

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS
DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

DAÑOS POR FRÍO EN FRUTOS DE GUAYABA (*Psidium guajava* L.):
RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y EFECTO DE LAS ATMÓSFERAS
CONTROLADAS SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
Y ACTIVIDAD FOSFOLIPASA D EN MEMBRANAS MICROSOMALES

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M.C. PEDRO BENITO BAUTISTA

Querétaro, Qro

Noviembre 2002

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ
"ROBERTO RUIZ OBREGON"

No. Adq. H.67896

No. Título _____

Clas. 664.85

B 467d

E.1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
 FACULTAD DE QUÍMICA
 DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
 PROPAC.

Daños por frío en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.): Respuestas fisiológicas y efecto de las atmósferas controladas sobre la composición de ácidos grasos y actividad fosfolipasa D en membranas microsomiales

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
 Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:
 M.C. PEDRO BENITO BAUTISTA
 Dirigido por:
 Dr. Edmundo Mercado Silva

Sinodales:

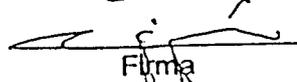
Dr. Edmundo Mercado Silva
 Presidente


 Firma

Dr. Salvador Pérez González
 Secretario


 Firma

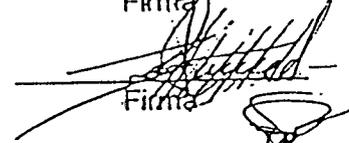
Dr. Luis González de la Vara
 Vocal


 Firma

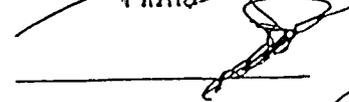
Dr. Miguel Ángel Gómez Lim
 Vocal


 Firma

Dr. Crescenciano Saucedo Veloz
 Vocal


 Firma

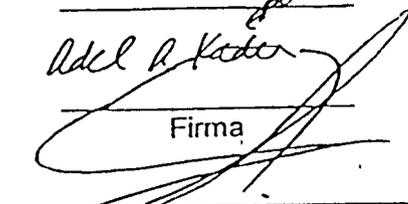
Dr. Victor Calderón Salinas
 Suplente


 Firma

Dr. Adel Kader
 Suplente


 Firma


 M. en C. Gustavo Pedraza Abortes
 Director de la Facultad


 Dr. Sergio Quesada Aldana
 Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

La guayaba, es un fruto susceptible de ser incluido en el mercado de exportación, principalmente a Canadá y los Estados Unidos, para lo cual es necesario mejorar su sistema de control de plagas y reducir su sensibilidad a la baja temperatura, que lo predispone al daño por frío. Este estudio fue implementado por una parte para conocer el crecimiento y maduración del fruto de guayaba "Media China" y por otra, su comportamiento en temperaturas de refrigeración, sus síntomas de daños por frío y el beneficio del uso de atmósferas controladas para aliviar estos daños. En la primera parte, los frutos en su etapa de amarre fueron marcados sobre árboles en producción y su crecimiento seguido por muestreo cada 20 días hasta su madurez. Para la segunda, frutos en estado de madurez verde-amarillo de 4.5-5.5 cm de diámetro, fueron tratados y no tratados con atmósferas controladas de 5% de CO₂, 10% de O₂ y la mezcla de estas por 24 h, almacenados a 4 y 10 °C por dos y tres semanas más tres días a temperatura ambiente (20°C), su comportamiento fue registrado utilizando las variables de respuesta; coordenadas de color, resistencia a la penetración, producciones de etileno y CO₂, contenido de membranas microsomales, contenido y grado de saturación de ácidos grasos, y actividad fosfolipasa D. Los resultados encontrados muestran que el crecimiento del fruto sigue un patrón doble sigmoide, cuya duración depende de la época de producción, su tamaño no define su período de corte, el contenido de sólidos solubles, acidez total y ácido ascórbico se incrementan notablemente en la tercera etapa de desarrollo del fruto, el color expresado como ángulo de matiz (H°), permite diferenciar tres etapas de madurez; verde, verde-amarillo (sazón) y amarillo (consumo), siendo la segunda etapa de madurez, la mejor para la cosecha del fruto, que corresponde a un índice de matiz de 105±5, con valores de a* de -17± 1.5, b* de 45± 1.5, y de L* de 55±5. De acuerdo a los patrones de producción de CO₂ y etileno la guayaba "Media China" se clasifica como un fruto climatérico. La vida poscosecha del fruto fue de una semana a temperatura ambiente (20°C), a 10°C puede extenderse por dos semanas, pero a 4°C por dos semanas, los frutos pueden presentar: incapacidad para madurar, oscurecimiento de la piel y pulpa, ablandamiento acelerado, mayor sensibilidad a enfermedades y mayor evidencia de daños mecánicos, frutos en estado de madurez más avanzada fueron mas tolerantes a las bajas temperaturas que los frutos "verdes". La aplicación de atmósferas controladas, mostró que la guayaba "Media China" también es susceptible a concentraciones de gases diferentes a las del aire, concentraciones de O₂ <10% y CO₂ >5% causaron daños similares a los provocados por las bajas temperaturas tales como la incapacidad para madurar, oscurecimiento de la piel y la producción de compuestos del metabolismo anaeróbico como etanol y acetaldehído, concentraciones elevadas de CO₂ (20%), inhibieron totalmente la producción de etileno, mientras que atmósferas moderadas de CO₂ (5%) conservaron: la textura, el sabor, la apariencia, color del fruto, redujeron los síntomas de daños por frío. Las atmósferas controladas afectaron el contenido de membranas microsomales, fosfolípidos y proteínas, ácidos grasos y los niveles de saturación de estos últimos, frutos con daño por frío severo, presentaron pérdida total de DGDG, lo cual respalda la idea de inhibición de la biosíntesis de galactolípidos por efecto de la baja temperatura. El tratamiento de 5% de CO₂, evitó las pérdidas (~25%) de fosfolípidos, galactolípidos y proteínas, mantuvo niveles de ácidos grasos similares a los frutos en madurez de consumo (390 ng/ g de m.m.), comparado con el resto de los tratamientos, pero no fue capaz de reducir el nivel de insaturación de ácidos. La actividad fosfolipasa D mostró mayor actividad a 4°C que a 10°C (4.46 y 3.86 μmoles de colina / g de proteína x min, respectivamente), lo que permite inferir una asociación con el fenómeno de daño por frío, el tratamiento de 5% de CO₂, redujo la actividad fosfolipasa D (2.69 μmoles de colina / g de proteína x min) de forma mas eficiente que el resto de las A.C. probadas.

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Indice general	iv
Indice de cuadros	v
Indice de figuras	vi
Indice de fotografías	vii
I.-Introducción	1
II.-Antecedentes	4
2.1.- Daños por frío	4
2.1.1.- Conceptos generales	4
2.2.- Membranas	8
2.2.1.- Estructura y composición de las membranas	8
2.2.2.- Cambios de las membranas celulares durante el almacenamiento	8
2.3.- Biosíntesis de ácidos grasos	9
2.4.- Efecto del frío sobre la biosíntesis de lípidos	16
2.5.- Efecto de las bajas temperaturas sobre el metabolismo respiratorio	16
2.6.- Efecto de las bajas temperaturas sobre el metabolismo del etileno	17
2.7.- Procedimientos para reducir los daños por frío	17
2.7.1.- Efecto de las atmósferas controladas sobre el daño por frío	18
2.8.- Enzimas en la degradación de los lípidos de la membrana	20
2.8.1.- Fosfolipasa D	21
2.8.1.1- Participación de la Fosfolipasa D en los daños por frío	22
2.9.- El fruto de Guayaba	23
2.9.1.- Conservación del fruto fresco de guayaba	26
2.9.2.- Daños por frío en el fruto de guayaba	27
III.- Justificación	28
IV.- Hipótesis	30
V.- Objetivos	30
5.1.- Objetivo General	30
5.2.- Objetivos específicos	30
VI.- Materiales y Métodos	31
6.1.- Materiales	31
6.1.1.- Crecimiento del fruto guayaba y determinación del Índice de corte.	31
6.1.2.- Efecto de la temperatura en la conservación del fruto y su efecto sobre los daños por frío	31
6.1.3.- Efecto de atmósferas controladas en la conservación del fruto y su efecto sobre los daños por frío	32
6.1.4.- Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la fracción lipídica de las membranas microsomales y la actividad fosfolipasa D	33
6.2.- Métodos	34
6.2.1.- Producciones de CO ₂ y etileno	34
6.2.2.- Parámetros físicos	34
6.2.3.- Parámetros Químicos	34

AGRADECIMIENTOS

Al IPN y CONACYT Por el apoyo económico brindado para lograr estos estudios de postgrado

Al Director de tesis Dr. Edmundo mercado Silva por sus aportaciones, sugerencias, orientaciones y de manera especial por su amistad.

A los Asesores, Maestros y personal del Departamento de Posgrado de la Facultad de Química por compartir sus conocimientos, su apoyo y su afecto.

6.2.4.- Separación de membranas microsomales	35
6.2.4.1.- Cuantificación de proteínas	36
6.2.4.2.- Cuantificación de fosfatos y fosfolípidos	36
6.2.4.3.- Extracción, Separación y Cuantificación de lípidos	37
6.2.5.- Actividad fosfolipasa D	38
6.2.6.- Análisis sensorial	39
6.2.7.- Análisis estadísticos	39
VII.- Resultados y Discusión	40
7.1.- Primera Etapa: Crecimiento del fruto	40
7.1.1.- cambios en la gravedad específica	41
7.1.2.- Sólidos solubles	42
7.1.3.- Acidez y ácido ascórbico	43
7.1.4.- Cambios de color	43
7.2.- Características del fruto cosechado	46
7.2.1.- Gravedad específica	46
7.2.2.- Firmeza	46
7.2.3.- Contenido de sólidos solubles totales y acidez	48
7.2.4.- Producción de CO ₂ y etileno en el fruto	48
7.3.- Segunda Etapa: Respuesta del fruto a bajas temperaturas	51
7.3.1.- Evolución del color	51
7.3.2.- Desarrollo del daño por frío	53
7.4.- Control de daños por frío a través de atmósferas controladas	56
7.4.1.- Observaciones preliminares de la evolución del color	56
7.4.2.- Desarrollo de color en frutos con tratamiento de A.C.	57
7.4.3.- Cambios de firmeza por efectos de tratamiento de A.C.	58
7.4.4.- Cambios de sólidos solubles y acidez por efecto de tratamientos de A.C.	60
7.4.5.- Efecto de las A.C. sobre la producción de CO ₂ y etileno	61
7.4.6.- Efecto de la A.C. sobre la calidad del fruto	63
7.5.- Tercera Etapa: Efecto de la temperatura y concentración de O ₂ y CO ₂ sobre la fracción lipídica de las membranas microsomales y la actividad fosfolipasa D	66
7.5.1.- Contenido de proteínas, fosfolípidos y membranas microsomales	66
7.5.2.- Efecto de la aplicación de A.C. sobre el contenido de ácidos grasos	68
7.5.2.1.- Contenido de ácidos grasos en frutos con y sin daño por frío	68
7.5.2.2.- Contenido de ácidos grasos en frutos tratados con A.C.	72
7.6.- Actividad fosfolipasa D	81
VIII.- Conclusiones	84
8.1.- Crecimiento del fruto	84
8.2.- Factores que determinan el índice de madurez	84
8.3.- Respuesta del fruto a bajas temperaturas	84
8.4.- Efecto de los tratamientos de A.C. por el control de daños por frío	85
8.5.- Efecto de los tratamientos de A.C. sobre la composición de las membranas microsomales y actividad fosfolipasa D	86
IX.- Bibliografía	87

INDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1.- Efecto de desaturasas en mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
Cuadro No. 2.- Efecto de la concentración de O ₂ y CO ₂ sobre los daños por frío en algunos frutos	19
Cuadro No. 3.- Composición y valor nutricional promedio del fruto de guayaba	25
Cuadro No. 4.- Contenido de ácidos grasos en jugo de guayaba	26
Cuadro No. 5.- Producción nacional de guayaba	29
Cuadro No. 6.- Gases, concentración, temperaturas y tiempos utilizados para conocer el efecto de AC sobre los daños por frío	32
Cuadro No. 7.- Valores de L*, a* y b* de color de guayaba Media China en diferentes estados de madurez	45
Cuadro No. 8.- Distribución de la gravedad específica por índice de madurez de frutos de guayaba	46
Cuadro No.9.- Evolución del ángulo de matiz en el fruto de guayaba en diferentes condiciones de almacenamiento	53
Cuadro No.10.- Significancia de los factores de almacenamiento y estado de madurez sobre parámetros de calidad sensorial del fruto.	54
Cuadro No.11.- Angulo de matiz en guayaba Media China con tratamiento de A.C."extremas" después de almacenamiento	56
Cuadro No.12.- Cambios en firmeza, acidez y sólidos solubles en guayabas después de dos semanas con tratamiento de AC	60
Cuadro No.13.-Cambios en firmeza, acidez y solidos solubles en guayabas después de tres semanas con tratamiento de AC	60
Cuadro No.14.- Contenido de fosfolípidos y proteínas en membranas microsomales de guayaba después del tratamiento de AC, almacenamiento de tres semanas a 4 y 1°C más tres días de acondicionamiento a 20°C.	67
Cuadro No.15.- Contenido de ácidos grasos (ng de ácido graso/ g de muestra) en membranas microsomales de guayaba con y sin daño por frío	70
Cuadro No.16.-Contenido de ácidos grasos (ng de ácido graso/ g de muestra) en membranas microsomales de guayaba almacenadas a 4 y 10°C	71
Cuadro No.17.- Contenido de ácidos grasos en membranas microsomales de guayaba con tratamiento de AC de 10% de O ₂ .	75
Cuadro No.18.- Contenido de ácidos grasos en membranas microsomales de guayaba con tratamiento de AC de 5% de CO ₂ .	76
Cuadro No.19.- Contenido de ácidos grasos en membranas microsomales de guayaba con tratamiento de AC de 10% de O ₂ y 5% de CO ₂ .	77
Cuadro No.20.-Resumen del efecto de los tratamientos de AC sobre el contenido final de ácidos grasos	78
Cuadro No.21.-Efecto de los tratamientos de A.C. sobre el contenido de ácidos grasos y su relación insaturados:saturados	81
Cuadro No.22.-Actividad Fosfolipasa D en frutos de guayaba con tratamientos de A.C. y almacenados a 4°C y 10°C	83
Cuadro No.23.-Actividad Fosfolipasa D en frutos de guayaba en madurez de consumo y con daños por frío severos.	83

INDICE DE FIGURAS

Fig. No. 1.-Principales reacciones de síntesis de ácidos grasos	11
Fig. No. 2.- Biosíntesis de glicerolipidos por las rutas procariótica y eucariótica	13
Fig. No. 3.- Síntesis de triacilgliceridos (Ruta de Kennedy)	13
Fig. No. 4.- Resumen de la síntesis de ácidos grasos, su incorporación a glicerolipidos e insaturación en <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
Fig. No. 5.- Acción de las enzimas de degradación de los fosfolipidos	21
Fig. No. 6.- Diámetro mayor de guayaba durante su desarrollo en los ciclos de producción primavera-verano (A) y otoño-invierno (B).	41
Fig. No. 7.- Cambio de gravedad específica durante el desarrollo del fruto de guayaba Media china	42
Fig. No. 8.- Cambio en el contenido de sólidos solubles totales (A), acidez (B) y ácido ascórbico (C) durante el desarrollo de guayaba Media china	44
Fig. No. 9.- Cambio en la coordenada a^* de color en guayaba Media china	45
Fig. No.10.- Cambio de la resistencia a la penetración en guayaba en tres estados de madurez almacenada a 20 °C	47
Fig. No.11.- Producciones de CO ₂ (A,B) y etileno (C,D) en guayaba Media china en tres estados de madurez durante los períodos primavera-verano y otoño-invierno.	50
Fig. No.12.- Producciones de etileno en frutos de guayaba tratados con AC por 24 h y mantenidos a temperatura ambiente.	57
Fig. No.13.- Efecto del tratamiento de A C y tiempo de almacenamiento sobre el ángulo de matiz de guayaba (A) 4°C y (B) 10°C y tres días a 20°C	59
Fig. No.14.- Producción de CO ₂ (A) y etileno (B) de guayaba mantenidas a temperatura ambiente (20°C) después de su tratamiento con AC.	61
Fig. No.15.- Efecto de las AC y tiempo de almacenamiento sobre la producción de CO ₂ después de dos y tres semanas a 4°C (A, B) y 10°C (C, D).	62
Fig. No.16. Efecto de las AC y tiempo de almacenamiento sobre la producción de etileno después de dos y tres semanas a 4°C (A, B) y 10°C(C, D)	64

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía No. 1.- Apariencia externa de frutos de guayaba almacenada por dos semanas a 4 y 10°C	55
Fotografía No. 2.- Apariencia externa de frutos de guayaba almacenada por tres semanas a 4 y 10°C y tres semanas a 4°C más tres días a 25°C	55

I.-INTRODUCCION

El estrés en tejidos vegetales, ocasionado por uno o la combinación de varios factores ambientales y biológicos, produce uno o varios cambios drásticos en el proceso fisiológico. De manera particular y de acuerdo a los rangos de temperatura, el estrés por este factor, puede provocar daños por frío, por congelamiento o por alta temperatura. El daño por frío (DF), resulta de la exposición de los tejidos a temperaturas en el rango de 0-15°C, y su manifestación varía de acuerdo al tipo de tejido, edad fisiológica, condiciones metabólicas, tiempo de exposición, etc. (Parkin et al., 1989; Paull, 1990). La diversidad y amplitud de sus manifestaciones dificulta el establecimiento de los mecanismos bioquímicos específicos, responsables de esta situación, sin embargo de forma general se acepta que este fenómeno ocurre en dos etapas, la primera instantánea, debida al cambio de temperatura (evento primario), que provoca la lesión que inicia el trastorno metabólico, seguida por una serie de eventos tiempo-dependientes, que permiten desarrollar los síntomas visibles (Raison y Wrigth, 1983).

