo que se observó en las mandarinas “ Nova” , en las cuales el tratamiento térmico no provocó cambios en la calidad interna de los frutos, sin embargo, las pérdidas de peso al final del período de estudio fueron superiores a las esperadas. Este inconveniente se subsanaría, en estudios futuros, evaluando otras alternativas, como por ejemplo la reducción de la intensidad de los tratamientos aplicados evaluando distintas combinaciones tiempo-temperatura, o el uso de otro tipo de tratamiento térmico, como por ejemplo inmersión en agua caliente. Estos últimos presentarían una mayor eficiencia termodinámica en la transferencia de calor, reduciendo en consecuencia los tiempos de aplicación. En el caso concreto de los pomelos “ Marsh” , los dos tratamientos térmicos aplicados aumentaron la pérdida de peso de los frutos en forma proporcional a la duración de los mismos, no siendo su incidencia tan importante como en mandarinas.

En consecuencia, para desarrollar un “ tratamiento térmico” adecuado para su aplicación en frutos cítricos, es de vital importancia tener en cuenta tanto los

efectos beneficiosos como los perjudiciales. Un tratamiento optimizado se logrará a través de un “ balance” , en el cual se deben incluir diversas variables como la sensibilidad del fruto al DF, el tiempo de exposición a las bajas temperaturas, los tiempos y temperaturas de exposición al calor y la metodología para la exposición de los frutos al calor.

A través del diseño y ejecución de los diferentes ensayos, del desarrollo de distintas técnicas de laboratorio y del análisis de los resultados, se logró cumplir de manera satisfactoria con los objetivos propuestos en el plan inicial del trabajo de tesis. Los resultados obtenidos y las metodologías desarrolladas constituyen una importante base para realizar investigaciones futuras con miras a establecer en forma más precisa la relación existente entre la intensidad de los tratamientos térmicos aplicados y el desarrollo de la protección contra alteraciones como el DF. La aplicación de este tipo de tratamientos a nivel industrial en galpones de empaque tendrá sin dudas un impacto económico de gran relevancia en los frutos cítricos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ABBOT, J.A. (1999). Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, **15**(3): 201–207.
- ABDI, N.; Holford, P. & McGlasson, B. (2002). Application of two-dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stonefruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **26**: 1–13.
- ACEDO, A.L. Jr.; Akinaga, T. & Tanabe, T. (2004). Inhibition of chilling injury and quality changes in pineapple fruit prestorage heat treatment. *J. Food, Agric. Env.*, **2**: 81–86.
- ALI, N. & Banu, N. (1991). Heat shock proteins: molecular chaperones. *Biochem. Education*, **19**(4): 167–172.
- ALFEREZ, F.; Sala, J.M.; Sanchez-Ballesta, M.T.; Mulas, M.; Lafuente, M.T. & Zacarias, L. (2005). A comparative study of the postharvest performance of fan ABA-deficient mutant of oranges. I. Physiological and quality aspects. *Postharvest Biol. Technol.*, **37**: 222–231.
- ANDERSON, J.V.; Li, Q.B.; Haskell, D.W. & Guy, C.L. (1994). Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol.*, **104**: 1359–1370.
- ARTES, F. (1999). Innovaciones tecnológicas para mejorar la calidad de la naranja y mandarina en la postrecolección. IV Congreso Citricultura. La Plana. Edit. Promocines LAV. pp: 181–205.
- BALDWIN, E.A. (1993). Citrus fruit. Chapter 4. In: *Biochemistry of Fruit Ripening*. Eds: Seymour, G., Taylor, J. & Tucker, G. Published in 1993 by Chapman & May, London. pp: 107–149.
- BARRACLOUGH, D.; Obenland, D.; Laing, W. & Carroll, T. (2004). A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples. *Postharvest Biol. Technol.*, **32**: 175–181.
- BARROS, M.D.; Czarnecka, E. & Gurley, W.B. (1992). Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant. Mol. Biol.*, **19**: 665–675.
- BEN-YEHOSHUA, S.; Peretz, J.; Rodov, V. & Naffusi, B. (2000). Postharvest application of hot water treatment in citrus fruits: The road from laboratory to the packing-house. *Acta Hort.*, **518**:19–28.
- BEN-YEHOSHUA, S.; Shapiro, B & Moran, R. (1987). Individual packaging enables the use of curing at high temperatures to reduce decay and heal injury of citrus fruits. *HortScience*, **22**(5): 777–783.

