

(S1-O109)

REDUCCIÓN DEL DAÑO POR FRÍO EN GRANADA TRATADA CON POLIAMINAS ANTES DEL ALMACENAMIENTO EN FRÍO

DANIEL VALERO⁽¹⁾, PEDRO JAVIER ZAPATA⁽¹⁾, FABIÁN GUILLÉN⁽¹⁾,
DOMINGO MARTÍNEZ-ROMERO⁽¹⁾, MARÍA SERRANO⁽²⁾

⁽¹⁾Dept. Tecnología Agroalimentaria, ⁽²⁾Dept. Biología Aplicada
Escuela Politécnica Superior de Orihuela (Universidad Miguel Hernández)
Ctra. Beniel, Km 3.2, 03312 Orihuela (Alicante), Spain
E-mail: daniel.valero@umh.es. Tfn: 966749743; Fax: 966749677

Palabras clave: firmeza – calidad – color – vida útil

RESUMEN

Con el objetivo de reducir los daños por frío en granada almacenada a 2°C se realizaron tratamientos con putrescina (Put) y spermidina (Spd) bajo infiltración a vacío. Los frutos no tratados desarrollaron rápidamente síntomas de daño por frío que se manifestaron por el pardeamiento de la piel, el incremento en la salida de electrolitos y la pérdida de peso. Al mismo tiempo, se observó pérdidas de firmeza y color e incrementos en la tasa de respiración e índice de madurez. Todos estos cambios fueron significativamente retrasados en los frutos tratados. La reducción de los daños por frío se correlacionó con el mayor nivel de poliaminas endógenas en la piel, lo que podría ser considerado como un mecanismo de defensa y adaptación de la granada a las bajas temperaturas.

REDUCTION OF CHILLING INJURY IN POMEGRANATE TREATED WITH POLYAMINES BEFORE COLD STORAGE

Keywords: firmness – quality – colour – shelf life

ABSTRACT

With the aim of reduce chilling injury in pomegranate fruit stored at low temperature (2°C), putrescine (Put) or spermdine (Spd) at 1 mM under pressure-infiltration were applied. Non-treated fruit developed rapidly chilling injury, with main symptoms being skin browning, increased electrolyte leakage and weight loss. In addition, during storage losses of firmness and colour and increases in soluble solids concentrations/acidity ratio and respiration rate were observed. The reduction in chilling injury severity was correlated with increased levels of free endogenous Put and Spd in the skin, which could be considered as a mechanism of protection and acclimation of pomegranate to cold temperatures.

INTRODUCCIÓN

La granada (*Punica granatum* L.) está catalogada como una fruta no climatérica, y a pesar de tener una baja tasa de respiración (Ben-Arie et al., 1984) es un producto altamente perecedero. Para prolongar la vida útil, el almacenaje a bajas temperaturas es por lo tanto necesario para evitar una desecación excesiva y aparición de podredumbres. Sin embargo, las granadas almacenadas por debajo de 5°C desarrollan daños por frío, siendo los síntomas más

comunes: picados en la superficie, escaldado superficial y pardeamiento de la piel (Elyatem and Kader, 1984). Dependiendo de la duración del almacenaje estos síntomas pueden alcanzar la semilla, lo cual deprecia tanto la calidad interna como la externa de la fruta. Para reducir la aparición de daños por frío en las granadas se han utilizado diversos medios, incluyendo atmósferas controladas y modificadas, calentamientos intermitentes (Artés et al., 1996; 1998; 2000), y recubrimientos (Nanda et al., 2001).

El desarrollo de daños por frío implica cambios en la fase de transición de la membrana induciendo efectos de deterioro en los tejidos con un incremento de la permeabilidad de la membrana por la alteración de los lípidos y de las proteínas. Además, se han descrito aumentos en las concentraciones de la poliaminas (Bouchereau et al., 1999), aunque no está claro aún si este aumento en las poliaminas es el resultado del stress por el frío o es un mecanismo de protección frente a los daños por frío. Así, se ha descrito que la putrescina actúa como protector del estrés por frío en las plantas de tomate (Kim et al., 2002), mientras la espermidina previno los daños por frío en pepino (Shen et al., 2000) y calabacín (Martínez-Téllez et al., 2002). Además, el papel protector de las poliaminas ha sido también descrito en otros tipos de estrés tales como daños mecánicos (Valero et al., 2002) o salinidad (Chattopadhyay et al., 2002).