Entre las posibles causas del evento primario con mayor aceptación se encuentra la teoría de transición de fase de los lípidos de la membrana, la cual supone que la exposición de tejidos a temperatura crítica, provoca el cambio de fase (líquido cristalino a sólido gel) de los lípidos de la membrana, incrementando la permeabilidad y su pérdida de capacidad reguladora, lo cual causa la disfunción y muerte celular (Lyons y Raison, 1970, Lyons, 1973).

La amplia variabilidad de expresión de daños en los tejidos por este y otros factores, ha sido explicada parcialmente en función de la degradación de las membranas celulares, como son: el ablandamiento acelerado del fruto y la reducción o pérdida de actividades enzimáticas incluyendo las relacionadas con la degradación de lípidos de la membrana (Jackman et al., 1992., Marangoni et al., 1990., Nguyen y Mazliak, 1990., Palma et al., 1995., Parkin y Kuo, 1989., Todd et al., 1992).

El fenómeno de DF tiene una alta repercusión en el manejo de productos hortofrutícolas

almacenados a baja temperatura, debido a la incertidumbre que se presenta para utilizar la refrigeración en su conservación e incrementar su vida útil. Por lo que para reducir la incidencia del daño por frío, se ha intentado diseñar tratamientos de protección como: acondicionamiento térmico, aplicación de compuestos químicos como reguladores de crecimiento (paclobutrazol) y antioxidantes (etoxiquina, benzoato de sodio), películas plásticas y el uso de atmósferas modificadas y controladas, que permitan reducir el nivel de daños (Whitaker y Wang, 1987., Wang, 1993).

El acondicionamiento térmico, aparentemente induce una respuesta adaptativa en frutas y hortalizas, mediante la modificación en la composición de lípidos para evitar la transición en el orden molecular y la fluidez de los lípidos de la membrana (Nguyen y Mazliak, 1990., Parkin y Kuo, 1989). Los reguladores de crecimiento provocan el incremento en el grado de insaturación de los ácidos grasos C:18 de los lípidos polares, reduciendo la temperatura requerida para el cambio de fase (Wang y Baker, 1979).

La reducción de O₂ ó el incremento de CO₂ atmosféricos, permiten disminuir el metabolismo de los frutos a través del control de la respiración por interacción de rutas metabólicas generales: glicólisis, ciclo de ácidos tricarbóxicos y la cadena respiratoria (Ke et al., 1995., Kader, 1986., Mathooko, 1996a), la regulación de síntesis de proteínas y la reducción del pH (Kerbel et al., 1988), además el CO₂ ejerce un efecto antagónico sobre la acción del etileno (Kubo et al., 1990),

La guayaba (*Pisidium guajava* L.), es un fruto tropical de interés económico, altamente perecedero, sensible a daños mecánicos con una vida media de 5-7 días a temperatura ambiente (Vázquez -Ochoa y Colinas-León, 1990; Reyes y Paull 1995), de 12-14 días a 10°C y de 8-12 días a 4°C (Mercado-Silva et al, 1995), los escasos reportes sobre su comportamiento en almacén a bajas temperaturas no permiten establecer totalmente su sensibilidad a los daños por frío y el efecto que diferentes sistemas de control tienen para reducir esta sensibilidad. Estudios de la aplicación de Atmósferas Controladas en este fruto, reportan que los tratamientos de CO₂, no afectan su respiración pero reducen la producción

de etileno en forma inversamente proporcional a la concentración de CO₂ aplicada, lo cual contribuye a mantener el fruto por períodos más largos (Khedkar et al. 1982, Pal y Buescher, 1993).

En este documento se informa sobre; el comportamiento del fruto almacenado a bajas temperaturas, las principales manifestaciones de daños por frío en guayaba, cambios en el contenido de proteínas, ácidos grasos y fosfolípidos de las membranas microsomales como resultado de su exposición a estas temperaturas, así como el comportamiento de la actividad de la enzima fosfolipasa D de este fruto y el efecto de las atmósferas controladas sobre las manifestaciones de los daños por frío.

II.-ANTECEDENTES

2.1. Daño por frío

2.1.1. Conceptos generales

El daño por frío (DF), es un término que describe el deterioro fisiológico o alteración funcional que ocurre en tejidos vegetales, como resultado de su exposición a temperaturas críticas de refrigeración (0 - 15°C); la manifestación de este daño fisiológico es el resultado de la alteración de los procesos metabólicos normales de las células y los tejidos, varía de acuerdo al tejido, la edad fisiológica, su condición metabólica, nivel de exposición a la temperatura crítica de daño, etc, (Parkin et al., 1989., Paull, 1990), y se expresa en diferentes síntomas visuales como lesiones en la superficie, oscurecimiento de los tejidos internos, áreas hundidas, incremento de la permeabilidad de las membranas, deshidratación, alteración del proceso de maduración, senescencia acelerada, cambios de composición química, baja calidad sensorial, y aumento en la sensibilidad a enfermedades, entre otros.

Lyons (1973), observando las alteraciones metabólicas causadas por la baja temperatura, propuso la teoría de transición de fase de los lípidos de la membrana, la cual ocurre por la exposición de los tejidos a temperatura crítica. La transición de fases de los lípidos de la membrana puede formar discontinuidades de las fases (gel y fluida) o fases no lamelares, las cuales causan el incremento de su permeabilidad y la pérdida de su capacidad reguladora, su disfunción y muerte celular (Wang, 1982). Esta teoría fue respaldada por las relaciones que se encontraron entre la temperatura crítica a la cual ocurre la transición de fase de los lípidos en membranas de plantas sensibles, con los síntomas de daños por frío (Bishop, 1986), así mismo por el comportamiento de algunos fosfolípidos para ordenar o inducir la separación de la estructura de bicapa de las membranas y de algunos cationes principalmente Ca^{2+} que unidos a lípidos polares pueden incrementar la rigidez de la membrana y aumentar la probabilidad de daño, sugiriendo que las membranas celulares podrían ser el sitio primario de daño (Parkin et al., 1989). A estas observaciones se agregaron la relación del grado de insaturación de ácidos grasos y la

resistencia al frío de algunas especies vegetales. Plantas con alta proporción de ácidos insaturados como espinaca y *Arabidopsis thaliana*, son tolerantes, mientras especies con contenidos bajos como calabaza y tomate son sensibles (Murata et al, 1992., Platt-Aloia y Thompson 1987., Raison y Wright, 1983., Wade y Bishop, 1978).

Posteriormente, Raison y Lyons (1986) y Raison y Orr (1990), para explicar el fenómeno de daño propusieron que este proceso ocurre en dos etapas; la primera, instantánea debida al cambio de temperatura (causa) que provoca la lesión que inicia el trastorno metabólico conocido como "evento primario" que ocurre a una temperatura particular (temperatura crítica) provocando un evento físico, seguida por una serie de eventos dependientes del tiempo de exposición a las bajas temperaturas, reconocidos como "eventos secundarios" y que causan el desarrollo de los síntomas visibles del daño por frío.

Entre las posibles causas del evento primario se consideran: la redistribución del calcio citosólico (Minorsky, 1985), ya que se ha observado que su concentración aumenta en dos ordenes de magnitud por el efecto de las bajas temperaturas, lo cual puede provocar alteraciones en el metabolismo y de manera particular sobre los procesos que dependen de la semipermeabilidad de las membranas, sin embargo la acción del calcio es considerada un evento secundario temprano y no la causa primaria del fenómeno de daño (Raison y Orr, 1990). La segunda causa considerada es el cambio conformacional y comportamiento de alguna proteína regulatoria, de manera particular en la estructura y cinética de algunas enzimas o debido a los bajos niveles energéticos en los enlaces proteína-proteína y proteína-lípido, sin embargo la evidencia disponible no es totalmente completa dado que los cambios abruptos en la E_a de distintas enzimas involucradas no se correlacionan con la sensibilidad de los tejidos o en algunos casos la V_{max} y la K_m pueden no ser diferentes entre especies sensibles y tolerantes (Patterson y Graham, 1977). Así mismo, la relación entre la temperatura crítica del daño y el nivel de actividad de las enzimas, no siempre son directas, como ocurre con las involucradas en el catabolismo de los fosfolípidos de las membranas microsomales de tomate (McCormac et al., 1993). Otra posible causa del origen del evento primario es el cambio en la dinámica del movimiento del flujo protoplasmático o ciclosis y la

alteración en la estructura del citoesqueleto por efecto de la baja temperatura (Woods et al., 1984). Sin embargo, se ha demostrado que las corrientes activas intercelulares son mediados por los filamentos de actina, la cual es sensible a la concentración de iones calcio, por lo que se ha propuesto que los cambios en la actina son el resultado de la acción de este ión y por lo tanto llevaría a este fenómeno como un evento secundario temprano (Raison y Orr, 1990).

La pérdida de integridad de las membranas microsomales durante el daño por frío se ha relacionado también con la pérdida de electrólitos, el incremento en el contenido de esteroides libres y el aumento en el índice de saturación de los fosfolípidos (Lurie, S. y R. Ben-Arie, 1983, Whitaker, 1991), lo cual sugiere que los cambios bioquímicos que afectan la matriz de lípidos de la membrana, tienen repercusión en la vida poscosecha del fruto (Lester y Stein, 1993).

Este cambio en la permeabilidad de la membrana, ocurre también durante las etapas de maduración y senescencia, manifestada principalmente por la reducción en el contenido total de fosfolípidos, incremento en la relaciones de esteroides: fosfolípidos, ácidos grasos libres:ácidos grasos esterificados, ácidos grasos saturados:ácidos insaturados y acumulación de lípidos peroxidados, semejantes en algunos casos con los daños por frío (Bergevin et al., 1993., Lester y Stein, 1993., Thompson et al., 1987).

Whitaker (1991, 1993) trabajando con tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) con daño por bajas temperaturas, encontró pérdidas en la relación de fosfolípidos:proteínas e incremento simultáneo en esteroides. Por otra parte Nguyen y Mazliak (1990), reportaron que el proceso de maduración de frutos de tomate almacenados a 4°C por 10 y 20 días fue parcialmente bloqueado con la pérdida acelerada de galactolípidos, por lo que infirieron la presencia de daños por frío. Posteriormente Sharom et al. (1994), en un estudio de difracción de rayos-X sobre las membranas microsomales de frutos almacenados por 20 días a 5°C, observaron solo pequeñas trazas de lípidos en la fase gel, sin embargo, 4 días después de la exposición del fruto a temperatura ambiente, se hizo evidente la separación de las fases.

En apoyo a las ideas de los cambios de transición de fases, Murata et al. (1983), reportaron que el fosfatidilglicerol (FG) de cloroplastos en plantas sensibles al frío presentaba el mayor cambio de fase comparado con otros glicerolípidos y que su contenido de ácidos grasos saturados 16:0, 18:0 y 16:1 trans (ác. Trans-3-hexadecenoico, con propiedades físicas similares a los ácidos saturados) en especies resistentes al frío era menor del 20%, comparada con especies sensibles en las cuales esta proporción tenía valores cercanos al 40%; también indicó que la temperatura de transición de fase en las especies sensibles fue de 30°C, mientras que en las resistentes se presentó a 15°C; de manera complementaria, observaron que la adición de 2% o menos de FG saturado aumentaba la temperatura de cambio de fase. No obstante, Moon et al. (1995) sostienen que el grado de insaturación en los fosfolípidos, tiene un efecto general y no es particular del FG.

Orr y Raison (1990), utilizando FG y Sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) de la planta *Nerium oleander* L., que tiene la capacidad de aclimatarse a su temperatura de crecimiento, demostraron que la temperatura de transición en los lípidos de los tilacoides estaba asociada a su punto de fusión y que la sensibilidad a los daños por frío podía ser modificada reduciendo los componentes de alto punto de fusión. Murata y Wada (1995), concluyeron que la insaturación de los lípidos de las membranas es importante para la tolerancia al frío y que las plantas pueden ser manipuladas genéticamente para la expresión de genes que permitan mayor proporción de ácidos grasos insaturados y por lo tanto mayor tolerancia al frío.

Otros trabajos han indicado que no solamente los cambios en los niveles de saturación de los ácidos grasos pueden ser los responsables de los desordenes que conducen a los síntomas de daño por frío, la peroxidación de los ácidos grasos también se ha relacionado con la incidencia y severidad de estos daños (Parkin et al., 1989, Shewfelt y Erikson, 1991), la cual se encuentra regulada por la presencia de un sistema de defensa que incluye una serie de antioxidantes naturales como el ácido ascórbico, β -caroteno, α -tocoferol, y glutatión reducido, enzimas que capturan especies de oxígeno altamente reactivo como superóxidodismutasa (E.C. 1.15.1.1.), peroxidasa (E.C. 1.11.1.7) y catalasa (E.C. 1.11.1.6),

así como otros mecanismos de reparación celular donde se involucran actividades proteolíticas y lipolíticas (Hariyadi y Parkin, 1993; Shewfelt y Purvis, 1995), el ataque oxidativo a estos sistemas de defensa podría fomentar los daños por frío.

2.2.- Membranas.

2.2.1.- Estructura y composición de las membranas.

Las membranas son estructuras constituidas por lípidos y proteínas unidas por numerosos enlaces no-covalentes, los fosfolípidos y galactolípidos son sus constituyentes esenciales con propiedades anfipáticas que sirven como barrera semipermeable a diversos compuestos. La fluidez de la membrana, una característica central y esencial para la dinámica celular (Singer y Nicolson, 1972), es determinada por la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos y la temperatura, esta movilidad afecta la actividad de las enzimas asociadas a ella, los enlaces cis-cis de dienos, trienos y tetraenos conjugados de ácidos grasos insaturados, permiten la libertad de movimiento, disminuyen la microviscosidad de la membrana y contribuyen a la adaptación térmica de las plantas (Quinn y Williams, 1978). Otros agentes como el Ca^{2+} , estimula la actividad fosfolipasa D en la degradación de lípidos de la membranas y altera la fluidez de la membrana, incrementando su temperatura de transición de fase (Raison et al., 1982., Shinitzky, 1984).

Un hecho importante en la composición de los fosfolípidos de las membranas biológicas, es que con pocas excepciones, el triglicérido es sustituido en su posición sn-2 por un ácido graso insaturado y la posición sn-1 por un ácido saturado. En plantas superiores los fosfolípidos más importantes; (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y foafatidilinositol), contienen en la mayoría de los casos ácido linoleico (18:2), en la posición sn-2 y con menor frecuencia ácido linolénico (18:3) (Brown et al., 1990).

2.2.2.- Cambios en las Membranas Celulares durante el almacenamiento.