- BIERKENS, J.G.E.A. (2000). Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*, **153**: 61–72.
- BLACKSTOCK, W.P. & Weir, M.P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *TRENDS Biotechnol.*, **17**, 121–127.
- BOSTON, R.S.; Viitanen, P.V. & Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.*, **32**: 191–222.
- BOWLER, C. & Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *TRENDS Plant. Sci.*, **5**: 241–246.
- BRACKETT, R.E. (1999). Incident, contribution factors, and control of bacterial pathogens on produce. *Postharvest Biol. Technol.*, **15**: 305–312.
- BRODL, M.R. (1989). Regulation of the synthesis of the normal cellular proteins during heat shock. *Physiologia Plantarum*, **75**: 439–443.
- BROWN, G.E. (1986). Diplodia stem-end rot, a decay of citrus fruit increased by ethylene degreening treatment and its control. *Proc. Florida State Hort. Soc.*, **99**: 105–108.
- BURDON, J.; Lallu, N.; Yearsley, C.; Osman, S.; Billing, D. & Boldingh, H. (2007). Postharvest conditioning of Satsuma mandarins for reduction of acidity and skin puffiness. *Postharvest Biol. Technol.*, **43**: 102–114.
- BURKE, J.J.; Hatfield, J.K.; Klein, R.R. & Mollet, J.E. (1985). Accumulations of heat shock proteins in field grow cotton. *Plant Physiol.*, **78**: 394–398.
- CHIRICO W.; Waters, M. & Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, **332**: 805–810.
- CIVELLO, P.; Martínez, G.A.; Chávez, A.R. & Añón, M.C. (1997). Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 4589–4594.
- COLLINS, G.G.; Nie, X. & Saltviet, M.E. (1995). Heat shock proteins and chilling sensitivity of mung bean hypocotyls. *J. Exp. Bot.*, **46**: 795–802.
- COOPER, P. & Ho, T.D. (1983). Heat shock proteins in maize. *Plant Physiol.*, **71**: 215–222.
- COUEY, H. M. (1989). Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. *HortScience*, **24**(2): 198–202.
- CRAIG, E.A. (1985). The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **18**(3):239–280.

- CUQUERELLA, J. (1997). Técnicas y prácticas de desverdización de cítricos producidos en condiciones mediterráneas. *Phytoma España*, **90**: 106–110.
- CUQUERELLA, J.; Saucedo, C.; Martínez-Jávega, J.M. & Mateos, M. (1990). Influencia de la temperatura y envoltura plástica en la conservación de mandarina Fortune. Congreso Nacional Soc. Esp. Hort. 2, Puerto de la Cruz, Tenerife, España. pp: 410–416.
- DAVIES, F.S. & Albrigo, L.G. (1994). Citrus. CAB International, Wallingford, UK. pp: 254.
- DEL RÍO, M.A., Cuquerella, J. & Ragone, M.L. (1992). Effects of postharvest curing at high temperature on decay and quality of “ Marsh” grapefruits and “ Navel” oranges. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **3**: 1081–1083.
- de POMERAI, D.I. (1996). Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. *Human and Experimental Toxicology*, **15**: 279–285.
- DUNLAP, D.Y. & Matsumura, F. (1997). Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70s as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **37**: 238–244.
- ECKERT, J.W. & Eaks, I.L. (1989). Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: *The Citrus Industry*. Eds. Reuther, W.; Calavan, E.C. & Carman, G.E., Vol. V, University of California, Div. Agr. Nat. Resour. Publications, Oakland, CA, pp: 179–260.
- ECKERT, J.W. & Ogawa, J.M. (1988). The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruit, berries, vegetables and root/tuber crops. *Ann. Rv. Phytopathol.*, **26**: 433–469.
- ELLIS, R.J. (1990). The molecular chaperone concept. *Semin. Cell. Biol.*, **1**: 1–9.
- ERKAN, M.; Pekmezci, M. & Wang, C.Y. (2005). Hot water and curing treatments reduce chilling injury and maintain post-harvest quality of “ Valencia” oranges. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **40**: 91–96.
- FALLIK, E. (2004). Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). *Postharvest Biol. Technol.*, **32**: 125–134.
- FALLIK, E.; Grinberg, S.; Alkalai, S.; Yekutieli, O.; Wiseblum, A.; Regev, R.; Beres, H. & Bar-Lev, E. (1999). A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper. *Postharvest Biol. Technol.*, **15**: 25–32.
- FIDLER, J.C. (1968). Low temperature injury to fruits and vegetables. *Recent Adv. Food Sci.*, **4**: 271–283.