Según la bibliografía consultada, no hay referencias disponibles sobre el papel de la aplicación de poliaminas exógenas en la granada, ni en el posible papel para la reducción de los daños por frío ni en sus niveles endógenos. Así, el objetivo de este trabajo es el estudio de la aplicación de putrescina y espermidina exógenas mediante infiltración a vacío, en la calidad de la fruta almacenada a temperaturas de daños por frío. El pardeamiento de la piel, la pérdida de peso, firmeza de la fruta, tasa de respiración, salida de electrolitos, color y la relación °Brix/ acidez, serán evaluados después de diversos periodos almacenaje frío y posterior vida útil a 20°C. Además, la modificación de las poliaminas endógenas libres debido a tratamientos y su papel en los daños por frío serán discutidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal y tratamientos

Las granadas (*Punica granatum* L. cv. Mollar Elche) fueron recolectadas en Noviembre del 2005 de una finca situada en Orihuela (Alicante). La fruta se recolectó cuando estaba completamente madura de acuerdo con la práctica comercial e inmediatamente se llevaron al laboratorio. Las granadas con defectos (quemaduras, roturas, magulladuras y cortes en la cáscara) fueron descartadas. La fruta resultante fue colocada de forma aleatoria y dividida en tres lotes de 125 frutos para la realización de los tratamientos por quintuplicado (cada réplica contenía 25 frutos). Los lotes se trataron bien con Putrescina 1 mM, Espermidina 1mM o con agua destilada, la cual sirvió como control. Los tratamientos se realizaron por infiltración a vacío de acuerdo con trabajos previos (Serrano et al., 2003), aplicando una presión de 0.05 bares durante 4 minutos. La fruta se dejó secar antes del almacenaje al día siguiente a 2°C (considerado día 0) en una cámara frigorífica con temperatura controlada, en una oscuridad permanente y con una humedad relativa del 90%. Después de 0, 15, 30, 45 y 60 días, 25 frutos para cada tratamiento (5 de cada réplica) fueron muestreados y posteriormente almacenados a 20°C durante 3 días (vida útil). El pardeamiento externo, pérdida de peso, firmeza, tasa de respiración y color se midieron en la fruta intacta. Entonces, cada fruto se cortó por la mitad (zona ecuatorial), se separó la piel y la semillas de forma manual, se congelaron en N₂ líquido, se molieron y se almacenaron a -20°C hasta la realización de las determinaciones analíticas. La salida de electrolitos y poliaminas se

analizaron en la piel, mientras que los °Brix y la acidez titulable se determinaron en las semillas o arilos.

Evaluación del pardeamiento y determinación de la salida de electrolitos

El pardeamiento externo de la piel se midió de acuerdo con el porcentaje de superficie de piel afectada por síntomas de pardeamiento.

Para determinar la proporción de salida de electrolitos, se usó el método descrito McCollum y McDonald (1991). Para cada fruto, se cortaron seis discos (10mm) de tejido de piel ($1:50 \pm 0.02$ g). Se midió la conductividad después de 4 horas de incubación en 25 ml de manitol 0.4 M con un medidor de conductividad de Crison (Basic 30, Crison Instruments, S.A) Después, los viales se introdujeron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos y se midió la conductividad otra vez para determinar los electrolitos totales. La salida de electrolitos se expresó como la relación iniciales/finales x 100, y los resultados fueron la media \pm error estándar (EE).

Pérdida de peso y determinación de la tasa de respiración

El peso de cada réplica se registró tras el tratamiento (día 0) y la fecha de las diferentes muestras. Las pérdidas de peso acumulativas se expresaron como la media \pm EE del porcentaje de pérdidas del peso original.

La tasa de respiración se midió en cada fruto individualmente colocándolos en un tarro de cristal de un litro cerrado herméticamente durante una hora. Un mL de la atmósfera creada por la fruta fue retirado con una jeringuilla, y se cuantificó el CO₂ usando un cromatógrafo de gases ShimadzuTM 14 A (Kyoto, Japón), con un detector de conductividad térmico y una columna 5 A red 80-100 (Carbosieve SII. Supelco Inc., Bellefonte, USA), de dos metros de longitud y 3 mm i.d. La temperatura del horno fue de 50°C y 110°C la del inyector. El Helio se utilizó como gas portador con una proporción de flujo de 50 mL/min. Los resultados fueron la media \pm EE de 2 determinaciones para cada fruto expresados como nmol CO₂ kg⁻¹ h⁻¹.

Parámetros de calidad de la fruta

El color se determinó usando el Sistema Hunter Lab en un colorímetro Minolta modelo CR 200 (Minolta Camera Co., Japan). Los resultados fueron la media \pm EE de 2 determinaciones para cada fruto de cinco réplicas y expresado como el parámetro L*.

La firmeza se registró individualmente usando una sonda plana acoplada en un analizador de textura TX-XT2i (Stable Microsystem, UK). Se midió el diámetro y luego se aplicó una fuerza que alcanzara un 1% de deformación en el diámetro de la fruta y los resultados fueron la media \pm EE de las determinaciones en cada fruto, expresados en N/mm.