Los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares, provocados por el estrés del medio, se traducen en alteraciones metabólicas y en ocasiones en muerte celular (Bergevin et al., 1993., Lester y Stein, 1993., Thompson et al., 1987., Paliyath y

Thompson, 1987., Parkin y Kuo, 1989., Todd et al., 1990 Shewfelt y Erikson, 1991), en el caso de tejidos sensibles a las bajas temperaturas, el cambio en la funcionalidad de la membrana, causa reacciones bioquímicas alteradas y sobrevienen las manifestaciones de daños por frío (Lyons, 1973, Marangoni et al., 1989). Durante la maduración y senescencia de los frutos, la degradación de las membranas interfiere en la transformación de los cloroplastos a cromoplastos (Whitaker, 1993) y en la reducción o pérdida de las funciones proteínicas y enzimáticas (Kuo y Parkin, 1989, Jackman, et al., 1992., Platt-Aloia y Thompson, 1987., Whitaker, 1988), por estas razones, la pérdida de ácido linolénico ha sido utilizada en algunas ocasiones como un índice de deterioro del proceso de daño de las membranas (Palma et al., 1995).

2.3.- Biosíntesis de ácidos grasos

Dada la importancia que se ha mostrado en la composición de los lípidos de la membrana en la generación de daños por frío, es importante hacer una revisión general del proceso de biosíntesis de estos compuestos con el fin de ubicar las etapas metabólicas involucradas. Existe una gran diversidad de ácidos grasos aislados en plantas (Harwood, 1997), pero la mayor producción incluye principalmente ácidos saturados; palmítico (16:0) y esteárico (18:0) y ocasionalmente pequeñas cantidades de ácido mirístico (14:0), ácido caprílico (10:0) o laúrico (12:0). El ácido oleico (18:1) es el más común de los ácidos monoinsaturados, mientras que los ácido linoleico (18:2) y α -linolénico (18:3) son los polinsaturados con mayor presencia. Con pocas excepciones los lípidos de las plantas están estructurados en glicerolípidos, donde dos de los tres grupos hidroxilo del glicerol están ocupados por ácidos grasos, los ácidos 16:0, 16:1 (3t), 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3, componen el 90% de las cadenas de los glicerolípidos de casi todas las membranas de las plantas.

La biosíntesis de estos glicerolípidos empieza con la formación de ácidos grasos (Fig. No. 1), cuyo sitio de síntesis son los plástidos e inicia utilizando los depósitos de Acetil-Coenzima A (ACoA), la cual puede ser transformada a malonil-CoA por adición de CO_2 a la ACoA,

mediante la acción de la Acetil-CoA-Carboxilasa (ACCasa, 1) ó unirse a la proteína acarreadora de grupos acilo (PAGA) por acción de la Acetil-CoA-PAGA transacilasa (2) y formar el grupo Acetil-PAGA. De la ACCasa, se han encontrado dos diferentes estructuras con distintas propiedades bioquímicas: una multisubunitaria o procariótica y otra multifuncional o eucariótica, las plantas dicotiledóneas contienen las dos formas, la forma procariótica es encontrada en los plástidos, mientras que la eucariótica se localiza principalmente en el citosol, la nueva malonil-CoA forma el complejo Malonil-PAGA, mediante la intervención de la malonil-CoA: PAGA transacilasa (3) la cual a su vez, puede unirse a una nueva molécula de Acetil-CoA o unirse a un grupo Acil-PAGA para formar β -Cetoacil-PAGA por acción de la enzima de condensación de cadena corta β -Cetoacil-PAGA sintetasa III (KAS III, 4) que utiliza grupos hasta de 4 carbonos, para continuar después la extensión de las cadenas por efecto de la β -Cetoacil-PAGA sintetasa I (KAS III, 5) la cual puede utilizar cadenas hasta de 14 carbonos (C_{14} -PAGA) para formar el palmitoil-PAGA, finalmente la β -Cetoacil-PAGA sintetasa II, condensa el palmitoil-PAGA con el malonil-PAGA para formar el estearil-PAGA. Cada una de las cadenas formadas son posteriormente reducidas, deshidratadas y reducidas nuevamente para formar el acil-PAGA correspondiente mediante la acción de la β -Cetoacil-PAGA reductasa (6), la β -hidroxiacil-PAGA deshidratasa (7) y la enoil-PAGA reductasa (8), de tal forma que cada ciclo de la síntesis se inicia con la condensación del nuevo residuo ácido graso-PAGA a un grupo malonil-PAGA a través de un enlace tioéster, los productos finales son; 16:0-PAGA o 18:0-PAGA en la mayoría de los casos.

El primer paso hacia la biosíntesis de ácidos grasos insaturados se debe a la acción de la estearil-PAGA desaturasa en el mismo plástido para convertir el grupo 18:0-PAGA a oleoil-PAGA (18:1-PAGA), el 16:0-PAGA no es desaturado por esta enzima, de tal forma que los principales productos de síntesis de ácidos grasos en plástidos son 16:0-PAGA y 18:1-PAGA, otras desaturaciones son catalizadas por acil-desaturasas específicas sobre ácidos grasos esterificados.

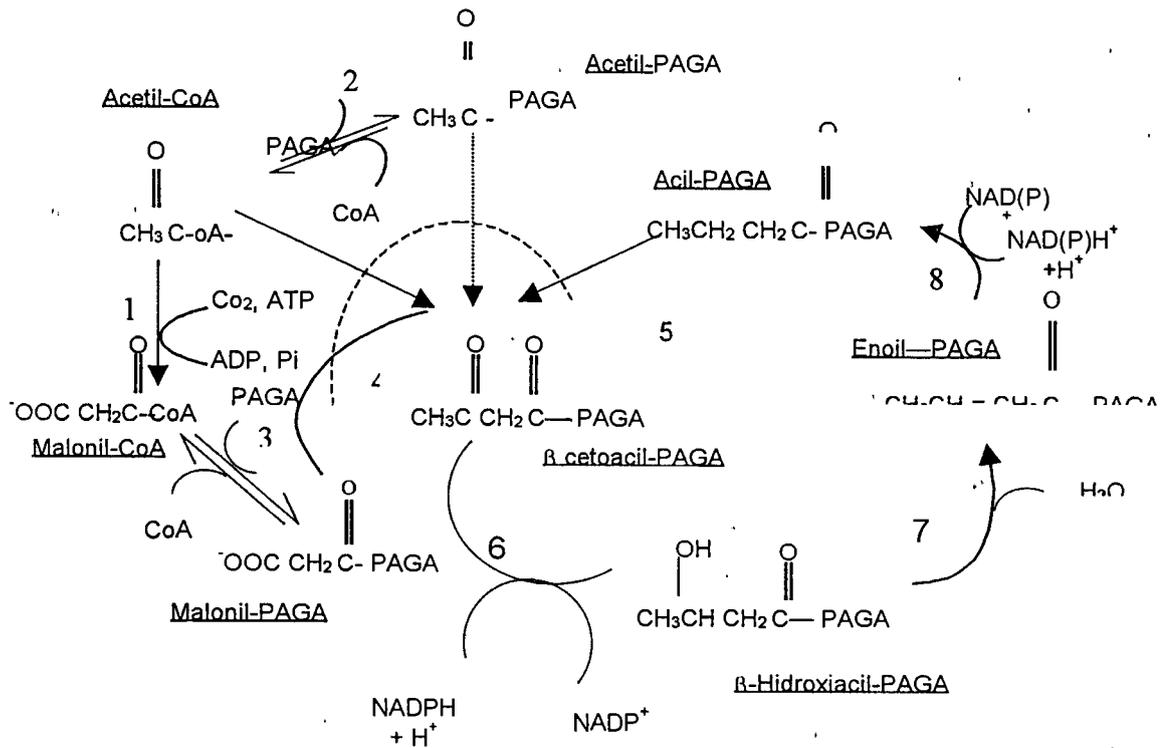


Fig. No. 1.-Principales reacciones de síntesis de ácidos grasos.

En la síntesis de glicerolípidos (Fig. No. 2), los ácidos grasos 16:0 y 18:1, pueden tener dos destinos diferentes, el primero, incorporarse a las rutas metabólicas dentro de mismo plástido y el segundo ser utilizados en vías metabólicas externas, denominadas como ruta "procarriota" y "eucariota" respectivamente (Ohlrogge y Browse,1995)

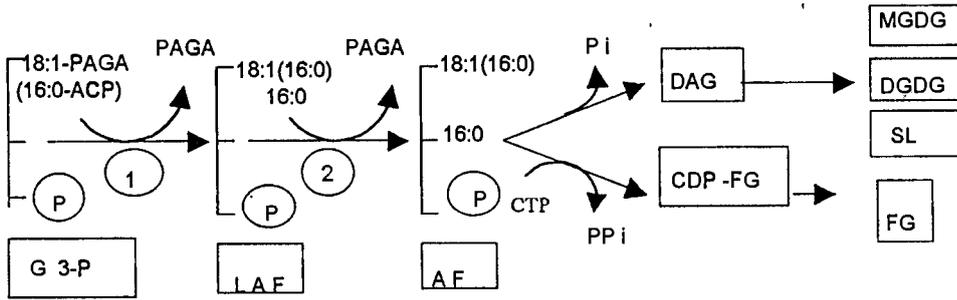
En la vía "eucariota", los ácidos grasos liberados por acción de la PAGA-tioesterasa del estroma son nuevamente esterificados a la CoA, (grupos acil-CoA), pasan al citosol y pueden estar disponibles para las actividades aciltransferasas, los lípidos de esta vía presentan grupos C:16 y C:18 en la posición sn-1 y sólo C:18 en la sn-2. En la ruta "procarriota", las cadenas de grupos acil-PAGA son utilizadas inmediatamente por las aciltransferasas dentro de los cloroplastos, una característica de los ácidos grasos de los glicerolípidos de esta ruta es que el glicerol es ocupado por cadenas C:18 en posición sn-1 y el sitio sn-2 es ocupado por grupos C:16 (Harwood,1997). La esterificación de la molécula de glicerol-3-fosfato por los ácidos grasos (Fig. No. 3), se

realiza por la acción de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (GFAT) y 1-acilglicerol-3-fosfatoaciltransferasa (AGFAT), el ácido fosfatídico (AF) producido, es el precursor común de los glicerolipidos y puede dar lugar al Diacilglicerol (DAG) por acción de una fosfatasa específica o formar parte de un nucleótido activado de DAG (CDP-DAG) mediante la reacción entre el AF con la 5'-trifosfato citidina (TFC), En el caso que el DAG, sea el sustrato activado, se forma la Citidina 5'-difosfato de colina, etanolamina y metiletanolamina para posteriormente formar los fosfolípidos correspondientes, mientras que sí el complejo CDP-DAG es activado, se une con el mioinositol, serina y glicerol-3-fosfato para formar el fosfatidilinositol (FI), fosfatidilserina (FS) y fosfatidilglicerofosfato precursor del fosfatidilglicerol (FG). Por otra parte, el UDP-galactosa y UDP-sulfoquinovosa son sustratos para la síntesis de Monogalactosildiácilglicerol (MGDG) y Sulfoquinovosildiácilglicerol (SQDG), el Digalactosildiácilglicerol (DGDG) es sintetizado a partir del MGDG (Ohlrogge y Browse, 1995). La insaturación de glicerolípidos, se realiza por acción de las desaturasas unidas a las membranas del cloroplasto y del retículo endoplásmico (Browse y Somerville, 1991., Gibson et al., 1994).

La composición de lípidos en las membranas es una de las características que define a cada una de las especies vegetales, sin embargo, el grado de variabilidad dentro de las células dificulta su intervención exacta en los procesos fisiológicos y en el desarrollo de los tejidos. En membranas de cloroplastos y cromoplastos, los principales componentes son: los glucosilgliceridos; MGDG, DGDG y SQDG, y el único fosfolípido es el fosfatidilglicerol (FG). De manera particular, el FG de los cloroplastos contiene ácido trans- Δ^3 -hexadecenoico 16:1 (3t), en posición sn-2, no reportado en lípidos de otras membranas (Roughan y Slack, 1984., Harwood, 1997).

En otras membranas extracloroplastidicas, la fosfatidilcolina (FC), es el fosfolípido mayoritario, seguido del fosfatidilinositol (FI), Fosfatidilserina (FS) y en la membrana interna de la mitocondria sobresale la presencia de Difosfatidilglicerol (DFG) o Cardiolipina.

Ruta Procarriótica -



Ruta Eurocarriótica -

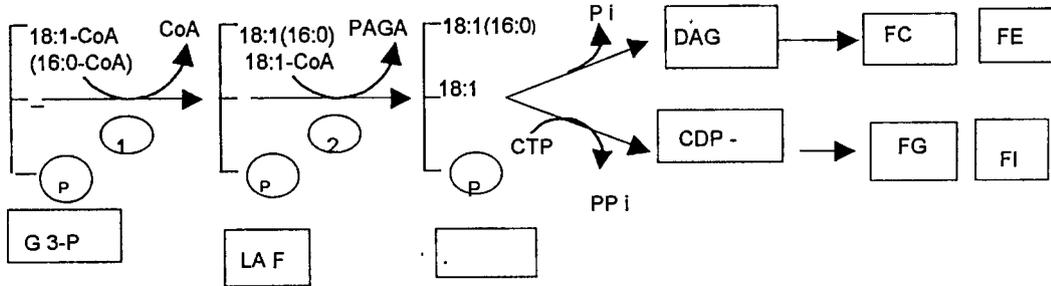
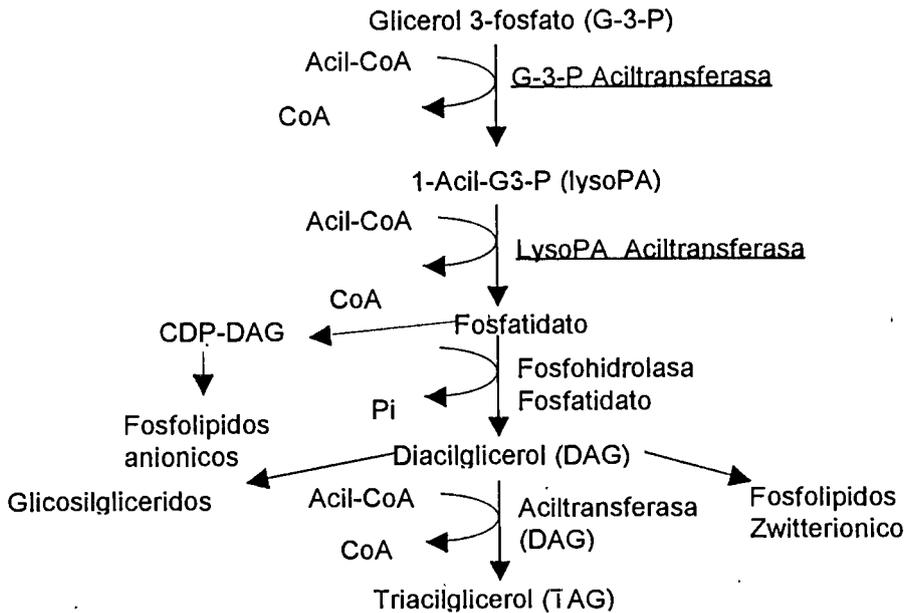


Fig. No. 2. Biosíntesis de glicerólpidos por las rutas procarriótica y eucariótica



Abreviaturas: G 3-P = Glicerol 3-fosfato; PA = Acido fosfatidico; DAG = Diacilglicerol; TAG = Triacilglicerol

Fig. No. 3. Síntesis de triacilgliceridos (Ruta de Kennedy)

Como ya se mencionó anteriormente, el grado de insaturación de los ácidos grasos de

las membranas contribuye en gran parte a la tolerancia de los tejidos a las bajas temperaturas y el número de dobles enlaces es controlado mediante un mecanismo de regulación; estos factores, junto con la longitud de las cadenas y en particular en el FG, definen la temperatura de transición de fase (Murata, et al., 1982, Murata y Wada, 1995., Nishida y Murata, 1996, Parkin et al., 1989), en las plantas sensibles al frío, la falta de insaturación de ácidos grasos ha sido explicada parcialmente utilizando un modelo que resume las deficiencias en desaturasas específicas en siete mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Fig. No. 4).