- FINK, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, **79**(2): 425-449.
- FLORISSEN, P.; Ekman, J.S.; Blumenthal, C.; McGlasson, W.B.; Conroy, J & Holford, P. (1996). The effects of short heat-treatments on the induction of chilling injury in avocado fruit (*Persea Americana* Mill). *Postharvest Biol. Technol.*, **8**: 129-141.
- FRYDMAN, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**: 603-647.
- GANEA, E. (2001). Chaperone-like activity of α -crystalline and other small heat shock proteins. *Current Protein and Peptide Science*, **2**: 205-225.
- GARACIA, J.M.; Aguilera, C. & Albi, M.A. (1995). Postharvest heat treatment in Spanish strawberry (*Fragaria x Ananassa* cv. Tudla). *J. Agric. Food. Chem.*, **43**: 189-1492.
- GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; Sánchez-Torres, P.; Alamar, S.; Establés, B.; Ballester, A.R.; Sánchez-Ballesta, M.T.; Lluch, Y.; Gosalbes, M.J.; Granell, A.; Zacarias, L.; Marcos, J.F. & Lafuente, M.T. (2005). Genomic approaches to postharvest biotic and abiotic stresses of citrus fruit. *Acta Horticulturae*, **682**: 247-251.
- GRAHAM, D. & Patterson, B. (1982). Responses of plant to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**: 347-372.
- GRIERSON, W. (1981). Physiological disorders of citrus fruits. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **2**: 764-767.
- GRIERSON, W. & Hatton, T.T. (1977). Factors involved in storage of citrus fruits: a new evaluation. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1**: 227-231.
- GUARDIOLA, J.L. (1992/93). Maduración, calidad del fruto, alteraciones. Publicación Master en citricultura. Universidad Politécnica de Valencia (U.P.V.) e Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A.). Valencia, España.
- GUERRA, F. (1996). Tecnología poscosecha de frutos cítricos. Curso integral de citricultura. Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical. pp: 242-257.
- GUIDI, S.M.; Grigioni, G. & Pensel, N.A. (2000). Standard for quality assay for certain citrus fruits for use in the food industry (Protocolo redactado a pedido de AFINOA (Asociación Fitosanitaria del Noroeste Argentino) para ser presentado en MAFF- Ministerio de Agricultura, Forestación y Pesca de Japón - en el marco del convenio INTA - AFINOA 1999. pp 70.
- GURLEY, W.B. & Key, J.L. (1991). Transcriptional regulation of the heat shock response: a plant perspective. *Biochem.*, **30**(1): 1-12.

- GUY, C.L. & Li, Q.B. (1998). The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene families. *Plant Cell*, **10**: 539-556.
- HAIR, J.F.; Anderson, R.E.; Tatham, R.L. & Black, W.C. (1999). Análisis discriminante múltiple y regresión logística. En: Análisis multivariante. Ed: Prentice Hall, Madrid. pp: 249-323.
- HALE, M.G. & Orcutt, D. (1987). The physiology of plants under stress. Wiley, J. & Sons, New York. pp: 206.
- HAMILTON III, E.W. & Coleman, J.S. (2001). Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuate* (Solanacea) when distant leaves are stressed. *Am. J. Bot.*, **88**(5): 950-955.
- HAMILTON III, E.W. & Heckathorn, S.A. (2001). Mitochondrial adaptations to sodium chloride: Complex I is protected by anti-oxidants and small Heat-shock proteins, while Complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology*, **126**: 1266-1274.
- HARDENBURG, R.E.; Watada, A.E. & Wang, C.Y. (1990). The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. Agricultural Handbook. 66. Ed. USDA. Washington. pp: 130.
- HARTL, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**: 571-580.
- HATTON, T.T. & Cubbedge, R.H. (1982). Conditioning Florida grapefruit to reduce chilling injury during low-temperature storage. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **107**(1): 57-60.
- HATTON, T.T. & Cubbedge, R.H. (1983). Preferred temperature for prestorage conditioning of "Marsh" grapefruit to prevent chilling injury at low temperatures. *HortScience*, **18**(5): 721-722.
- HOBSON, G. & Grierson, D. (1993). Tomato. In: Biochemistry of fruit ripening. Eds: Seymour, G.B; Taylor, J. & Tucker, G. Chapman & Hall. London, UK. pp: 403-442.
- HONG, S.-I.; Lee, H.-H. & Kim, D. (2007). Effects of hot water treatments on the storage stability of Satsuma mandarin as a postharvest decay control. *Postharvest Biol. Technol.*, **43**(2): 271-279.
- HURKMAN, W. & Tanaka, C. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.*, **81**: 802-806.
- IASCAV (Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal) (1993). Reglamentaciones de frutas frescas cítricas para el mercado interno y la exportación. SAGPyA. pp: 76.
- INABA, M. & Chachin, K. (1988). Influence of recovery from high-temperature stress on harvested mature green tomatoes. *HortScience*, **23**: 190-192.