La concentración total de sólidos solubles (°Brix) se determinó en zumo obtenido de cada fruto con un refractómetro digital Atago (Atago Co. Ltd., Japan) a 20°C, los resultados fueron la media \pm EE expresados en porcentaje. El pH de zumo se registró, entonces se determinó acidez titulable mediante valoración potenciométrica con NaOH hasta pH 8.1, usando 1 ml de zumo diluido en 25 ml de agua destilada. Los resultados fueron la media \pm EE expresados como gramos de ácido málico por 100 gramos de peso fresco. La proporción entre °Brix y la acidez titulable fue también calculada.

Análisis de Poliaminas

Para cada réplica, se extrajo un gramo de tejido fresco con 10 ml de ácido perclórico frío al 5%. Se añadió 1,6 hexanodiamina (100 nmol/g) como estándar interno. El homogeneizado fue entonces centrifugado durante 30 minutos a 20000 x g. Se tomaron 2 ml del sobrenadante se utilizaron para determinar las poliaminas libres mediante una benzoilación y los derivados se analizaron con un HPLC de acuerdo con un trabajo previo

(Serrano et al., 2003). El sistema de elución consistió de una disolución de MeOH/H₂O, con un flujo de 0.8 ml/min. Las poliaminas fueron eluidas a través de una columna de fase reversa (LiChroCart 250-4.5µm) y detectadas mediante absorbancia de 254 nm. Para la cuantificación se usó la 1,6 hexanodiamina como estándar interno y curvas estándar que cubrieron el rango de 1 a 320 nM. Las curvas de calibrado fueron $y = 10.66 x + 170$, $r^2 = 0.94$ para putrescina, $y = 10.19 x - 39.96$, $r^2 = 0.96$ para espermedina, $y = 11.52 x - 4.32$, $r^2 = 0.90$ para espermina.

Análisis estadísticos

Los datos para las determinaciones analíticas fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA). Las fuentes de variación fueron almacenaje y tratamiento. Las comparaciones medias se realizaron usando HSD el test de Tukey para examinar si las diferencias eran significativas para $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico de Windows SPSS 12.0. Las regresiones lineales se realizaron entre varios parámetros usando el Sigmaplot 9.0 de Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hay muchos factores que afectan a la apariencia de la granada, entre los que se incluyen pérdida de agua, daños mecánicos, podredumbres y presencia de desordenes fisiológicos como los daños por frío. La pérdida de agua se acelera con el almacenaje a temperaturas superiores a 5°C y a esta temperatura la presencia de podredumbres es muy común. Así, el uso de temperaturas frías es necesario para prolongar el periodo de almacenamiento, aunque los problemas de daño por frío sucedan.

De hecho, las granadas control desarrollaron daños por frío cuando se almacenaron a 2°C sucediéndose los síntomas y agravándose éstos a medida que el tiempo de almacenaje avanzaba. Los síntomas se manifestaron como pardeamiento de la piel (Figura 1), aumento de la salida de electrolitos y de la tasa de respiración, y pérdida de luminosidad (Tabla 1). Así mismo, los frutos control mostraron mayores pérdidas de peso (17%) mientras que los tratados perdieron un 13% al final del almacenamiento.

Los síntomas de daños por frío se consideran como la mayor limitación en el almacenamiento y comercialización de la granada y en el caso de la fruta control la vida útil estimada fue de 30 días a 2°C + 3 días a 20°C. Todos estos síntomas se redujeron significativamente en fruta tratada con Put o Spd, con una eficacia similar para ambas poliaminas, y la vida útil pudo extenderse hasta 60 días de almacenamiento frío + 3 días a 20°C. Se ha comprobado que bajo condiciones de daños por frío, se dan cambios en los lípidos de la membrana de la célula desde un estado líquido cristalino hasta un estado de gel sólido en el tejido de las plantas, lo que lleva a un aumento de la permeabilidad de la membrana y salida de iones (Stanley, 1991; Gómez Galindo et al., 2004). Además, se ha propuesto un mecanismo de adaptación o aclimatación al frío por el incremento del grado de instauración de los lípidos de la membrana, el cual está considerado como un factor crítico para mantener la integridad de la célula bajo condiciones de congelación (Campos et al., 2003).