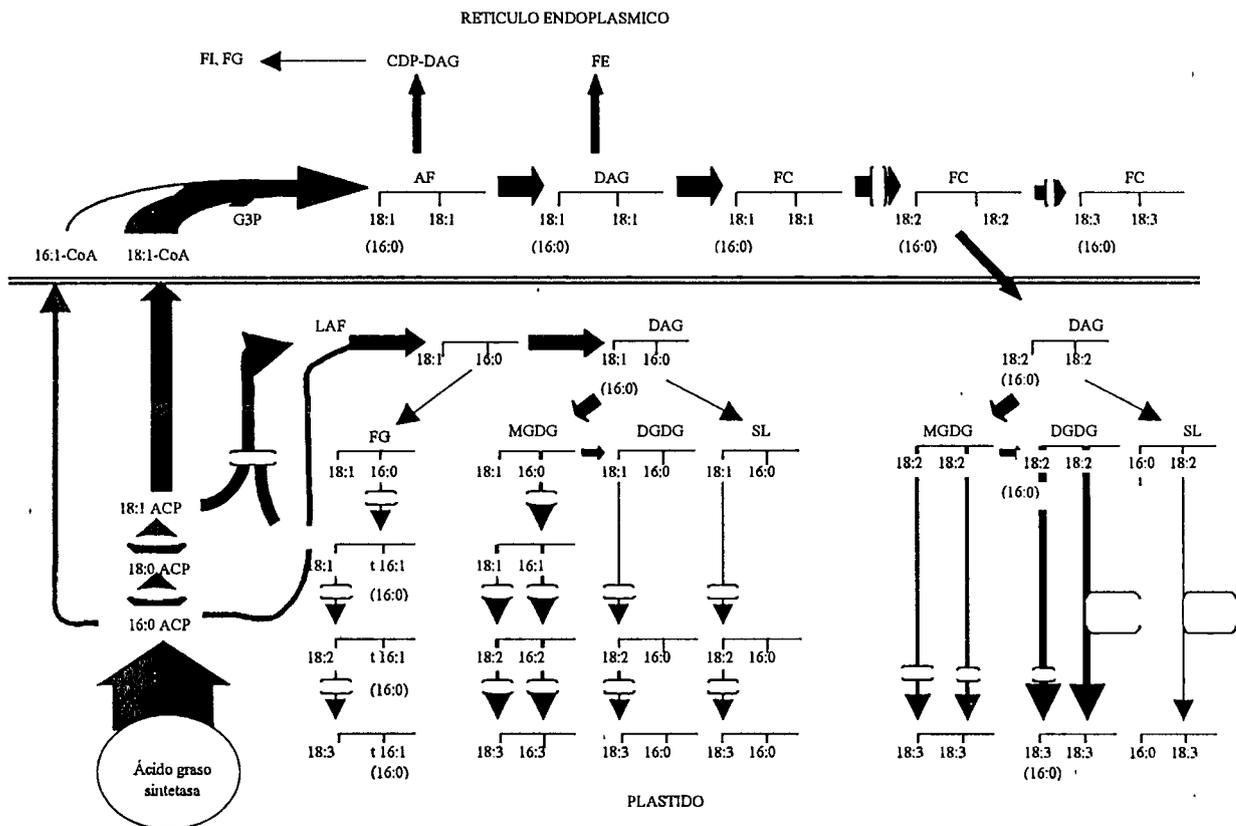


Fig. No. 4. Resumen de la síntesis de ácidos grasos, su incorporación a glicerolípidos e insaturación en *Arabidopsis thaliana* (Ohlrogge y Browse, 1995)

Este modelo pretende sustentar la hipótesis que el alto nivel de las especies moleculares "saturadas" del PG, confieren a las plantas sensibilidad al frío y que la manipulación genética puede alterar la instauración de ácidos grasos (Murata, 1983, Murata y Yamaya, 1984). Murata y Nishida (1990), consideraron que los glicerolípidos más importantes son sintetizados a partir de los ácidos grasos 16:0 y 18:1 y su insaturación ocurre por insaturadas integradas a la membrana cuando estos glicerolípidos se unen a ella. Las mutantes de *Arabidopsis Thaliana* (L.) Heynh aisladas con deficiencias en la síntesis de lípidos de la membrana de los cloroplastos y en retículo endoplásmico han permitido establecer algunas etapas en las rutas de insaturación de los ácidos grasos y su importancia fisiológica (Browse y Somerville, 1991), los estudios han mostrado que mutantes fad2 y fad6 contienen menores cantidades de ácidos grasos insaturados con respecto a la planta normal y son más susceptibles al frío (Miquel et al., 1993). Por su parte, en la mutante fad7, reduce la acumulación de ácidos trienoicos (16:3, 18:3) con la consecuente acumulación de ácidos dienoicos (16:2, 18:2). La acción de cada una de las desaturadas se describe en el Cuadro No.1.

Cuadro No. 1 Efecto de desaturadas en mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Browse y Somerville, 1991., Harwood, 1996)

Desaturada	Efecto de la deficiencia
fad 1	Baja actividad de la enzima 3-cetoacil-PAGA sintetasa (KAS II) responsable de aumentar la cadena C:16 a C:18
fad 2	Pérdida de actividad desaturada $\Delta 9$ (w9) sobre 18:0-PAGA principalmente de la FC
fad 3	Pérdida de actividad desaturada linolenato $\Delta 15$ de lípidos extracloroplastidales, principalmente de la FC
fad 4 (fad A)	Pérdida de actividad de desaturada $\Delta 3$ que inserta doble enlace trans en C16:0 del FG
fad 5 (fad B)	Responsable de la síntesis del doble enlace $\Delta 7$ (w9) en la posición sn-2 en MGDG y posiblemente en DGDG
fad 6 (fadC)	Desatura grupos acilo sin aparente especificidad de longitud de la cadena o posición en el glicerol 16:1/18:1
Fad 7y Fad 8 (fadD)	Isoenzimas que actúan sobre 16:2/18:2

2.4.- Efecto del frío sobre la biosíntesis de lípidos

Las bajas temperaturas tienen diferente efecto sobre las enzimas de la síntesis de lípidos de las membranas (Nguyen y Mazliak, 1990., Parkin y Kuo, 1989., Todd et al., 1992), la composición y posición de los ácidos grasos son factores que determinan la respuesta de las membranas a la exposición de los tejidos a las bajas temperaturas, un mismo fosfolípido con dos moléculas de ácidos grasos saturados iguales tiene una temperatura de transición de fase alta, comparada con dos moléculas de ácidos grasos insaturados con el mismo número de carbonos (Murata et al., 1982), por lo que se supone que la sensibilidad de las plantas al frío, esta relacionada con su contenido de especies moleculares saturadas 16:0, 16:1 (3t) y 18:0 en el fosfatidilglicerol y en los galactolípidos (Nguyen y Mazliak, 1990), la baja temperatura reduce la biosíntesis procariótica de MGDG por inhibición de la glicerol-3-fosfato aciltransferasa en comparación con la ruta eucariótica que se ve menos afectada en su transferencia de ácidos grasos de FC a MGDG (Yu y Willemont, 1997).

2.5.- Efecto de las bajas temperaturas sobre el metabolismo

La maduración es un proceso complejo regulado durante el desarrollo de la planta con incremento en la biosíntesis de etileno y en la tasa respiratoria, degradación de clorofila, síntesis de pigmentos carotenoides, hidrólisis de la pared celular, cambios de expresión genética y actividades enzimáticas, síntesis y liberación de compuestos volátiles y abscisión del fruto (Gómez Lim, 1992), estos procesos metabólicos son alterados por las bajas temperaturas, permitiendo la acumulación de productos intermedios y la pérdida de otros compuestos que dañan los mecanismos de maduración (Raison y Orr, 1990), las bajas temperaturas cambian el coeficiente de respiración de los tejidos y provocan daños en los sistemas enzimáticos que tienen como propósito intercambiar sustratos y energía entre la célula y el medio ambiente. A nivel celular, las mitocondrias de los tejidos sensibles al frío a temperaturas menores de 10° C, bajan su actividad, reduciendo su eficiencia de fosforilación oxidativa (Lyons y Raison, 1970).

2.6.- Efecto de las bajas temperaturas sobre el metabolismo del etileno

El etileno, regula el crecimiento, el desarrollo y la función de varios órganos en muchas plantas; en el contexto de poscosecha, promueve la abscisión, la maduración y la senescencia de los tejidos (Knee, 1985). En frutos, existe una fuerte relación entre la temperatura, la producción de etileno y las características de maduración (Bufler, 1986), la producción de etileno en la mayoría de las especies tienen una temperatura óptima de 30-35°C, a temperaturas mayores se presentan pérdida en su contenido, debido a la desintegración del sistema de síntesis de etileno (Mattoo y Lieberman, 1977), mientras que a temperaturas bajas (menores de 10-12 °C), el cambio de fase de los lípidos, provoca la pérdida de actividad de las enzimas unidas a la membrana incluyendo algunas de la síntesis de etileno (Bagnall y Wolfe, 1978), las bajas temperaturas se asocian con la conversión de ACC a etileno, debido a la reducción en la actividad de ACC oxidasa, lo cual explica la falta de maduración uniforme en varios frutos (Wang y Adams, 1982), no obstante, la relación entre la temperatura y la producción de etileno, no es considerada como un buen indicador de daños por frío (Chen y Patterson, 1985). En plátano, la producción de CO₂ y etileno se incrementaron a temperaturas entre 1 y 5°C en comparación a los almacenados entre 8 y 12°C, los daños por frío, provocan la pérdida de electrolitos del plasmalemma y discontinuidades en la gráficas de Arrhenius a 3.0 y 8.9°C que corresponden a las temperaturas críticas de cambio de fase de la pulpa y la piel respectivamente (Gemma et al., 1994).

2.7. Procedimientos para reducir la incidencia del daño por frío.

No obstante que el almacenamiento a bajas temperaturas se considera como el método más efectivo para mantener la calidad de la mayoría de los frutos y hortalizas (Handerburg et al., 1986), en algunos tejidos vegetales, estas temperaturas causan daños por frío que limita su aplicación. Se han buscado prácticas alternas para reducir estos efectos, entre ellos, la aplicación de pretratamientos a bajas temperaturas, el acondicionamiento térmico paulatino, el calentamiento intermitente, las atmósferas controladas, los tratamientos químicos y los reguladores de crecimiento son los más utilizados (Lurie et al., 1995., Wang, 1993, 1994). Aparentemente en frutas y vegetales, los tratamientos de acondicionamiento de temperatura

inducen una respuesta adaptativa al estrés de frío, principalmente a través de la modificación en la composición de lípidos para evitar la transición en el orden molecular y la fluidez de los lípidos de la membrana (Nguyen y Mazliak, 1990., Parkin y Kuo, 1989., Wang y Adams, 1982). Wang y Baker (1979), encontraron que los frutos de pepino (*Cucumis sativus* L.) y pimiento (*Capsicum annum* L.) tratados durante 5 minutos en benzoato de sodio 10 mM o ethoxiquina 9.2 mM, mantenidos en almacén a 2.5°C por diferentes períodos de tiempo y transferidos a 20°C, incrementaron el grado de insaturación en sus ácidos grasos C:18 de los lípidos polares y redujeron la sensibilidad a los daños por frío; de igual forma los tratamientos intermitentes de 24h a 20°C por 3 días de almacenamiento refrigerado, redujeron también los síntomas de daño e incrementaron la insaturación de lípidos polares.

Lurie et al. (1995), determinaron que pretratamientos térmicos a 38°C por tres días permiten reducir los daños por frío en tomate verde-maduro almacenado 3 semanas a 2°C y transferidos a 20°C, en el cual, la velocidad de maduración, el desarrollo de color y el ablandamiento fueron normales. Los frutos no tratados presentaron daños por frío con pérdidas de fosfolípidos y de iones en las membranas. En un estudio similar, McDonald et al. (1999), reportaron que el tratamiento térmico de 1h a 42°C, reduce el 60% de los daños que se producen en frutos de tomate almacenados a 2°C.

2.7.1.- Efecto de las Atmósferas controladas sobre el fenómeno de daño por frío.

La aplicación de Atmósferas Controladas (A.C.) en frutos, presentan respuestas particulares al fenómeno de daños por frío, la mayoría de los productos responden favorablemente a una reducción en el nivel de O₂ ó al incremento de CO₂, pero en otros casos la respuesta puede ser perjudicial o no tener efecto (Cuadro No.2), por lo que la aplicación de estas debe ser evaluada de forma individual (Wang 1994). De manera general se ha observado que altos niveles de CO₂ son más efectivos que bajos niveles de O₂ (Forney y Lipton, 1990), pero también el CO₂ puede presentar efectos opuestos en el control del metabolismo respiratorio dependiendo de la especie, variedad y factores fisiológicos del fruto, las condiciones de almacenamiento y la concentración de

gases (Kader, 1980, 1986; Ke et al., 1991, Mathooko et al., 1996b, Pesis et al., 1994b), concentraciones elevadas de CO₂ en tomate inducen síntomas de daño similares a las producidas por frío (Kader y Morris, 1978), por otra parte, exposiciones cortas con concentraciones moderadas pueden mantener los atributos de calidad en algunos frutos (Ke et al., 1991).

Los efectos positivos del CO₂ se deben a tres mecanismos principales; Al efecto antagónico de este gas a la acción del etileno (Kubo et al., 1990), a la reducción del pH citoplásmico y a la regulación de síntesis de proteínas (Kerbel et al., 1988).

El retraso de la senescencia y el mantenimiento de la composición de las membranas parecen ser las claves de la acción de las A.C. para controlar los síntomas de daños por frío (Borochoy et al. 1978., Makhouf et al., 1990). Bertolini et al. (1991), reportaron la reducción de daños por frío en limón (*Citrus limon* Burm.) por efecto de un tratamiento de CO₂ al 40% por 3 días. En aguacate tratamientos de O₂ al 3% por 24 horas redujeron los daños por frío (Pesis et al., 1994a). En brócoli tratamientos de 8.5% de CO₂ y 2.5% de O₂ detuvieron los daños por frío con ligero incremento en el grado de saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Makhlouf et al., 1990). La vida poscosecha del persimonia puede ser extendida de 6 a 18 semanas a 0°C por la formación de una atmósfera modificada apropiada dentro de las bolsas de polietileno de baja densidad durante el empaque de los frutos (Ben Arie y Zutkhi, 1992).

Cuadro No.2.- Efecto de las concentraciones de O₂ y CO₂ sobre los daños por frío en algunos frutos

PRODUCTO	O ₂ %	CO ₂ %	TEMP. °C	EFEECTO
Aguacate	2.0	10.0	4.4 - 7.2	+
Papaya	1.5 - 5.0	2.0	2.0	0
Durazno	1.0	5.0	0.0	+
Piña	3.0	0.0	8.0	+
Peras	1.0	1.5	- 1.0	+
Limón	No modificada	40.0	1.0	0
Lima	No modificada	30 - 40	1.5	-

Adaptado de Wang 1994.

2.8.- Enzimas de la degradación de los lípidos de la membrana.

El catabolismo de fosfolípidos en las plantas es debido a la acción concertada de cuatro enzimas unidas a la membrana; la Fosfatidilcolina-fosfatohidrolasa (EC 3.1.4.4) o Fosfolipasa D, la Fosfato-fosfatidasa (EC 3.1.3.4) o fosfolipasa C (FLC), las lípido-acil-hidrolasas o fosfolipasas A₁ (FLA₁), A₂ (FLA₂) y B (FLB) y la lipoxigenasa (EC. 1.13.11.12), clasificadas de acuerdo a su sitio de hidrólisis; las fosfolipasas C (FLC) y D (FLD), actúan como fosfodiesterasas, mientras que las fosfolipasas A₁ (FLA₁), A₂ (FLA₂) y B (FLB) tienen acción acil hidrolasa, la FLA₁ y FLA₂ rompen uniones acil-éster de las posiciones sn-1 y sn-2 respectivamente, mientras que la FLB actúa en ambas posiciones (Fig. No. 5). Los productos comunes de las acil-hidrolasas son ácidos grasos y lisofosfolípidos, los cuales pueden ser degradados a su vez por lisofosfolipasas. El resultado de este proceso catabólico es la pérdida de ácidos grasos y formación de productos de peroxidación (Kaniuga, et al., 1998., Mazliak, 1980, Leshem, 1987), las actividades fosfolipasa, además de afectar la estructura y estabilidad de la membrana, regulan varias funciones celulares (Wang, 2001), el papel fisiológico de estas enzimas, no se encuentra totalmente definido pero se relaciona con la respuesta a diversos factores de estrés, como; salinidad, patógenos, sequía, bajas temperaturas, deficiencias nutricionales y senescencia (Moore Jr., 1982, Paliyath y Thompson, 1987). De manera particular la Fosfolipasa D y la galactolipasa (lípido-acil-hidrolasa, E.C. 3.1.1.26) se han relacionado directamente con la respuesta a los daños por frío y a la degradación de MGDG, DGDG y FG (Kaniuga, et al., 1998., Todd et al. 1990., Wang, 2001).