- ISMAIL, M.A. & Zhang, J. (2004). Postharvest citrus disease and their control. *Outlooks on Pest Management*, **2**: 29–35.
- JACOBI, K.K. & Giles, J.E. (1997). Quality of “ Kensington” mango (*Mangifera indica* L.) fruit following continued vapor heat disinfestations and hot water disease control treatments. *Postharvest Biol. Technol.*, **12**: 285–292.
- JIMENEZ-CUESTA, M.; Cuquerella, J. & Martínez-Jávega, J.M. (1981). Determination of a color index for citrus degreening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 3526–3530.
- JIMENEZ-CUESTA, M.; Martínez-Jávega, J.M. & Cuquerella, J. (1983). Plastic individual sear-packaging of Spanish fruit. XV International Congress of Refrigeration. Commision C2. pp: 460–466.
- KADER, A. (1992). Quality and safety factors: definition and evaluation for fresh horticultural crops. In: Postharvest technology of horticultural crops. Ed.: Kader, A. University of California. Pub. 3311. pp: 185–189.
- KADER, A. & Arpaia, M.L. (2002). Postharvest handling systems: subtropical fruit. In: Postharvest Technology of Horticultural Crops. Ed: Kader, A. Oakland, California. pp: 233–240.
- KADYRZHANOVA, D.K.; Vlachonasios, K.E.; Ververidis, P. & Dilley, D.R. (1998). Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display. *Plant Mol. Biol.*, **36**: 885–895.
- KATO, T. & Kubota, S. (1978). Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruits and changes in their activities during maturation. *Physiol. Plant*, **42**: 67–72.
- KAYS, S.J. (1991). Postharvest physiology of perishable plant products. Van Nostrand Reinhold. New York. pp: 532.
- KEY, J.L.; Lin, C.Y. & Chen, Y.M. (1981). Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**(6): 3526–3530.
- KIMPEL, J.A. & Key, J.L. (1985). Presence of heat shock mRNAs in field grown soybeans. *Plant Physiol.*, **79**: 672–678.
- KINGSTON, R.E. (1990). In: Hormonal Control of Genes Regulation. Eds: Foulkes, G. & Cohen, P. Elsevier Science Publishing Co., New Cork, in press.
- KLEIN, J.D & Lurie, S. (1990). Prestorage heat treatments as a means of improving poststorage quality of apples. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **115**: 265–269.
- KLEIN, J.D. & Lurie, S. (1991). Postharvest heat treatment and fruit quality. *Postharvest News & Info*, **2**: 15–19.

- KLEIN, J.D. & Lurie, S. (1992). Heat treatments for improved postharvest quality of horticultural crops. *HortTechnology*, **2**(3): 316-320.
- 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.
- KNIGHT, C.A. & Ackerly, D.D. (2001). Correlated evolution of chloroplast heat shock protein expression in closely related plant species. *Am. J. Botany*, **88**(3): 411-418.
- KRISHNAN, H.B. & Pueppke, S. (1987). Heat shock triggers rapid protein phosphorylation in soybean seedling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**: 762-767.
- KRISHNAN, M; Nguyen, H.T. & Burke, J. (1989). Heat shock protein synthesis and thermal tolerance in wheat. *Plant Physiol.*, **90**: 140-145.
- KUUN, K.; Okole, B. & Bornmann, L. (2001). Protection of phenylpropanoid metabolism by prior heat treatment in *Lycopersicon esculentum* exposed to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol. Biochem.*, **39**: 871-880.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-684.
- LAFUENTE, M.T.; Martinez Tellez, M.A. & Zacarias, L. (1997). Abscisic acid in response of "Fortune" mandarins to chilling. Effects of maturity and high-temperature conditioning. *J. Sci. Food Agric.*, **73**: 248-254.
- LAFUENTE, M.T & Zacarias, L. (2006). Postharvest physiological disorders in citrus fruit. *Stewart Postharvest Review*, **2** (1): 12-20.
- LAY-YEE, M.; DellaPenna, D. & Ross, G. (1990). Changes on mRNA and protein during ripening in apple fruit (*Malus domestica* Borkh. Cv Golden Delicious). *Plant Physiol.*, **94**: 850-853.
- LAY-YEE, M. & Rose, K.J. (1994). Quality of "Fantasia" nectarines following forced-ir heat treatments for insect disinfestations. *HortScience*, **29**: 663-666.
- LEE, G.J.; Roseman, A.M.; Saibil, H.R. & Vierling, E (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO Journal*, **16**: 659- 671
- LEOPOLD, A.C. & Kriedemann, P.E. (1975). Plant growth and development. Ed: McGraw Hill, 2 Nova York. pp: 16-34.
- LEVITT, J. (1980). Responses of plant to environmental stresses. Vol I, 2nd ed. Academic, New York.
- LINDQUIST, S. (1981). Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature*, **294**: 311-314.

- LINDQUIST, S. (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**: 1151-1191.
- LINDQUIST, S. & Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, **22**: 631-677.
- LOWRY, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- LUCHSINGER, L. & Artés, F. (2000). Alleviating chilling injuries in stone fruit. In: Improving postharvest technologies for fruits, vegetables and ornamentals. Edit. Intern. Institute of Refrigeration. Eds : Artés, F.; Gil, M.I. & Cinesa, M.A. II: 474-479.
- LUI, F.W. (1978). Modification of apple quality by high temperature. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **103**: 730-732.
- LUND, A.; Blum, P.; Bhatramakki, D. & Elthon, T. (1998). Heat-stress response of maize mitochondria. *Plant Physiol.*, **116**: 1097-1110.
- LURIE, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.*, **14**: 257-269.
- LURIE, S. & Klein, J.D. (1990). Heat treatment of ripening apples: differential effects on physiology and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, **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.; Watkins, C.; Ross, G.; Boss, P. & Ferguson, I.F. (1993). Prestorage heat treatment of tomatoes prevents chilling injury and reversibly inhibits ripening. *Acta Horticulturae*, **343**: 283-285.
- LYONS, J.M. (1973). Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**: 445-466.
- LYONS, J.M. & Breidenbach, R.W. (1987). Chilling Injury. In: Postharvest Physiology of vegetables. Eds: Weichmann, J. & Dekker, M. New York. pp: 305-326.
- MARCELLIN, P. & Ulrich, R. (1983). Compartment des fruits et legumes en conditions modules et programmees. *Int. Journal of Refrigeration*, **6**: 329-336.
- MARTÍNEZ-JAVEGA, J.M. (1996). Manejo en frío: Conservación y transporte de frutos cítricos. 1ª Reunión Internacional de Postcosecha y Mercados Cítricos. FAO-RIAC. Concordia (Argentina). pp: 73-81.
- MARTÍNEZ-JAVEGA, J.M. (1997). La frigoconservación en naranjas y mandarinas. *Rev. Phytoma*, **90**: 136-140.

MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M. (1999). Uso de las bajas temperaturas para exportación de frutas cítricas españolas. Simposio Internacional “ Exigencias cuarentenarias para la exportación de frutas tropicales y subtropicales” . Eds: Alves, R.E. & Veloz, CS. Fortaleza, Brasil. pp: 127-141.

MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M. (2002). Estado actual de las aplicaciones del frío en la poscosecha de cítricos. Actas del I Congreso Español de Ciencia y Técnicas del frío. Eds: López, A.; Esnoz, A. y Artés, F. pp: 433-442.

MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M.; Cuquerella, J. & Navarro, P. (1991). Influencia de la temperatura de conservación y condiciones de almacenamiento en la calidad final de mandarina Nova. III World Congress Food Technology. Barcelona, España. Abstracts. pp: 62.

MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M & Del Río, M.A. (1998). Desórdenes fisiológicos en postcosecha. Libro: Manejo Postcosecha de frutas y verduras en Iberoamérica. Ed: Baez, R. CYTED-RITEP, pp: 57-62.

MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M.; Del Río, M.A.; & Mateos, M. (1992). Influence of storage temperature and coating in the keeping quality of “ Fortune” mandarin. *Proc. Int. Soc. Citric.*, **3**: 1102-1103.

MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M.; Mateos, M. & Navarro, P. (1987). Factors affecting chilling injury of citrus fruits. Proc. III Congress of Food Technology. Barcelona, España. III. 1419-1427.

MAZZUZ, C.F. (1996). Calidad de Frutos Cítricos. Manual para su Gestión desde la Recolección hasta la Expedición. Reus. Ed. Horticultura.

MAZZUZ, C.F. & Del Río, M.A. (1997). Aplicación del análisis sensorial al control de calidad de frutos cítricos sometidos a tratamientos cuarentenarios. Workshop “ Medición de la calidad en frutos tropicales y subtropicales con tratamientos de cuarentena” . CYTED. Proyecto XI.10. Eds: Saucedo, C. y Martínez-Jávega, J.M. pp: 16-28.

McCOLLUM, T.G.; D`Aquino, S.D. & McDonald, R.E. (1993). Heat treatments inhibit mango chilling injury. *HortScience*, **28**: 197-198.

McCORNACK, A.A. (1972). Effect of ethylene degreening on decay of Florida citrus fruit. *Citrus Ind.*, **53**: 14-15.

McGUIRE, R.G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, **27**: 1254-1255.

MEIR, S.; Philosopg-Hadas, S.; Lurie, S.; Droby, S.; Akerman, M.; Zauberman, G.; Shapiro, B.; Cohen, E. & Yorman, F. (1996). Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Can. J. Bot.*, **74**: 870-874.

- MIERNYK, J. (1997). The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *TRENDS Plant Sci.*, **2**(5): 180–187.
- MILIONI, D. & Hatzopoulos, P. (1997). Genomic organization of Hsp90 gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, **35**: 955–961.
- MILLER, W.R. & McDonald, R.E. (1991). Quality of stored “ Marsh” and “ Ruby Red” grapefruit after high-temperature, forced air treatment. *HortScience*, **266**: 1188–1191.
- MILLER, W.R. & McDonald, R.E. (1992). Postharvest quality of early season grapefruit after forced-air vapor heat treatment. *HortScience*, **27**: 422–424.
- MINOLTA. (1988). Precise color communication. Color control from feeling to instrumentation. Folleto.
- MITTLER, R. (2002). Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. *TRENDS Plant Sci.*, **7**: 405–410.
- MULAS, M.; Lafuente, M.T & Zacarias, L. (1996). Chilling effects on fatty acids composition of flavedo lipids in stored “ Fortune” mandarins. *Advances in Hort. Sci.*, **2**: 85–90.
- MUNSELL, A.H. (1966). Munsell Book of Color. MacBeth Color and Photometry. Kollmorgen Corporation, Newburgh, New York.
- MURAKAMI, T.; Matsuba, S.; Funatsuki, H.; Kawaguchi, K.; Saruyama, H.; Tanida, M. & Sato, Y. (2004). Over-expression of a small heat shock protein, sHSP17.7, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants. *Mol. Breeding*, **13**: 165–175.
- MURATA, T. (1977). Studies on the postharvest storage of citrus fruit (VIII). Acid metabolism in Satsuma mandarin fruit during storage. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, **46**(2): 283–287.
- NORDBY, H.E. & McDonald, R.E. (1991). Relationship of epicuticular wax composition of grapefruit to chilling. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 957–962.
- ORTIZ, C. & Cardemil, L. (2001). Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J. Exp. Botany*, **52**(361): 1711–1719.
- OUGHAM, H.J. & Howarth, C.J. (1988). Temperature shock proteins in plants. In: Plants and temperature. Eds: Long, S.P. & Woodward, F.I. Cambridge: The Company of Biologists Limited. pp: 259–280.
- PARKIN, K.L.; Maragoni, A.; Jackman, R.L.; Yada, R.Y. & Stanley, D.W. (1989). Chilling injury. A review of possible mechanisms. *J. Food Biochem.*, **13**: 127–153.