En este sentido, las granadas control no consiguieron desarrollar este mecanismo de adaptación ya que se produjeron síntomas los daños por frío. De hecho se ha encontrado que la composición de lípidos de la membrana cambia durante el almacenamiento, con pérdidas significativas en ácidos grasos saturados e insaturados (Mirdehghan et al., 2006). Por el contrario, la aplicación de putrescina o espermidina parece inducir a un mecanismo de aclimatación al frío, lo que lleva a un mantenimiento de la fluidez de la membrana a bajas temperaturas de almacenamiento, y podría ser la responsable de la menor salida de electrolitos y pardeamiento de la piel, y así se redujo la severidad de los síntomas de daños por frío. Así,

los tratamientos con poliaminas redujeron el deterioro de la membrana y la peroxidación de lípidos en cultivos sensibles de arroz, demostrando el papel protector de Put y Spd en la integridad de la membrana (Tiburcio et al., 1994; Chattopadachay et al., 2002). Durante la senescencia de melones, el tratamiento con poliaminas demostró una menor peroxidación de los lípidos de la membrana y una mayor retención de clorofila (Lester, 2000). Además la mayor tasa de respiración encontrada en las granadas tratadas con poliaminas que en la fruta control el día 0 (después de 24h de tratamiento previo al almacenaje en frío) podría ser otro mecanismo de aclimatación como ha sido observado en el pepino (Erez et al., 2002). Durante el almacenamiento de la granadas control, se obtuvieron descensos en la firmeza de la fruta y el parámetro L^* de color, y aumentos en la pérdida de peso, la tasa de respiración, y la proporción °Brix/acidez (índice de madurez). Estos cambios, los cuales están asociados con la aceleración del proceso de maduración, fueron significativamente retrasados después de aplicaciones exógenas de Put o Spd. Así los tratamientos con Put y Spd, y debido a sus propiedades antisenescentes (Saftner y Baldi, 1990), fueron capaces de retrasar el proceso de maduración de las granadas, como ha sido observado en un amplio rango de frutos climatéricos y no climatéricos (Valero et al. 2002). Dado que había una relación estrecha entre la intensidad del pardeamiento de la piel y la pérdida de peso, la menor pérdida de peso en granadas tratadas con poliaminas podría ser atribuida a la estabilización o la consolidación de la disposición y permeabilidad de los tejidos, disminuyendo los daños por frío, los cuales inducen una disrupción del tejido y conexión entre la piel y la atmósfera, permitiendo la transferencia de vapor de agua (Woods 1990). La reducción en la pérdida de peso claramente afectó a la apariencia visual de granadas, puesto que no se obtuvieron cambios significativos en el parámetro de color L^* en la fruta tratada con poliaminas, mientras que en la fruta control se observaron descensos. La disminución en el parámetro de color L^* ha sido descrita en la piel de granadas que sufrieron una escaldadura (Defilippi et al., 2006).

El proceso de ablandamiento de las granadas fue claro en los frutos control, ya que se observó un descenso significativo de la firmeza a lo largo del almacenamiento (Figura 2). Este proceso de pérdida de firmeza fue reducido de forma significativa en las granadas tratadas con poliaminas. Recientemente, mangos bañados en soluciones que contenían diversas concentraciones de Put o Spd (0.01, 0.5 o 1mM) retardaron el ablandamiento de la fruta y cambios visuales de color, y redujeron las pérdidas de peso y la tasa de respiración (Mallik y Singh, 2005). El efecto de las poliaminas para mantener la firmeza de la fruta puede ser atribuido al enlace al grupo $-COO^-$ de sustancias pécticas en la pared celular, resultando una rigidificación que es detectable inmediatamente después del tratamiento. Esta unión también bloquea el acceso de enzimas que degradan la pared celular tales como pectinmetilesterasa, pectinesterasa, y poligalacturonasa, reduciendo la tasa de ablandamiento durante el almacenamiento (Valero et al., 2002 y citas). Debido a la naturaleza policationica de las poliaminas, se postulado que la selectividad de las poliaminas para unirse a la pared celular siguió la secuencia $Spm^{4+} > Espd^{3+} > Put^{2+}$ (Messiaen et al., 1997). Sin embargo, la eficacia de las poliaminas en la granada para reducir el proceso de ablandamiento no difirió entre putrescina y espermidina, puesto que se obtuvo una retención en la firmeza de la fruta similar.

Durante el almacenamiento de las granadas control, la putrescina endógena no mostró incrementos significativos, mientras que se produjo un aumento significativo en la espermidina (Figuras 3 y 4). La respuesta de esta poliamina está de acuerdo con lo postulado por Bouchereau et al., (1999), quienes encontraron un incremento en la concentración de la poliamina en condiciones de stress ambiental. En fruta dañada por frío, tuvo lugar una acumulación de Put en pimiento, pepino, calabacín y cítricos (naranja, lima y limón) (Serrano et al., 1996; 1997; 1998; González-Aguilar et al., 2000 a; Martínez-Romero et al., 2003) Estos trabajos apoyan la propuesta de que la acumulación de putrescina o espermidina en los tejidos parece ser una respuesta general de la fruta a los daños por frío. Otros autores han propuesto

que el aumento en los niveles de poliaminas podría ser un mecanismo de defensa frente al stress (González-Aguilar et al., 2000 a; 2000b; Xu et al., 2005), pero esto no sucedió en las granadas control, puesto que los daños por frío aparecieron desde la primera fecha de muestreo y se agravaron a medida que aumentó el tiempo de almacenaje. Se podría concluir que estos aumentos ligeros no fueron lo suficientemente grandes para actuar como protección contra los daños por frío en las granadas control.