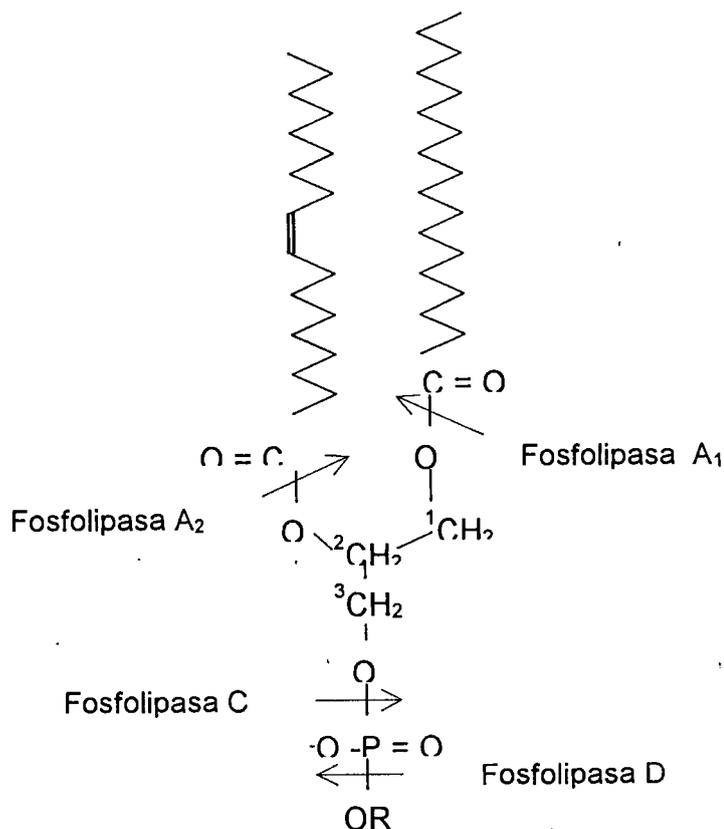


Fig. No. 5. Acción de las enzimas de degradación de los fosfolípidos.

Al igual que las enzimas involucradas en la biosíntesis de fosfolípidos, las enzimas de degradación; fosfolipasa-D y acil-hidrolasas poseen preferencia por especies moleculares que contienen cadenas acil insaturadas, con el siguiente orden: 18:0/20:4 > 18:1/18:1 > 16:0/18:2 > 16:0/16:0 (Brown et al., 1990).

2.8.1.-Fosfolipasa D

La Fosfolipasa D (FLD) se encuentra distribuida ampliamente en el reino vegetal, tanto en forma soluble como asociada a la membrana y parece no encontrarse en plástidos y mitocondrias (Clermont y Douce, 1970), su actividad básica produce un aminoalcohol y ácido fosfatídico, pero en casos especiales cataliza una reacción de transfosfatidilación, donde el agua es reemplazada por alcoholes primarios. Esta enzima se ha relacionado con procesos celulares que implican cambios en las membranas celulares como; la senescencia, daños por estrés, movilización de lípidos durante la germinación de

semillas y respuestas celulares a estímulos hormonales y del medio ambiente entre otros, de manera particular se relaciona con la acción y producción de hormonas de respuesta al estrés, como ácido abscísico, ácido jásmonico y etileno (Wang, 2001), con la presencia de diferentes formas moleculares de esta enzima en las células, hace suponer que cada una de ellas debe tener un papel diferente en el metabolismo de los lípidos en las plantas (Dyer et al., 1994). Existen muchas especulaciones del papel fisiológico de esta enzima, pero su principal actividad se relaciona al catabolismo y recambios en la composición de los lípidos de la membrana. El ácido fosfatídico, obtenido de la acción de esta enzima, es el compuesto intermediario en la síntesis de varios glicerolípidos y por tanto se asocia al cambio de fosfolípidos en relación al efecto de salinidad, infección de patógenos, senescencia (Paliyath y Thompsón, 1987) y de las bajas temperaturas (Yoshida 1979., Wang, 2001).

2.8.1.1.-Participación de Fosfolipasa D en los daños por frío

El catabolismo de los lípidos de la membrana o sus procesos de recambio pueden también alterarse durante la exposición de tejidos a baja temperatura y convertirse en una causa de la sintomatología de los daños por frío; se ha encontrado que las actividades de fosfolipasa D y lípido acil hidrolasa permanece prácticamente sin cambio cuando los frutos de tomate son expuestos a temperaturas entre 22 y 0°C; en contraste, la fosfatidato fosfatasa y lipoxigenasa son menos activas al pasar de 30 a 0°C, esto supone que algunos catabolitos de los fosfolípidos son almacenados y contribuyen a los daños por frío (Todd et al., 1990), considerando esta situación, se ha sugerido que el nivel de cambio de fase que ocurre a la temperatura crítica, depende de la composición de los ácidos grasos de las membranas (Lyons, 1973), la consecuente reducción de la fase liquido-cristalina por la formación de la fase gel, permite la pérdida de electrolitos (Ca^{2+} , H^+ , etc.) y hace susceptibles a los lípidos de la membrana a la acción de las enzimas lipolíticas (Paliyath y Droillard, 1992). Gritte et al.; (1998), reportaron altas actividades de FLD en la fracción microsomal de plántulas de maíz sensibles al frío, y menor actividad en la plántulas tolerantes, lo cual sugiere que las variaciones en la actividad de FLD puede causar diferencias en el metabolismo de

fosfolípidos, especulando que la transfosfatidilación por FLD puede contribuir a la formación de fosfatidilglicerol (Yang et al., 1967). En membranas senescentes, la FLD ataca principalmente fosfatidilcolina y fosfatidilinositol para formar ácido fosfatídico el cual es después hidrolizado a diacilglicerol por la ácido fosfatídico fosfatasa (Banas et al., 1992., Paliyath y Thompson, 1987). Whitaker (1990) reportó la actividad FLD varía de acuerdo a sus fuentes de extracción y es dependiente de la presencia de Ca^{2+} u otros iones divalentes, además que puede ser estimulada por detergentes o disolventes orgánicos, sustancias anfipáticas aniónicas, actúa preferentemente a pH ácido, aunque hidroliza una gran variedad de fosfolípidos, su actividad es influida por el estado físico del sustrato y la presencia de sustancias moduladoras (Banas y Stymne, 1992).

2.9.- El fruto de la guayaba

La guayaba (*Psidium guajava* L.), es un fruto agregado (baya) globoso que varía de forma redonda a piriforme de 4 a 12 cm de longitud, con exocarpio rugoso de color verde pálido a amarillo, de pulpa blanca o rosa, jugosa de sabor dulce y aromática donde se localizan semillas y células pétreas (Jagtiani et al., 1990), es nativa de América tropical de donde se ha distribuido por todos los países tropicales y subtropicales del mundo, pertenece a las especies cultivadas del orden de las *Myrteas*, de la familia: *Myrtaceae*, Género: *Psidium*, Especie: *guajava* L. A nivel mundial existe gran número de cultivares, correspondiendo de manera particular a programas locales de mejoramiento genético; como *Safeda* en India, *Branca* en Brasil, *Weber* en California, *Ka Hua Kula* en Hawaii y *Bassateen Edfina* en Egipto (Samson, 1990).

La amplia variabilidad genética, provoca diversos patrones de desarrollo del fruto, reportándose curvas de crecimiento doble sigmoide (Akamine y Goo, 1979., Ganguar, 1972), simple sigmoide (Murkherjee y Dutta, 1967., Yusof y Suhaila, 1987), o de comportamiento particular (Salunke y Besai, 1984., Jagtiani et al., 1987).

Los contenidos nutricionales del fruto son ligeramente variables, de acuerdo a su origen genético, factores agroclimáticos de producción, etc. puede contener entre el 74 y el 87% de

humedad dependiendo de su período de producción, siendo los cultivos de invierno los de mayor contenido de constituyentes químicos, con contenidos de cenizas entre 0.5 y 1.0%, 0.4 - 0.7% de grasas 0.8 - 1.5% de proteína, 0.33 - 0.99% de acidez de la pulpa, pH entre 4.7 - 5.4 (Rathore, 1976). La cantidad de azúcares totales, reductores y no reductores presentes son de 5.8, 5.5 y 0.3% respectivamente (Chan y Kwok, 1975) entre los que se encuentran 3.4% de fructosa, 2.8% de glucosa y 0.3% de sacarosa. La relación azúcares:acidez se encuentra en intervalos de 4 a 25 y la grados Brix:acidez entre 5 y 5.3, los valores de pectina total alcanzan entre 0.5 - 1.8%, que representan el 11% en base seca que sobrepasa las obtenidas con frutos cítricos. Las semillas del fruto corresponden al 1.0 - 1.8% en peso del fruto y contienen entre el 5 - 13% de aceite alto en ácidos grasos esenciales, principalmente oleico (Sharaf y El-Saadany, 1987). Los principales componentes (Cuadro No.3) fueron reportados por Wilson (1980). La guayaba es una excelente fuente de ácido ascórbico con un contenido mayor de 100 mg/100 g de fruto fresco y una fuente de niacina (1 mg/100 g), además contiene tiamina y riboflavina y minerales como; calcio, hierro, fósforo; la coloración rosa en guayabas es atribuido a la presencia de licopeno y su contenido se encuentra entre 4.78-6.90 mg / 100 g de fruta (Jagtiani et al., 1990).

Los constituyentes volátiles del fruto han sido reportados por varios investigadores (Idstein y Schereier, 1985, Wilson y Shaw, 1978), alcanzando un total de 159 compuestos entre los que destacan; alcohol cinnamílico, cinnamaldehído, nerolidol, 2-hexanal, myrceno, acetato de 2-metil-propileno, acetato de hexilo, decanoato de etilo, α -humuleno, α -selineno (Chyau et al., 1992).

Cuadro No.3. Composición y valor nutricional promedio del fruto de guayaba

Componente	Contenido promedio	Componente	Contenido promedio
Humedad ^a	83.3	Calcio ^b	17.00
Materia seca ^a	16.6	Fósforo ^b	28.40
Cenizas ^a	0.66	Ac. Pantoténico ^b	0.13 ^c
Grasa cruda ^a	0.36		0.17 ^d
Proteína cruda ^a	1.06	Hierro ^b	1.82
Fibra Cruda ^a	3.80	Clorofila ^b	0.67
Azúcares reductores ^a	4.00	Niacina ^b	1.18
Azúcares no reductores ^a	2.90	Caroteno ^b	0.69
Azúcares totales ^a	6.80	Xantofilas ^b	0.13
Sólidos solubles totales ^a	12.00	Ac. Ascórbico ^b	336.80
Acidez (ác. Cítrico)	0.80	Tiamina ^b	0.05
pH	4.7	Riboflavina ^b	0.03
Pectina insoluble en alcohol ^a	0.75	Vitamina "A" (β-caroteno) U.I.	250.0
Acido pectico ^a	0.51		
Pectina total ^a	0.99		

a. Por ciento
b. mg / 100 g

c. pulpa blanca
d. pulpa roja

Fuente: Wilson, 1980

Entre las principales actividades enzimáticas identificadas de acuerdo al desarrollo del fruto, se encuentra la actividad amilasa que ha sido detectada en todo el período de crecimiento y se incrementa durante la etapa de maduración (Mowlah e Itoo, 1983), la actividad poligalacturonasa se eleva en la etapa de maduración, mientras que la actividad pectinesterasa es más alta en estados inmaduros, decreciendo su actividad en los estados de maduración subsecuentes (Pal y Selvaraj, 1979). La actividad de polifenoloxidasa se incrementa durante la maduración con la consecuente disminución de compuestos fenólicos. En el fruto presentan también se han reportado actividades de ascórbico oxidasa y peroxidasa entre otras (Mowlah e Itoo, 1982a).

Los reportes de composición de lípidos de guayaba son escasos, Tasaka et al., (1990) reportaron la composición de ácidos grasos en las hojas, estas contienen 67% de ácidos grasos saturados 16:0, 16:1(3t) y 18:0, y 33% de insaturados (18:1, 18:2 y 18:3). Sharaf y

El-Saadany (1987), en un estudio con jugo de guayaba en tres diferentes grados de maduración [madurez fisiológica (verde-maduro), madurez de consumo (maduro) y sobremaduro] reportaron como ácidos grasos mayoritarios, el ácido linolénico (C:18:3) con 34.2%, palmítico (16:0) con 27.3%, mirístico (C:14) con 6.2% cáprico (C:10) con 4.4%, oleico (18:1) con 3.6% y linoléico (C:18:2) con 3.4% y laúrico (C:12) con 3.2%, los cuales cambian en función de la madurez, siendo dominantes los ácidos 16:0, 18:1 y 18:2 en la primera etapa, mientras que en la segunda y tercera etapa sobresalen el esteárico (18:0) palmítico y laúrico (Cuadro No.4). Por su parte, para el aceite de las semillas, los principales ácidos grasos encontrados por Prasad y Azeemoddin (1994), fueron: linoleico 76.4%, oleico 10.8%, palmítico 6.6%, esteárico 4.6% araquidónico 0.3%.

Cuadro No.4. Contenido de ácidos grasos en jugo de guayaba.
(Sharaf y El-Saadany, 1987)

Tipo de ácido	% del total de ácidos grasos		
	Verde-maduro	Maduro	Sobremaduro
C 8:0	2.4	1.3	1.5
C 10:0	4.4	6.6	6.4
C 12:0	3.2	8.3	8.6
C 14:0	6.2	2.3	3.2
C 16:0	27.3	30.2	30.3
C 18:0	3.6	4.2	4.3
C 18:1	14.7	21.2	23.7
C 18:2	3.5	7.6	5.0
C 18:3	34.2	17.9	16.6

Fuente: Sharaf y El-Saadany, 1987

2.9.1.- Conservación del fruto de guayaba

Para retardar los cambios fisiológicos y bioquímicos, y facilitar el control de ataques fúngicos durante la conservación de este fruto, se han aplicado diferentes tratamientos incluyendo fitohormonas (Gupta y Mukherjee, 1980), películas plásticas (Adsule y Tandon, 1983., Khedkar et al., 1982), ceras (Singh et al., 1981), soluciones de calcio (Gupta y Mukherjee, 1980., Singh et al., 1981), reducción de la temperatura (Vázquez -Ochoa y Colinas-León, 1990., Mercado et al., 1995., Reyes y Paull, 1995) y la aplicación de atmósferas modificadas

y controladas (Khedkar et al., 1982, Pal y Buescher, 1993).

2.9.2.- Daños por frío en el fruto de guayaba

Este fruto es sensible a daños mecánicos y bajas temperaturas con una vida media de 5-7 días a temperatura ambiente (Vázquez -Ochoa y Colinas-León, 1990., Reyes y Paull 1995), de 12-14 días a 10°C y de 7-10 días a 4°C (Mercado et al., 1995), la sintomatología de daños por frío en el fruto se manifiesta por la pérdida de la capacidad para madurar, formación de olores y sabores desagradables, mayor sensibilidad a la contaminación microbiana (Wills et al., 1983, Vázquez-Ochoa y Colinas-León, 1990) y bronceado de la piel (Reyes y Paull, 1995., Mercado et al., 1995).

III.-JUSTIFICACION

Actualmente existe una tendencia creciente al consumo de productos alimenticios frescos o con el menor procesamiento posible, por esta razón, en frutos frescos, se hacen esfuerzos por alargar la vida de anaquel y mantener sus características sensoriales, la reducción de la temperatura es el método mas frecuente para mantener la calidad de estos, sin embargo, la mayoría de los frutos de clima tropical o subtropical no pueden recibir completamente los beneficios de este método, debido a su alta sensibilidad a la baja temperatura. Sin embargo, se han desarrollado tecnologías, entre las que se encuentran aquellas que involucran el cambio en la concentración de los gases atmosféricos como complemento a la refrigeración para tratar de aliviar esta susceptibilidad al frío. La modificación en la concentración de gases atmosféricos reduce el ritmo de respiración, prolonga el período de maduración, mantiene la calidad de los frutos y reduce el ablandamiento. La optimización de la concentración de gases y la temperatura de almacenamiento, permiten incrementar la vida poscosecha y calidad de estos frutos.