- PARSELL, D.A. & Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damage proteins. *Ann. Rev. Genet.*, **27**: 437-496.
- PARSELL, D.A.; Kowal, A.S.; Singer, M.A. & Lindquist, S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hsp 104. *Nature*, **372**: 457-478.
- PAULL, R.E. (1990). Postharvest heat treatments and fruit ripening. *Postharvest News & Info*, **1**: 355-363.
- PAULL, R.E. & Chen, N.J. (1990). Heat shock response in field grown ripening papaya fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **115**: 623-631.
- PAULL, R.E. & Chen, N.J. (2000). Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.*, **21**: 21-37.
- PECK, S.C.; Nühse, T.S.; Hess, D.; Iglesias, A.; Meins, F. & Boller, T. (2001). Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylates in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell*, **13**: 1467-1475.
- PLAZA, P.; Sanbruno, A.; Usall, J.; Lamarca, N.; Torres, R.; Pons, J. & Viñas, I. (2004). Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of Clementine mandarins. *Postharvest Biol. Technol.*, **34**: 29-37.
- POLENTA, G.A. (2005). Tesis Doctoral. Aspectos fisiológicos y bioquímicos del uso de tratamientos de estrés para mejorar la conservación de frutas. FFyB, UBA.
- PONS, C; Royo, C.; Forment, J.; Gadea, J.; Kanellis, A.; Zacarias, L.; Lafuente, M.T. & Granell, A. (2005). A customized microarray and its use in postharvest studies in *Citrus*. *Acta Horticulturae*, **682**: 225-229.
- PORAT, R.; Pavoncello, D.; Peretz, J.; Ben-Yehoshua, S. & Lurie, S. (2000a). Effects of various heat treatments on the postharvest qualities of “ Star Ruby” grapefruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **18**: 159-165.
- PORAT, R.; Pavoncello, D.; Peretz, J.; Weiss, B; Daus, A.; Cohen, L.; Ben-Yehoshua, S.; Dorby, S. & Lurie, S. (2000b). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* and chilling injury in “ Star Ruby” grapefruit by a short hot rinse and brushing treatment. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, **75**: 428-432.
- PORAT, R. (2004). Reduction of chilling injury disorders in citrus fruit. In: Crop management and postharvest handling of horticultural products. Vol. IV. Diseases and disorders of fruits and vegetables. Eds: Dris, R. & Niskanen, R. New Delhi, India: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. pp: 225-236.
- PRATT, H.K. (1975). The role of ethylene in fruit ripening, Factures et régulation de la maturation des fruits. Centre National de La Recherche Scientifique, Anatole, France. pp: 153-60.

- RAISON, J.K. (1985). Alterations in the physical properties and thermal response of membrane lipids: correlations with acclimation to chilling injury and high temperature. Eds: John, J.B.St.; Berlin, E. & Jackson, P.C. Beltsville Symposium in Agricultural Research, Vol. 9. Rowman and Allanheld, N.J. pp: 383-401.
- RENSING, S.A. & Maier, U.G. (1994). Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *J. Mol. Evol.*, **39**: 80- 86.
- RHODES, M.J. (1971). The climacteric and ripening of fruits, In: The biochemistry of fruits and their products food science and technology 1: A series of monograph. Ed: Hulme, A.C., Academic Press London and New York. pp: 333-373.
- RITENOUR, M.; Kochhar, S.; Schrade, L.; Tsui-Ping, H. & Ku, M. (2001). Characterization of heat shock expression in apple peel under field and laboratory condition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **126**(5): 564-570.
- ROBERTSON, D.; Mitchell, G.; Gilroy, J.; Gerrish, C.; Bolwell, P. & Slabas, A. (1997). Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins for plants. *J. Biol. Chem.*, **272**: 15841-15848
- SABEHAT, A; Weiss, D. & Lurie, S (1996). The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiol.*, **110**: 531-547.
- SABEHAT, A; Lurie, S & Weiss, D. (1998). Expression of small heat shock proteins at low temperatures. *Plant Physiol.*, **117**: 651-658.
- SAGPyA (2004). Producción de cítricos en la Argentina. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Economía Agropecuaria. Dirección de Agricultura. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>
- SALA, J.M. (1998). Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold stored mandarin fruits. *Postharvest Biol. Technol.*, **3**: 255-261.
- SALA, J.M. & Lafuente, M.T. (1999). Catalase in the heat induced chilling tolerance of cold stored hybrid “ Fortune” mandarin fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 2410-2414.
- SALA, J.M. & Lafuente, M.T. (2000). Catalase enzyme activity related to tolerance of mandarin fruit to chilling. *Postharvest Biol. Technol.*, **20**: 81-89.
- SALUNKHE, D.K.; Bolin, H. & Reddy, N. (1991). Storage, processing and nutritional quality of fruits and vegetables. 2nd Ed. Vol. II: Processed fruits and vegetables. CRC Press. pp: 195.
- SALVEIT (Jr), M.E. & Cabrera, R.M. (1987). Tomato fruit temperature before chilling influences ripening after chilling. *HortScience*, **22**: 452-454.