Sin embargo, la aplicación de putrescina o espermidina exógenas llevaron a incrementos significativos en putrescina y espermidina (pero no en espermina, datos no mostrados), y las granadas disminuyeron los síntomas de daños por frío, y así estos tratamientos podrían mejorar estos daños en las granadas, como ha sido mostrado que ocurre en pepino debido a la inhibición de la activación de NADPH oxidasas y la consecuente generación de radicales libres (Shen et al., 2000). Además, estos resultados son consistentes con observaciones en otros frutos en el que tratamientos post-recolección que elevan el contenido de poliaminas antes del almacenaje frío, son eficientes en reducir los daños por frío (Serrano et al., 1996). Como se esperaba, la adición de putrescina incrementó los niveles de putrescina endógena, mientras la espermidina endógena fue la mayor después de la aplicación de espermidina. De un modo interesante, la adición de una poliamina particular (putrescina o espermidina) incrementó significativamente los niveles de las otras dos, como ha sido observado en lichi tratado con poliaminas durante almacenamiento frío, el cual desarrolló una baja incidencia en el pardeamiento (Jiang y Chen, 1995).

De hecho, el menor pardeamiento de la piel fue correlacionado de una manera negativa con la concentración de putrescina endógena en fruta tratada con putrescina o espermidina, encontrando la misma correlación para la concentración de espermidina endógena cuando se trataron con putrescina o espermidina. Estos resultados sugieren una activación de la ruta de biosíntesis de poliaminas. Parte de la Put exógena aparece como Put endógena y parte es susceptible de haberse transformado en Spd usando SAM-DC como un donante aminopropil catalizado por espermidina sintasa (Tiburcio et al., 1997), mientras que la conversión de espermidina a espermina no sucedió, ya que no se mostraron incrementos importantes en espermina. En mostaza bajo condiciones de congelación, la putrescina exógena también incrementó los niveles de espermidina y espermina, y de un modo interesante la espermina exógena indujo a una mayor acumulación de putrescina y espermidina, la cual podría ser atribuida a una regulación de arginina descarboxilasa, un enzima clave de una de las rutas propuestas para las rutas de biosíntesis de poliaminas (Mo y Pua, 2002). Finalmente, los niveles incrementados de Put y Spd endógenas después de los tratamientos con poliaminas podría ser responsable de la menor tasa de ablandamiento, menor incremento de °Brix/acidez y pérdida de peso, y por tanto un incremento neto de la vida útil, ya que la aceleración de maduración y senescencia ha sido asociada a los descensos en el contenido de poliaminas endógenas (Valero et al., 2002).

CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo en el que la aplicación de Putrescina y Espermidina exógena mediante infiltración a vacío podría inducir a la aclimatación de la granada a bajas temperaturas, y por tanto proteger a la fruta de los daños por frío mediante el incremento de niveles de Putrescina y Espermidina endógenos, ya que los niveles normales de ambas poliaminas podrían no ser lo suficiente altos para inducir esta adaptación al almacenaje en frío. Además, el tratamiento con poliaminas retardó el proceso de maduración mediante la reducción del ablandamiento y el incremento de la relación entre °Brix/acidez, también como la pérdida de peso. Así, la capacidad de almacenamiento y la vida útil podría verse

incrementada en granadas almacenadas a bajas temperaturas que normalmente desarrollan daños por frío.