México dentro de su territorio nacional, tiene una amplia variedad de climas, lo que le permite ofrecer gran diversidad de especies frutícolas en fresco, algunas de ellas como: mango, papaya, plátano, sandía, limón, aguacate, fresa y melón, mantienen gran reconocimiento en el mercado internacional. Otras especies, no obstante su alta calidad, requieren de mejorar sus sistemas de manejo para ampliar su mercado incluyendo el de exportación, entre estas especies se encuentra la guayaba, la cual es uno de los recursos frutícolas con mayores posibilidades de exportación, principalmente a Canadá, Estados Unidos y a otros países de régimen templado, por esta razón, las Uniones de productores de este fruto en los estados de Aguascalientes y Zacatecas han intentado mejorar su producción, manejo y comercialización. De acuerdo con las estadísticas de la SAGARPA en 2000, México ocupa el segundo lugar de producción a nivel mundial de guayaba después de la India con los volúmenes cercanos a las 250,000 Toneladas anuales (Cuadro No.5), no obstante la información generada para su producción y manejo es escaso, lo cual ha limitado su comercialización.

Cuadro No. 5. Producción Nacional de guayaba

Año	Producción (Tm)
1997	179,820
1998	181,567
1999	239,856
2000	254,160

Fuente: SAGARPA, 2000

Este estudio, pretendió conocer la respuesta del fruto a diferentes temperaturas de almacenamiento y algunos cambios bioquímicos relacionados a los síntomas daño por frío; probar el beneficio del uso de atmósferas controladas como medio para aliviar estos daños, así como describir las alteraciones en el tipo y grado de saturación de los ácidos grasos y en la actividad fosfolipasa D. El control sobre los daños por frío permitirá incrementar su vida poscosecha y eventualmente enviar este fruto a mercados relativamente distantes.

VI.- MATERIALES Y METODOS

6.1.-Materiales

6.1.1.-Crecimiento del fruto y determinación del índice de corte.

Dada la importancia que tiene el estado de madurez del fruto en la susceptibilidad a los daños por frío, fue necesario identificar las etapas en las cuales podría ser cosechado el fruto sin que el proceso de maduración se viera afectado, para lo cual se utilizaron los parámetros del índice de cosecha en guayaba más sugeridos; los días de floración a cosecha (Yusof y Suhaila, 1987), la gravedad específica (Teaotia, et al., 1970), el color de la piel (Brown y Wills, 1983), la firmeza (Paull y Goo, 1983), los sólidos solubles y la acidez (Dhillon et al., 1987), pero como no existe la certeza que solo alguno de ellos defina este índice, se seleccionaron diferentes árboles en dos huertos establecidos de guayaba "Media China" en las regiones de Calvillo Aguascalientes y Jalpa Zacatecas, durante los períodos de floración respectivos (febrero-mayo y junio-julio), al momento de amarre se marcaron 800 frutos en cada período, posteriormente se tomaron muestras de 30 frutos al azar cada 20 días, midiendo el diámetro mayor y el peso de cada fruto para describir su desarrollo. Al final, se cosecharon frutos con 4.5-5.5 cm de diámetro en tres estados de evolución de color; verde-maduro (madurez I), verde-amarillo (madurez II) y amarillo (madurez III), los cuales fueron preenfriados a 12 °C por 18 h durante su transporte al laboratorio y transferidos a temperatura ambiente ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) para medir posteriormente los parámetros de color, resistencia a la penetración, sólidos solubles totales, acidez y contenido de ácido ascórbico, con los datos obtenidos se trazaron las curvas de crecimiento y se realizaron los análisis estadísticos correspondientes de cada uno de estos parámetros.

6.1.2.- Efecto de la temperatura en la conservación del fruto y el desarrollo de daños por frío

Frutos en estado de madurez II con 4.5-5.5 cm. de diámetro fueron cosechados y preenfriados durante su transporte al laboratorio a 10-12°C por 18h, después transferidos a temperatura ambiente, fraccionados en tres grupos de 80 frutos cada uno, el primero fue almacenado a temperatura ambiente ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) con una humedad relativa (HR) de 65% y los dos restantes en cámaras de refrigeración a 4 y 10 °C con H.R. del 85-90%. Cada

semana, se tomaron muestras de 20 frutos al azar y se transfirieron a temperatura ambiente ($20 \pm 3^\circ\text{C}$), por tres días adicionales, el proceso de maduración o de desarrollo de daños por frío fueron evaluados mediante los cambios de las coordenadas internacionales de color (L, a^* , b^*), y parámetros de análisis sensorial [color (capacidad para madurar y bronceado de la piel), textura, apariencia y formación de olores y sabores desagradables], evaluados mediante una prueba de preferencia aceptación utilizando una escala hedónica de 9 puntos con un panel de 6 jueces, utilizando como testigo un fruto en óptimas condiciones de consumo (Reyes y Paull, 1995., Vázquez-Ochoa y Colinas-León, 1990., Wills et al., 1983), los datos de análisis sensorial fueron convertidos a numéricos y cada uno de ellos analizados estadísticamente.

6.1.3.-Efecto de las Atmósferas controladas en la conservación del fruto y su efecto sobre los daños por frío

Frutos en estado de madurez II con 4.5-5.5 cm de diámetro fueron cosechados y preenfriados durante su transporte al laboratorio a $10-12^\circ\text{C}$ por 18h, después transferidos a temperatura ambiente y distribuidos en lotes de 40 frutos, cada lote fue colocado en frascos de vidrio y expuestos por 24 h a una corriente de aire (150 ± 35 ml/min) a diferentes concentraciones de O_2 y CO_2 con balance de N_2 en todos los casos, inmediatamente después del tratamiento los frutos fueron almacenados a 4 ó 10°C . En ensayos preliminares se probaron tratamientos con concentraciones de 5 y 10% de O_2 , y de 5, 10 y 20% de CO_2 , almacenados a 4 y 10°C entre una y tres semanas, seguidos en cada caso por tres días a temperatura ambiente para conocer la recuperación metabólica de los frutos, utilizando como variables de respuesta los cambios de las coordenadas internacionales de color (L, a^* , b^*) y la producción de etileno. De estos ensayos preliminares, se seleccionaron las concentraciones de 10% de O_2 , 5% de CO_2 y la combinación de estos como posibles tratamientos para evitar los daños por frío (Cuadro No. 6), los frutos con estas atmósferas fueron almacenados a 4 ó 10°C , de donde se tomaron muestras de 12 frutos a las 0, 2 y 3 semanas, y se dividieron en dos submuestras, una de estas se dejó acondicionar por tres días a temperatura ambiente ($20-22^\circ\text{C}$) para evaluar; la evolución de color, la producción de etileno y CO_2 ,

resistencia a la penetración, sólidos solubles, acidez y calidad sensorial. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente.

Cuadro No. 6. Gases, concentraciones, temperaturas y tiempos utilizados para conocer el efecto de AC sobre los daños por frío

Gases	Concentraciones %	Temperaturas (°C)	Tiempo (sem)
Control	Aire	4, 10	0, 2, 3
O ₂	10	4, 10	0, 2, 3
CO ₂	5	4, 10	0, 2, 3
O ₂ + CO ₂	10 + 5	4, 10	0, 2, 3

6.1.4.- Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la fracción lipídica de las membranas microsomales y la actividad fosfolipasa D.

Pulpa de frutos (240 g) de cada tratamiento, retirados a las tres semanas del almacén y tres días adicionales de acondicionamiento a temperatura ambiente, fueron guardados en un ultracongelador a -80°C para posteriormente ser utilizados para separar membranas microsomales (González de la Vara y Medina, 1988) y evaluar el contenido de lípidos (Whitaker, 1988), o como extractos crudos de fosfolipasa D (Clermot y Douce, 1970).

6.2.- Métodos

6.2.1.- Producción de CO₂ y etileno

Las producciones de CO₂ y etileno fueron medidas a través del método estático colocando frutos individuales en frascos de vidrio por una hora a 20°C, calculando el espacio de cabeza y tomando muestras de éste para evaluar su contenido; la cantidad de CO₂, expresada en mg/kg.h fue medida en un Cromatógrafo de gases Mca. Perkin Elmer Autosystem utilizando una columna Chromapack 7537 de 10 m de longitud y 0.7 mm de diámetro con una temperatura de horno de 80°C y detector de conductividad térmica, la cuantificación fue realizada utilizando un estándar externo certificado de 5% de CO₂. En el caso de etileno se utilizó de una columna empacada DEG sobre

Cromosorb w-AW 80/100 con temperaturas de 40, 60 y 80°C en el inyector, horno y detector de ionización de flama respectivamente. La cantidad de etileno producida fue expresada en $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$ utilizando un estándar externo certificado de 10.4 ppm.

6.2.2.- Parámetros físicos

Color. El color fue medido sobre la epidermis a la altura del eje ecuatorial, con un espectrofotómetro Minolta C2002 (Minolta Camera Co. LTD), utilizando el sistema internacional de medición de color CIELAB utilizando un iluminante C y un observador a 2 grados, los valores de Índice de Matiz (H°) fueron calculados de acuerdo a Mc.Guire (1992).

Firmeza. La resistencia a la penetración fue medida usando un Analizador de textura TA-HD. Texture Technologies Corp., New York, utilizando una sonda de acero inoxidable de 5 mm de diámetro, la cual penetró 8 mm de profundidad a una velocidad de prueba de 1 mm/seg.

Gravedad específica. Frutos de tamaño y coloración homogéneas fueron colocados en un recipiente con agua o en solución de etanol al 10%, y fueron separados en cada ocasión en dos grupos: el primero formado por frutos que flotaron y el segundo por aquellos que se hundieron lo cual permitió separar frutos con gravedad específica mayor de 1.0 (que se hundieron en agua), entre 1.0 y 0.988 (que hunden en etanol al 10%) y menores de 0.988 (que flotan en etanol al 10%).

6.6.3.- Parámetros químicos

Contenido de sólidos solubles (método 938.17, AOAC, 1990), 10 g de pulpa fueron molidos, el jugo extraído de cada una de las muestras fue filtrada y dos gotas fueron colocadas en un Refractómetro de Abbé para su análisis realizando la lectura a 20°C.

Acidez titulable (método 935.57, AOAC, 1990), 10g de pulpa del fruto fueron homogenizados con 100 ml de agua destilada neutra, se tomó una alícuota de 20 ml, a

la cual se agregaron 2 gotas de fenoltaleína y NaOH 0.1N hasta el vire del indicador, el contenido de acidez fue reportado como % de ácido cítrico.

Ácido ascórbico (método 967.21, AOAC, 1990), 10 g de muestra fueron homogenizados y colocados en un matraz aforado de 100 ml, se agregaron 50 ml de ácido metafosfórico al 3%, se mezcló y se llevó al volumen con agua destilada, a una alícuota de 10 ml se le añadió el reactivo del 2,6-diclorofenolindofenol mediante una bureta y agitación constante hasta llegar al punto final de la capacidad reductora del ácido ascórbico por titulación.

6.2.4- Separación de membranas microsomales.

Solución de extracción

Albúmina de suero bovino (Boehringer Mannheim, Alemania)

DTT: 1-4 Ditioneitol (Boehringer Mannheim, Alemania)

EDTA: Sal sódica del etilen-diamino tetra-acético (Sigma)

Sacarosa (Sigma)

Trizma Base (Tris-[hydroxymethyl]-amino methane)-1,4 (Sigma)

Solución de resuspensión:

DTT: 1-4 Ditioneitol (Boehringer Mannheim, Alemania)

Sacarosa (Sigma)

Trizma Base (Tris-[hydroxymethyl]-amino methane)-1,4 (Sigma)

Mes: (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (Sigma)

La extracción de membranas microsomales se realizó por la técnica de partición de fases descrita por González De la Vara y Medina (1988). Para lo cual, 120 g de la pulpa del fruto fueron homogenizados en una licuadora por 30 segundos con una solución extractora que contenía cantidades suficientes para obtener concentraciones 250 mM de Sacarosa, 4.0 mM de ditioneitol (DTT), 0.5mM de EDTA, 0.1% (p/v) de albúmina de suero bovino, 0.5% (p/v) de polivinilpirrolidona insoluble y 70 mM de

hidroxiaminometano y ácido Clorhídrico (Tris/HCl) llevadas a pH 8.0 y a temperatura de 4°C. El homogenizado se filtró al vacío sobre tela de algodón, el filtrado fue centrifugado a 9,000 rpm por 15 min y el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 10,000 rpm por 2.5 h, el residuo de esta centrifugación representó la fracción de las membranas microsomales, las cuales fueron resuspendidas con 1.6 ml de una solución reguladora de 250 mM de sacarosa, 20 mM de DTT, y 50 mM de hidroximetilaminometano y ácido Morfolinoetanosulfónico (TRIS/MES) ajustados a pH 6.5, estas muestras fueron guardadas a -80°C para analizar posteriormente su contenido de lípidos, proteínas, fosfatos de fosfolípidos y actividad fosfolipasa D.

6.2.4.1.- Cuantificación de Proteínas.

Reactivos:

Albumina de suero bovino (Boehringer Mannheim, Alemania)

Ácido Orto fosfórico al 85 % (Merk)

Azul de Coomassie: Brilliant Blue G (Sigma)

Ácido 7-Deoxycólico (Sigma)

El contenido de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (1976), el reactivo de Bradford se preparó agregando lentamente 5 mg de azul de coomasie a una mezcla de 5mL de ácido ortofosfórico al 85% y 2.5 mL de etanol al 95%, se agitó y aforó a 50 mL. Para conocer el contenido de proteínas, a 5-10 µL de membranas microsomales contenidas en un tubo Eppendorf le fueron agregados 5 µL de desoxicolato al 0.2%, se agito y dejó reposar 10 min; enseguida se agregaron 25 µL de NaOH 0.1N, se mezcló y se dejó reposar por 10 min, posteriormente se agregó agua destilada suficiente para alcanzar 500 µL, se mezcló y adicionó 500 µL del reactivo de Bradford, se agitó y después de reposar 5 min se leyó a 590 nm, el contenido de proteínas se calculo a través de una curva patrón de albumina de suero bovino (1.0 mg/mL)

6.2.4.2.- Cuantificación de fosfatos y fosfolípidos

Los fosfatos fueron cuantificados de acuerdo al método de Ames (1966) y su conversión

Después de retiradas las placas de la cámara de corrimiento, fueron secadas en una corriente de N_2 y se revelaron con solución de 2,7 fluoresceína al 0.1% en metanol, los lípidos fueron identificados por comparación con estándares y con ayuda de una lámpara de luz UV, después fueron separados con una espátula de acero inoxidable y colocados en un tubo de ensaye con tapa de rosca.

Cuantificación.-Cada una de las fracciones separadas fueron recuperadas con 2 mL de éter de petróleo y derivatizadas, agregando 2 mL de solución de BF_3 al 12% (Metcalf et al., 1966) y 10 μ L (1.0 μ g/ μ L) de ácido heptadecanoico C 17:0 como estándar interno, la mezcla fue calentada a 70°C por 15 min, después se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregó 1.0 mL de agua destilada, nuevamente se agitó y se dejó reposar para permitir separar dos fases, la capa polar fue extraída y secada en atmósfera de N_2 , el residuo (metil esteres), se recuperó en 50 μ L de éter conteniendo el antioxidante BHT al 0.01%, la cuantificación de ácidos grasos fue realizada por CG, utilizando una inyección de 1.0 μ L en una columna Innowax, en una rampa de temperatura de 120-250°C, con un tiempo inicial de 1 min, incrementos de temperatura de 10°C/min y la temperatura final fue mantenida por 5 min; las temperaturas del inyector y detector FID fueron de 250 y 275 °C respectivamente, la velocidad de registro fue de 0.7 cm/min, la atenuación de 2.0 con área de rechazo de 2000. Los tiempos de retención se ubicaron utilizando patrones de ácidos grasos saturados (Sigma:UN-10) y de ácidos grasos insaturados (Sigma:ME-7) previamente derivatizados.

6.2.5.- Actividad Fosfolipasa D.

La actividad fosfolipasa D fue medida de acuerdo al método de Clermot y Douce (1970). 50 μ L de la suspensión de membranas microsomas fueron colocadas en tubos de ensaye con 1.25 mL de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.6 y 0.5 mL de $CaCl_2$ 60 mM, se agitaron 15 s y se agregaron o no 10 μ L de fosfatidilcolina (25 mg/mL de éter) se agitaron nuevamente y se incubaron 1.0 h a 30°C, al final, la cantidad de fosfatidilcolina residual fue extraída y cuantificada de manera similar a los lípidos de las membranas microsomas. Los resultados de actividad fosfolipasa D fueron

expresados en μ moles de colina liberado / mg de proteína.min, utilizando como patrón de actividad fosfolipasa D (Sigma) de 2500 unidades.