- SALVEIT (Jr), M.E. & Morris, L.L. (1990). Overview on chilling injury of horticultural crops. In: *Chilling Injury of horticultural crops*. Ed: Wang, C.Y. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp: 3-15.
- SAMSON, J.A. (1986). Citrus. In: *Tropical Fruits*. 2nd Ed. Longman Group UK. Ltd., Essex, UK. pp: 73-138.
- SANDERS, B.M. (1993). Stress-proteins in aquatic organism: An environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**: 49-75.
- SANDERS, B.M.; Martin, L.S.; Nakagawa, P.A.; Hunter, D.A.; Miller, S. & Ullrich, S.J. (1994). Specific cross-reactivity of antibodies raised against two major stress-proteins, stress 70 and chaperonin 60, in diverse species. *Env. Toxicol. Chem.*, **13**: 1241-1249.
- SANTONI, V.; Rouquie, D.; Dumas, P.; Mansion, M. Boutry, M. ; Degand, H. ; Dupree, P.; Packman, L.; Sherrier, J.; Prime, T.; Bauw, G.; Posada, E.; Rouze, P.; Dehais, P.; Sahnoun, I.; Barlier, I. & Rossignol, M. (1998). Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J.*, **16**: 633-641.
- SAPERS, G.M. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods. *Food Technol. Biotechnol.*, **39**: 305-311.
- SAPITNITSKAYA, M.; Maul, P.; McCollum, G.T.; Guy, C.L. & Weiss, B. (2006). Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduce chilling injuries in grapefruit. *J. Exp. Botany*, **57**: 2943-2953.
- SCHIRRA, M. & Ben-Yehoshua, S. (1999). Heat treatments: a possible new technology in citrus handling—challenges and prospects. In: *Advances in Postharvest Diseases and Disorders of Citrus Fruits*. Ed: Schirra, M. Trivandrum: Research Signpost. pp: 133-147.
- SCHIRRA, M.; Mulas, M.; Fadda, A. & Cauli, E. (2004). Cold quarantine responses of Blood oranges to postharvest hot water and hot air treatments. *Postharvest Biol. Technol.*, **31**: 191-200.
- SCHLESINGER, M.J. (1990). Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, **265**(21): 12111-12114.
- SCHÖFFL, F & Key, J.L. (1982). An analysis of mRNAs for a group of heat shock proteins of soybean using cloned cDNAs. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**: 301-314.
- SCHÖFFL, F.; Prandl, R. and Reindl, A. (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.*, **117**: 1135-1141.
- SHELLIE, K.C. & Mangan, R.L. (1998). Navel orange tolerance to heat treatments for disinfecting Mexican fruit fly. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **123**: 288-293.