BIBLIOGRAFÍA

- Artés, F., Marín, J.G., Martínez, J.A. 1996. Controlled atmosphere storage of pomegranate. *Eur. Food. Res. Technol.* 203, 33-37.
- Artés, F., Tudela, J.A., Gil, M.I. 1998. Improving the keeping quality of pomegranate fruit by intermittent warming. *Eur. Food. Res. Technol.* 207, 316-321.
- Artés, F., Villaescusa, R., Tudela, J.A. 2000. Modified atmosphere packaging of pomegranate. *J. Food Sci.* 65, 1112-1116.
- Ben-Arie, R., Segal, N., Guelfat-Reich, S. 1984. The maturation and ripening of the 'Wonderful' pomegranate. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109, 898-902.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent developments. *Plant Sci.* 140, 103-125.
- Chattopadhyay, M.K., Tiwari, B.S., Chattopadhyay, G., Bose, A., Sengupta, D.N., Ghosh, B. 2002. Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 116, 192-199.
- Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C., Nunes, M.A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J. Plant Physiol.* 160, 283-292.
- Defilippi, B.G., Whitaker, B.D., Hess-Pierce, B.M., Kader, A.A. 2006. Development and control of scald on wonderful pomegranates during long-term storage. *Postharvest Biol. Technol.* 41, 234-243.
- Elyatem, S.M., Kader, A.A. 1984. Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. *Sci. Hortic.* 24, 287-298.
- Erez, A., Cohen, E., Frenkel, C. 2002. Oxygen-mediated cold-acclimation in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Physiol. Plant.* 115, 541-549.
- Gómez-Galindo, F., Herppich, W., Gekas, V., Sjöholm, I. 2004. Factors affecting quality and postharvest properties of vegetables: Integration of water relations and metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 139-154.
- González-Aguilar, G.A., Gayosso, L., Cruz, R., Fortiz, J., Báez, R., Wang, C.I. 2000a. Polyamine induced by hot water treatments reduce chilling injury and decay in pepper fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 18, 19-26.
- González-Aguilar, G.A., Zacarías, L., Pérez-Amador, M.A., Carbonell, J., Lafuente, M.T. 2000b. Polyamine content and chilling susceptibility are affected by seasonal changes in temperature and by conditioning temperature in cold-stored 'Fortune' mandarin fruit. *Physiol. Plant.* 108, 140-146.
- Jiang, Y.M., Chen, F. 1995. A study on polyamine change and browning of fruit during cold storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Postharvest Biol. Technol.* 5, 245-250.
- Kim, T.E., Kim, S.K., Han, T.J., Lee, J.S., Chang, S.C. 2002. ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiol. Plant.* 115, 370-376.
- Lester, G.E. 2000. Polyamines and their cellular-antisenescence properties in honey dew muskmelon fruit. *Plant. Sci.* 160, 105-112.
- Malik, A.U., Singh, Z. 2005. Pre-storage application of polyamines improves shelf-life and fruit quality of mango. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 80, 363-369.
- Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D. 2003. Physiological changes in pepino (*Solanum muricatum* Ait.) fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Postharvest Biol. Technol.* 30, 177-186.

- Martínez-Téllez, M.A., Ramos-Clamont, M.G., Gardea, A.A., Vargas-Arispuro, I. 2002. Effect of infiltrated polyamines on polygalacturonase activity and chilling injury responses in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 98-101.
- McCollum, T.G., McDonald, R.E. 1991. Electrolyte leakage, respiration and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. *HortScience* 26, 1191-1192.
- Messiaen, J., Cambier, P., Van Cutsem, P. 1997. Polyamines and pectins. I. Ion exchange and selectivity. *Plant Physiol.* 113, 387-395.
- Mo, H., Pua, E.C. 2002. Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*). *Physiol. Plant.* 1114, 439-449.
- Nanda, S., Rao, D.V.S., Krishnamurthy, S. 2001. Effects of shrink film wrapping and storage temperature on the shelf life and quality of pomegranate fruits cv. Ganesh. *Postharvest Biol. Technol.* 22, 61-69.
- Saftner, R.A., Baldi, B.G. 1990. Polyamine levels and tomato fruit development: possible interaction with ethylene. *Plant Physiol.* 92, 547-550.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M.C., Martínez, G., Riquelme, F., Pretel, M.T., Romojaro, F. 1996. Review: Role Of Polyamines In Chilling Injury Of Fruit And Vegetables. *Food Sci. Technol. Int.* 2, 195-199.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M.C., Pretel, M.T., Riquelme, F., Romojaro, F. 1997. Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and abscisic acid levels caused by chilling injury in pepper fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1668-1672.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valero, D. 2003. Effects of exogenous putrescine on improving shelf life of four plum cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 30, 259-271.
- Serrano, M., Pretel, M.T., Martínez-Madrid, M.C., Romojaro, F., Riquelme, F. 1998. CO₂ Treatment Of Zucchini Squash Reduces Chilling-Induced Physiological Changes. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2465-2468.
- Shen, W., Nada, K., Tachibana, S. 2002. Involvement Of Polyamines In The Chilling Tolerance Of Cucumber Cultivars. *Plant Physiol.* 124, 431-439.
- Stanley, D.W. 1991. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30, 487-553.
- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Borrell, A., Masgrau, C. 1997. Polyamine metabolism and regulation. *Physiol. Plant.* 100, 664-674.
- Tiburcio, A.F., Besford, R.T.; Capell, T., Borrel, A., Testillano, P.S., Risueno, R.C. 1994. Mechanism of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 45, 1789-1800.
- Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M. 2002. The role of polyamines in the improvement of shelf life of fruit. *Trends Food. Sci. Technol.* 13, 228-234.
- Woods, J.L. 1990. Moisture loss from fruits and vegetables. *Postharvest News Inform.* 1, 195-199.
- Xu, C., Jin, Z., Yang, S. 2005. Polyamines induced by heat treatment before cold-storage reduce mealiness and decay in peach fruit. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 5, 557-560.