6.2.6.- Análisis sensorial.

El análisis sensorial fue realizado llevando una prueba de preferencia-aceptación utilizando una escala hedónica de 9 puntos con un panel de 6 jueces, consumidores habituales de este fruto (Pedrero y Pangborn, 1989), correspondiendo el valor máximo al mayor nivel de agrado y el menor valor al rechazo del producto. Frutos representativos de cada tratamiento, de A.C. y del grupo control (en madurez de consumo) fueron evaluados en sus atributos de: apariencia, color, firmeza, aroma y sabor. Posteriormente la escala hedónica del grado de aceptación fue convertida en numérica y se realizó el análisis estadístico por análisis de varianza del efecto de cada tratamiento sobre el atributo sensorial deseado.

6.2.7.- Análisis estadísticos.

Las diferencias estadísticas de las variables de respuesta entre los tratamientos aplicados y en su caso el nivel de interacción, fueron evaluadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) en diseños completamente aleatorizados y la comparación de medias siguiendo la prueba de Duncan con niveles de significancia del 95 y 99%, utilizando el programa Statgrafics versión 5.0 (Statistical Graphics Corporation, U.S.A.).

VII.-RESULTADOS Y DISCUSION

Primera etapa

7.1.- Crecimiento del fruto

Las manifestaciones del daño por frío son influidas por el grado de maduración que el fruto tiene durante su almacenamiento, siendo más fuertes en frutos verde-maduros que en frutos maduros, por esta razón se determinó el momento adecuado de cosecha (índice de madurez), contabilizando los días de floración a cosecha sugerido por Yusof y Suhaila (1987), los datos del desarrollo de fruto durante los dos períodos de producción obtenidos, formaron curvas de crecimiento doble sigmoide con tres etapas de crecimiento características. La etapa I, se caracterizó por un incremento de tamaño moderado, la etapa II, no presentó incrementos significativos y la etapa III mostró los cambios más notables hasta alcanzar el tamaño final del fruto, lo cual es acorde con lo reportado por Coombe (1976), quién describe que el primer período de crecimiento está dominado por la división celular, seguida por un período de reposo y otro final de acumulación de nutrientes. El desarrollo de los frutos del período primavera-verano requirieron 130 días para alcanzar su tamaño final, comparados con los 190 días requeridos en la época de otoño-invierno (Fig. No. 6), esta variabilidad entre las dos épocas de desarrollo, aunada a la amplitud de los períodos de floración y a la dominancia apical, entre otros factores, no permiten utilizar la edad o el tamaño del fruto como índice de madurez para la variedad "Media China".

El comportamiento en el crecimiento del fruto obtenido, coincide con los datos reportados por Srivastava y Narasimhan (1967), quienes encontraron patrones de desarrollo sigmoide simple y doble sigmoide entre variedades Hindúes. En cambio, Rodríguez et al. (1971), reportaron curvas sigmoide simples en frutos de variedades Vietnamesa y Safeda, mientras que Jagtiani et al. (1990) y Salunke et al. (1984) aunque describieron curvas sigmoide simples, hicieron notar que algunas variedades tienen comportamiento diferente. Por su parte, Chan et al. (1976), reportaron un desarrollo doble sigmoide en variedades que crecen en Malasia.

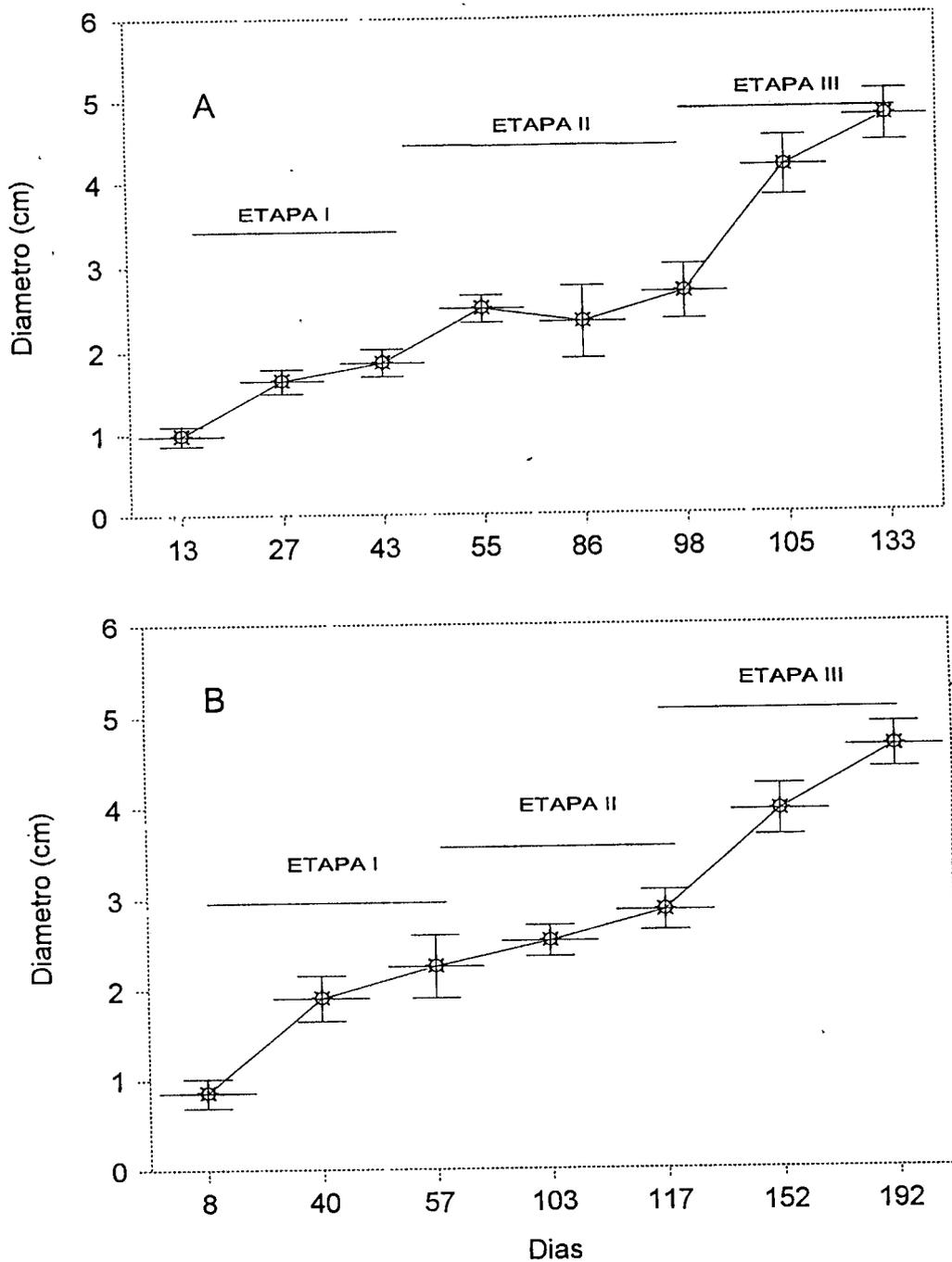


Fig. No. 6 Diámetro mayor del fruto de guayaba durante su desarrollo en los ciclos de producción primavera-verano (A) y otoño-invierno (B).

7.1.1.-Cambios en la gravedad específica.

La gravedad específica de los frutos, se modificó ligeramente durante las primeras dos

etapas de crecimiento (95 días), en un rango entre 1.05 y 1.09; el cual disminuyó al inicio de la tercera etapa, para alcanzar valores entre 1.00 y 0.97; este comportamiento coincide con el reportado por Yusof y Suhaila (1987), quienes encontraron, reducción de la gravedad específica después de los 95 días de desarrollo. Sin embargo al comparar los valores, es notable la diferencia en la madurez lograda por los frutos de las variedades reportados por Yusof y Suhaila y los empleados en este estudio, a la misma edad, los primeros habían alcanzado su madurez fisiológica y los caracterizados como Media China iniciaban la etapa III de desarrollo (Fig. No.7).

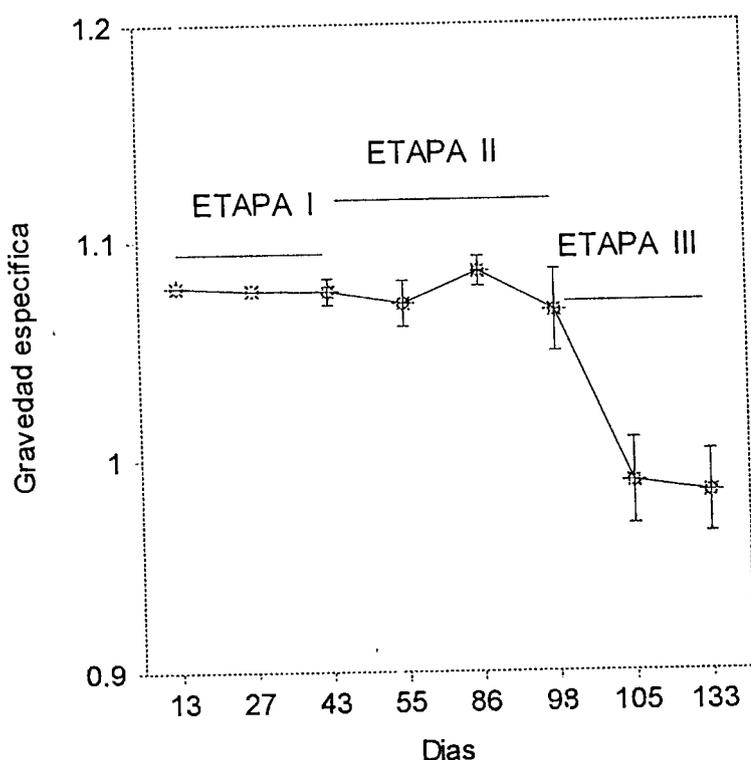


Fig. No. 7. Cambio en la gravedad específica durante el desarrollo del fruto de guayaba Media China

7.1.2.- Sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles durante el desarrollo del fruto, presentó un descenso al final de la primera etapa, la cual se mantuvo en la etapa II e incrementó notablemente al

inicio de la etapa III, en la cual paso de 8.0%, hasta alcanzar valores de 14.0 ± 3.0 °Brix (Fig. No. 8a), valores similares fueron reportados por Dhillon et al. (1987), quienes encontraron incrementos en el contenido de sólidos solubles, azúcares reductores directos y totales durante el desarrollo de los frutos de las variedades "Allahabad Safeda" y "Lucknow-49". Teatitia et al. (1970), reportaron alta correlación entre la gravedad específica y los porcentajes de sólidos solubles, acidez, azúcares y almidón con la madurez de los frutos. La representación gráfica de los valores de sólidos en los frutos empleados, mostraron un comportamiento sigmoideal similar al reportado para glucosa por Yusof y Suhaila (1987) desde el amarre hasta la semana 12, mientras que la sacarosa tendió a aumentar durante todo el desarrollo del fruto.

7.1.3.-Acidez y ácido ascórbico

Los contenidos de acidez y ácido ascórbico, presentaron valores bajos durante las dos primeras etapas del desarrollo (Figs. No. 8b y 8c), y se incrementaron durante la tercera etapa, pasando de 0.155 a 0.823 % de ácido cítrico y de 20 a 398 mg de ác. ascórbico /100g respectivamente, datos similares fueron reportados por Teatitia et al. (1970), Yusof y Suhaila (1987), Srivastava y Narasimhan (1967) y Dhillon et al. (1987). La acidez en frutos del ciclo primavera-verano fue mayor que las de otoño-invierno.

7.1.4.- Cambios de color

El color es probablemente el factor más importante para determinar la calidad de los productos agrícolas por parte del consumidor debido a que se relaciona con el resto de los atributos sensoriales (Medlicott et al., 1992), pero esta relación no siempre es directa debido a que existen factores pre cosecha y pos cosecha que lo alteran (McGuire, 1992), en el caso de guayaba, se ha reportado una relación lineal entre la pérdida del contenido de clorofila y el grado de maduración (Yusof y Suhaila, 1987) y se ha descrito una escala subjetiva que utiliza las proporciones de tonalidades de color verde y amarillo sobre la epidermis del fruto para cuantificar de manera proporcional el avance de la maduración (Brown y Wills, 1983), sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos, los frutos Media China mantenidos a temperatura ambiente, no siguieron esta escala, ya que, durante su maduración, la

manifestación de color amarillo, se presentó de forma rápida y homogénea en toda la superficie del fruto (Cuadro No.7). De las tres coordenadas de la escala internacional que definen el color, la coordenada a*, presentó valores diferentes para cada

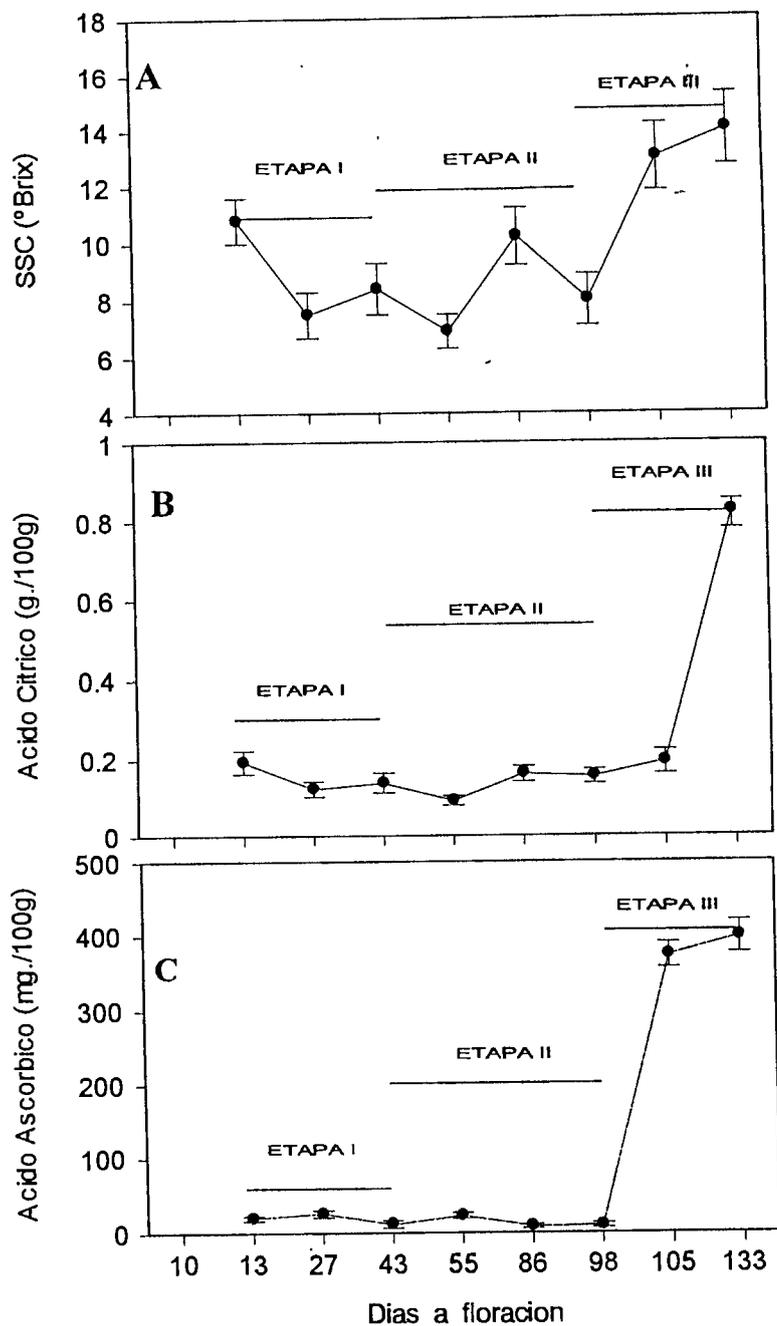


Fig No. 8. Cambio en el contenido de sólidos solubles totales (A), acidez (B) y ácido ascórbico (C) durante el desarrollo de guayaba Media China.

ablandaron durante el almacenamiento, en cambio los de madurez II y III perdieron rápidamente su resistencia y tendieron a valores similares (Figura No.10). Los datos exhibieron comportamientos similares a los reportados por Reyes y Paull (1995) para la variedad Beaumont quienes utilizando una sonda de 8 mm de diámetro y distancia de penetración de 10 mm, reportaron valores de 300, 240 y 190 N para frutos inmaduros, verde-maduros y con 25% de color amarillo en la piel respectivamente, lo cual indica que la variedad Beaumont mantiene mayor firmeza durante la maduración en comparación a los frutos Media China, no obstante en ambos casos se observan pérdidas de firmeza en función de la maduración del fruto. Por su parte, Suhaila et al. (1994), en estudios de conservación de frutos de la variedad "Vietnemesa", por la aplicación de emulsiones en la superficie y almacenados tres semanas a 10°C, utilizando una sonda de 8 mm, reportaron valores de resistencia a la penetración entre 14 y 19 kg (137-186 N). Vazquez-Ochoa y Colinas-Léon (1990) utilizando este mismo diámetro de sonda, reportaron valores iniciales de resistencia a la penetración de 25 kg (245 N) para la variedad "media China", los cuales concuerdan con los encontrados en este estudio.