- SHEWFELT, R.L. (1986). Postharvest treatment for extending the shelf life of fruits and vegetables. *Food Technol.*, **40**(5): 70-89.
- SHEWFELT, R.L. (1993a). Measuring quality and maturity. In: Postharvest handling: a system approach. Eds: Shewfelt, R. & Prussia, S. Academic Press Inc. pp: 99-124.
- SHEWFELT, R.L. & Erickson, M.E. (1991). Role of lipid peroxidation in the mechanism of membrane-associated disorders in edible plant tissue. *TRENDS in Food Sci. Technol.*, **2**: 152-154.
- SHEWFELT, R.L. & Prussia, S. (1993). Challenges in handling fresh fruits and vegetables. In: Postharvest handling: a system approach. Eds: Shewfelt, R. & Prussia, S. Academic Press Inc. pp: 27-41.
- SORGER, P. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, **65**: 363-366.
- STORTI, R.V.; Scott, M.P.; Rich, M & Pardue, M.L. (1980). Translational control of protein synthesis in response to heat shock protein in *D. melanogaster* cells. *Cell*, **22**: 825-834.
- STOTT, D.I. (1989). Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Methods*, **119** (2): 153-187.
- THAI, C. (1993). Modeling quality characteristics. In: Postharvest handling: a system approach. Eds: Shewfelt, R. & Prussia, S. Academic Press Inc. pp: 167-186.
- TISSIERES, A.; Mitchell, H.K. & Tracy, U. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophyla melanogaster*, relation to chromosome puffs. *J. Biol. Chem.*, **84**(3): 389-398.
- VÁZQUEZ, D.E.; Meier, G.E. & Ponte, M. (2003). Comportamiento poscosecha de frutos de mandarina Nova en almacenamiento frigorífico prolongado. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, **5**: 16-25.
- VIERLING, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. and Plant Mol. Biol.*, **42**: 579-620.
- VITANEN, P.; Schmidt, M.; Buchner, J.; Suzuki, T.; Vierling, E.; Dickson, R.; Lorimer, G.; Gatenby, A. & Soll, J. (1995). Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins. *J. Biol. Chem.*, **270**(30): 18158-18164.
- VOSS, D.H. (1992). Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society color chart. *HortScience*, **27**: 1256-1260).
- WANG, C.Y. (1984). Combined treatment of heat shock and low temperature condition reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharvest Biol. Technol.*, **4**: 64-73.

- WANG, C.Y. (1990). Alleviation of chilling injury of horticultural crops. In: Chilling injury of Horticultural Crops. Ed: Wang, C.Y. Boca Raton, Florida, USA. pp: 281-302.
- WANG, C.Y. (1993). Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Horticultural Review*, **15**: 63-95.
- WANG, C.Y. (1994). Chilling injury of tropical Horticultural Commodities. *HortScience*, **29**(9): 986-988.
- WANG, C.Y. (2000). Postharvest techniques for reducing low temperature injury in chilling-sensitive commodities. In: Improving Postharvest Technologies for Fruits, Vegetables and Ornamentals. Edit. Intern. Institute of Refrigeration. Eds: Artés, F.; Gil, M.I. & Conesa, M.A. II: 467-473.
- WANG, C.Y. & Buta, J.G. (1994). Methyl jasmonate reduces chilling injury in *Cucurbita pepo* through its regulation of abscisic acid and polyamine levels. *Environ. Exp. Bot.*, **34**: 427-432.
- WANG, W.X.; Vinocur, B.; & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, **218**: 1-14.
- WANG, W.X.; Vinocur, B.; Shoseyov, O. & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS Plant Science*, **9**(5): 244-252.
- WATERS, E.R.; Lee, G.J. & Vierling, E. (1996). Evolution structure and function of the small heat shock protein in plants. *J. Exp. Bot.*, **47**: 325-338.
- WATERS, E.R. & Vierling, E. (1999). The diversification of plant cytosolic small heat shock protein preceded the divergence of mosses. *Mol. Biol. Evol.*, **16**(1): 127-139.
- WATKINS, C.B.; Bramalage, W.J. & Cregoe, B.A. (1995). Superficial scald of "Granny Smith" apples in expressed as a typical chilling injury. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **120**: 88-94.
- WATKINS, C.B.; Burmeister, D.M.; Elgar, H.J. & Liu, F.W. (1997). A comparison of two carbon dioxide-related injuries of apple fruit. In: Proceedings of 70th International Controlled Atmosphere Research Conference, U.C. Davis, July 13-18, Vol. 2 (Apples and Pears), pp: 119-124.
- WHEATON, T.A. & Stewart, I. (1973). Optimum temperature and ethylene concentrations for postharvest development of carotenoid pigments in citrus. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **98**: 337-340.
- WEBER, D.C & Skillings, J.H. (2000). A first course in the design of experiments. A linear models approach. CRC Press. pp: 680.

WEIDHASE, R.A.; Kramell, H.M.; Lechmann, J.; Libéis, H.W.; Lerbs, W. & Partiré, B. (1987). Methyl jasmonate-induced changes in polypeptide patterns of senescing barely leaf segments. *Plant Sci.*, **51**: 177-186.

WILKINS, M.; Sanchez, J.; Gooley, A.; Appel, R.; Humprey-Smith, I.; Hochstrasser, D. & Williams, K. (1996). Progress with proteome project: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **13**: 19-50.

WILLS, R.; McGlasson, B.; Graham, D. & Joyce, D. (1998). Postharvest 4th Ed. An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals. UNSW Press, Australia. pp: 143.

YAMAZAKI, T. & Suzuki, K. (1980). Color charts: useful guide to evaluate the fruit maturation. I. Colorimetric specifications of color charts for Japanese pear, apple, peach, grape, kaki and citrus fruits. *Bull. Fruit. Tree Res. Sta. Ser. A.*, **7**: 19-44.

ZHANG, J.; Huang, W.; Pan, Q. & Liu, Y. (2005). Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment. *Postharvest Biol. Technol.*, **38**: 80-90.