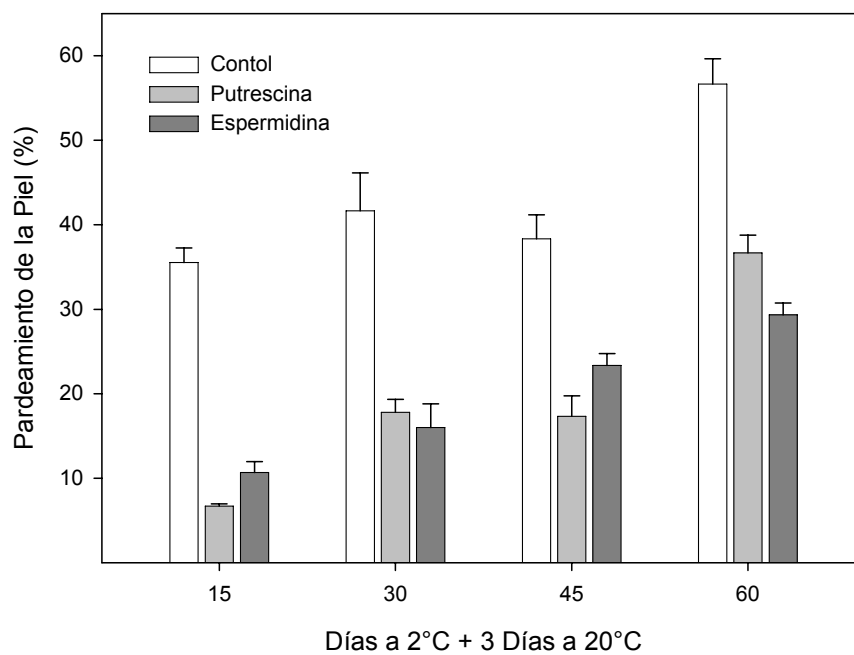
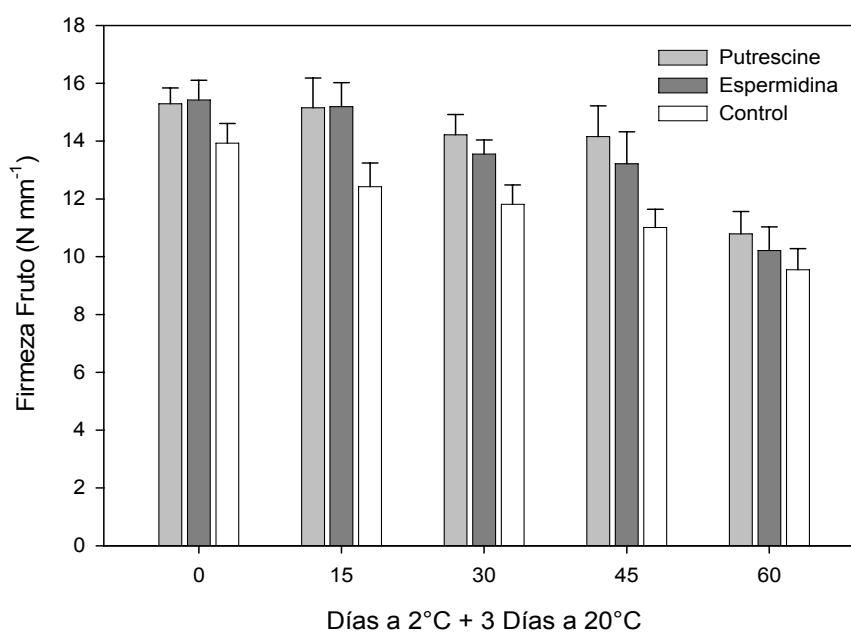


Figura 1: Porcentaje de pardemiento en granadas control y tratadas tras diversos periodos de almacenamiento en frío (2°C) + 3 días a 20°C.

Tabla 1. Valores de índice de madurez, respiración, color y salida de electrolitos en el momento de la recolección y al final del experimento (60 días a 2°C).

		°Brix/Acidez	Respiración nmol kg ⁻¹ h ⁻¹	Color L*	Salida de electrolitos
Control	0	54.82 ± 2.27 Aa	462 ± 30 Aa	61.69 ± 2.90 Aa	37.00 ± 1.57 Aa
	60	73.27 ± 1.90 Ba	595 ± 23 Ba	54.58 ± 1.47 Ba	56.68 ± 1.26 Ba
Putrescina	0	55.40 ± 1.50 Aa	707 ± 10 Ab	60.94 ± 1.74 Aa	39.76 ± 2.82 Aa
	60	57.44 ± 1.21 Ab	560 ± 16 Ba	60.34 ± 1.62 Ab	50.69 ± 0.94 Bb
Espermidina	0	57.64 ± 2.30 Aa	590 ± 20 Ac	62.45 ± 1.84 Aa	38.01 ± 2.19 Aa
	60	61.45 ± 0.48 Ab	613 ± 54 Aa	59.23 ± 1.62 Ab	52.35 ± 0.81 Bb

*Figura 2: Firmeza de las granadas control y tratadas tras diversos periodos de almacenamiento en frío (2°C) + 3 días a 20°C.*

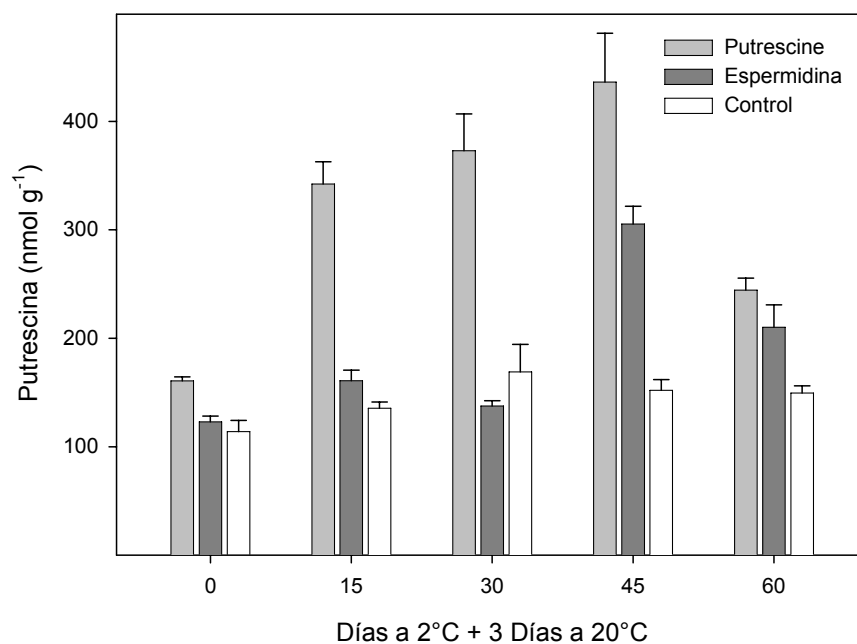


Figura 3: Niveles de Putrescina de las granadas control y tratadas tras diversos periodos de almacenamiento en frío (2°C) + 3 días a 20°C.

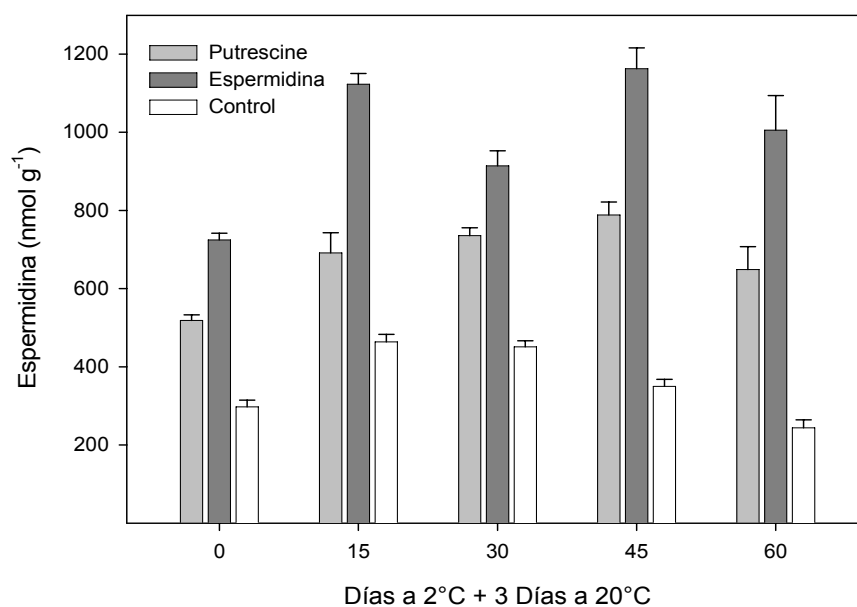


Figura 4: Niveles de Espermidina de las granadas control y tratadas tras diversos periodos de almacenamiento en frío (2°C) + 3 días a 20°C.