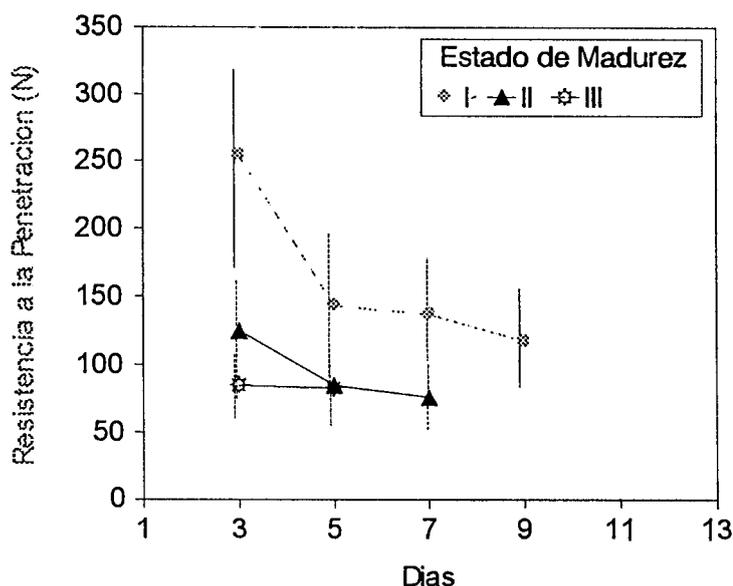


Fig. No. 10. Cambio de la resistencia a la penetración en guayaba Media China en tres estados de madurez almacenada a 20°C

7.2.3.- Contenido de sólidos solubles totales y acidez

El contenido de sólidos solubles para los tres estados de madurez, presentaron valores de 9.5 ± 2.1 , 11.9 ± 1.9 y 14.1 ± 2.9 , mientras que el contenido de acidez fué de 0.9 ± 0.1 , 0.7 ± 0.15 y 0.6 ± 0.15 , para la madurez I, II y III respectivamente, el incremento en el contenido de sólidos y la reducción de acidez, son fenómenos típicos en la maduración de los frutos, la variabilidad en los resultados encontrados fue debido principalmente a las diferencias propias de las poblaciones de frutos de guayaba Media China y la influencia de su época de producción entre otros factores, esta diversidad, no permiten utilizar el contenido de sólidos y la acidez como índices de madurez. El comportamiento de estos valores, no coincide totalmente con la propuesta de Murkherjee y Dutta (1967), quienes indicaron que el cultivar "Safeda", se encuentra en su madurez óptima cuando alcanza color amarillo paja, 11.0 °Brix, resistencia a la penetración entre 6.7 y 12.6 lbs. en el medidor Magness y una relación de azúcares:ácido entre 20.5 y 29.2, mientras que los frutos Media China continúan aumentando su volumen cuando alcanzan 11.0 °Brix.

7.2.4.- Producción de CO₂ y etileno en el fruto

Las producciones de CO₂ (mg/kg.h) y etileno ($\mu\text{L}/\text{kg.h}$) a temperatura ambiente ($20 \pm 3^\circ\text{C}$), presentaron patrones climatéricos en los tres estados de maduración durante los dos ciclos de producción (primavera-verano y otoño-invierno) (Fig. No.11). Frutos de madurez I (verde) y II (verde-amarillo) del ciclo primavera-verano, obtuvieron su valor máximo de CO₂ al tercer día después del corte, mientras que el estado III (amarillo), se presentó en el segundo día. Por otra parte, el etileno, mostró su valor más alto al tercer día en todos los casos. Durante el ciclo otoño-invierno las mayores producciones de etileno precedieron en un día en todos los casos a las correspondientes de CO₂, las cuales se presentaron hasta el sexto día. Los niveles de producción de CO₂ y etileno de este tipo de guayaba son altos y confirman las características de un fruto climatérico similares a los reportados por Akamine y Goo (1979), quienes encontraron picos climatéricos entre el tercero y sexto día con valores de 50 y 70 mL/kg.h para CO₂ y de 1 a 5 $\mu\text{L}/\text{kg.h}$ de etileno; por su parte Brown y Wills (1983) observaron que el pico de etileno precedía ocasionalmente al de CO₂ en un día en frutos cosechados en madurez fisiológica. Los valores de producción de CO₂, en frutos de

los tres estados de madurez, cosechados en el ciclo primavera-verano, se encontraron en el rango de 125 y 180 mg/kg.h, mientras que en los de otoño-invierno, fue entre 85-125 mg/kg.h. Por su parte, las producciones de etileno variaron entre 17-42 $\mu\text{L}/\text{kg.h}$ en el ciclo primavera-verano y entre 13-27 $\mu\text{L}/\text{kg.h}$ en los frutos del ciclo otoño-invierno. De los resultados de la velocidad de respiración, se deduce que el ritmo metabólico de los frutos de primavera-verano es 1.5 mayor que los que se producen en el ciclo otoño-invierno.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa del estudio, se concluye que la guayaba "Media China", tiene patrón de crecimiento del fruto doble sigmoide, y el tiempo necesario para alcanzar su volumen final, depende de la época de producción, durando 130 días para la estación primavera-verano y 190 para la estación otoño-invierno. El color expresado como índice de matiz en guayaba, permite diferenciar tres grados de madurez, correspondiendo a los frutos de color verde maduro (madurez II) con valor de H° de 105 ± 5 como los mas apropiados para la cosecha, su tamaño y gravedad específica, no definen el índice de corte para las poblaciones de estos frutos. Por sus patrones en la producción de CO_2 y etileno, los frutos "Media China" se comportan como un fruto climatérico, con un ritmo metabólico de 1.5 mayor en los frutos de primavera-verano en comparación con los que producen en el ciclo otoño-invierno, lo cual se debe principalmente a diferencias en las condiciones agroclimatológicas que influyen el desarrollo de la planta. Entre las características químicas estudiadas, el contenido de sólidos solubles, acidez total y ácido ascórbico se incrementan notablemente con el desarrollo del fruto.

Segunda Etapa

7.3.- Respuestas del fruto a bajas temperaturas

7.3.1.- Evolución del Color

La evolución del color en los frutos, presentó diferentes respuestas a la temperatura y tiempo de almacenamiento. Frutos en madurez I, con un valor inicial de índice de matiz de 116.8, almacenados por dos y tres semanas a 4°C, presentaron deficiente desarrollo de color alcanzando valores de H° de 112.1 y 109.0 respectivamente, estos mismos frutos acondicionados a temperatura ambiente por tres días, solo redujeron ligeramente sus valores de ángulo de matiz, logrando valores de 106.0 y 104.9 respectivamente, manifestando además síntomas de daños por frío, similares a los descritos por Reyes y Paull, (1995), mientras que los almacenados a 10°C, mantuvieron bajo ritmo de maduración, en ambos períodos de almacenamiento, con la tendencia a alcanzar valores de índice de matiz similares a los frutos en madurez de consumo después de dos semanas más tres días a temperatura ambiente, sin embargo algunos frutos (3%) no maduran debido a la dificultad que tienen los productores para establecer la madurez fisiológica utilizando este color, en este estado de madurez, los frutos almacenados en condiciones ambientales (20-22°C), lograron alcanzar el ángulo de matiz de madurez de consumo, después 7-13 días. Frutos en madurez II almacenados dos semanas exhibieron mejor comportamiento en el desarrollo de color, alcanzando a 4°C, valores de índice de matiz de 94.1 y 93.5 después de dos semanas y dos semanas más tres días de acondicionamiento a temperatura ambiente, sin embargo, durante la tercera semana de almacenamiento algunos frutos manifestaron daños por frío. A 10°C la evolución de color fue normal, alcanzando valores de 94.7 y 90.8 después de dos y tres semanas con su respectivo periodo de acondicionamiento, lo cual permite sugerir un sistema de conservación seguro para la guayaba "Media China", frutos en este estado de madurez almacenado a 10°C por dos semanas más tres días a temperatura ambiente; Los frutos almacenados en condiciones ambientales (20-22°C), lograron alcanzar los índices de matiz de frutos en madurez de consumo, después de una semana. En frutos con madurez III, se presentaron ligeros cambios en el ángulo de matiz después de ser almacenados dos semanas a 4°C más tres días a temperatura ambiente (93.4), pero a la tercera semana, los frutos observaron ablandamiento y pérdida de peso acelerados, además de daños en el

color. Frutos en éste estado de madurez, después de dos semanas de almacenamiento a 10°C, mostraron los primeros síntomas de senescencia, que se acrecentaron durante la semana siguiente (Cuadro No.9). Los resultados encontrados fueron similares a las reportadas por Wills et al. (1983), para las variedades "1050" y "GA 11-56", con una vida de anaquel de una semana a 20°C y de dos semanas a temperaturas entre 0 y 10°C; recomendando 5°C como la temperatura óptima para estas variedades; y concuerda también con lo reportado por Vazquez-Ochoa y Colinas-León (1990), quienes observaron daños por frío en el cultivar Media China en frutos verde-maduros (madurez I) mantenidas a temperaturas entre 3.5 y 7.0 °C, por lo que recomendaron como el mejor sistema para la conservación de ésta variedad; frutos verde-maduros almacenados por dos semanas a 10°C.

Reyes y Paull (1995), reportaron que los frutos de la variedad "Beaumont" en estado verde-maduro alcanzaron su color amarillo después de siete días de almacenamiento a 20°C o bien once días a temperaturas entre 12.5 y 15 °C; a 10°C observaron escaso desarrollo de color y bronceado en la piel. Estos autores reportaron también valores de índice de matiz de 90, 85, 82 y 68 para frutos verde-amarillo (madurez II) almacenados a temperaturas de 20, 15, 12.5 y 10 °C respectivamente, y de 90, 88, 88 y 84 para frutos de media maduración (frutos con el 50% de color amarillo en la piel) almacenados a las mismas temperaturas, concluyendo que la maduración se detiene en mayor proporción en frutos con menor grado de madurez. Al comparar los datos obtenidos en el estudio con los reportados por Reyes y Paull (1995), para la variedad "Beaumont", se observa una relación directa entre el desarrollo de la maduración con la temperatura de almacenamiento, siempre que el fruto sea cortado en el estado de madurez del fruto apropiado.

Cuadro No. 9. Evolución del ángulo de matiz en el fruto de guayaba en diferentes Condiciones de almacenamiento

Madurez	Temp °C	Período de almacenamiento (semanas a temperatura baja + días a temperatura ambiente)					
		0 + 0	1 + 0	2 + 0	2 + 3	3 + 0	3 + 3
I	4	116 + 1.6a		112 + 1.7b	106 + 1.2c	109 + 1.0d	104 + 1.4d
	10	116 + 1.2a		108 + 1.3b	106 + 1.2c	100 + 4.0d	97 + 3.7e
	20	116 + 2.1a	95 + 2.2b				
II	4	109 + 0.9a		105 + 1.4b	94 + 1.4c	98 + 1.0d	93 + 1.0d
	10	110 + 1.0a		103 + 1.3b	94 + 1.9c	94 + 1.6c	90 + 1.6d
	20	109 + 5.1a	95 + 4.1b				
III	4	100 + 1.6a		97 + 1.1b	93 + 0.7b	94 + 1.3c	90 + 1.6d
	10	99 + 2.0a		95 + 0.9b	89 + 0.9b	88 + 1.5c	85 + 1.2d
	20	99 + 4.3a	94 + 3.8b				

7.3.2. Desarrollo del daño por frío.

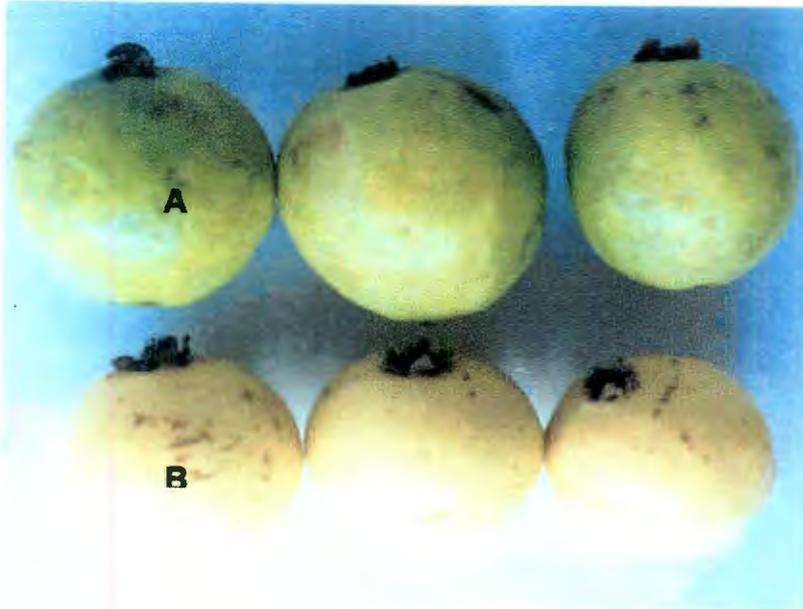
Los daños por frío en guayaba "Media China", se expresaron después de que los frutos fueron retirados de las condiciones de estrés, de manera similar a otros frutos sensibles. Para la madurez I y II fueron necesarias dos semanas a 4°C, mientras que frutos de madurez III requirieron tres semanas y frecuentemente fueron confundidos con los síntomas de senescencia. Las principales manifestaciones de daño fueron; incapacidad para madurar, obscurecimiento de la piel y pulpa, y desarrollo de olores extraños, concordando con los síntomas reportados por Reyes y Paull en 1995; se observó también mayor visibilidad de daños mecánicos, ablandamiento acelerado y mayor sensibilidad a las enfermedades (Fotografías Nos.1 y 2). Por su parte, los frutos almacenados a 10°C no presentaron daños por frío, después de estos mismos períodos de almacenamiento, pero maduraron a menor ritmo que los frutos control mantenidos a 20°C.

En general los frutos de madurez II, presentaron mejor calidad al compararlos con los frutos de madurez I y III en los dos períodos de almacenamiento probados (2 y 3 semanas). El análisis estadístico de los parámetros de evaluación sensorial mostró que el color, aspecto, aroma y sabor, fueron afectados por la temperatura, el tiempo de

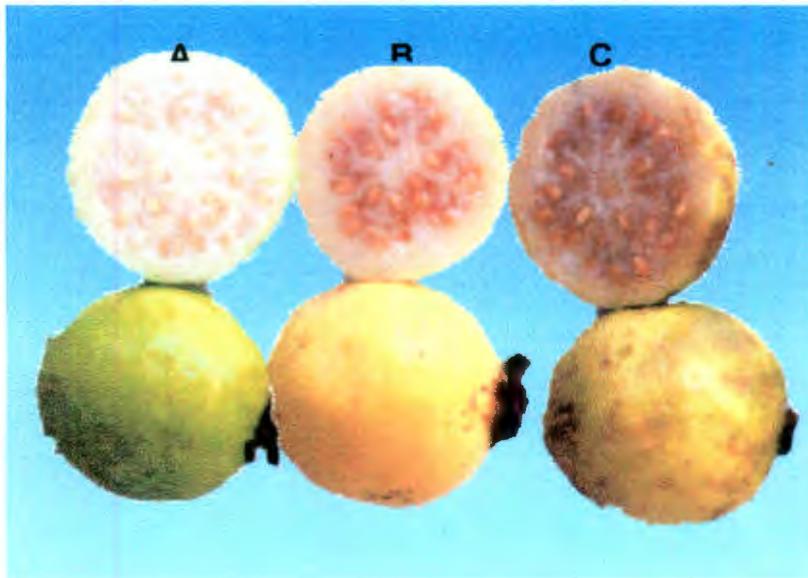
almacenamiento, y el índice de madurez de los frutos. La baja temperatura hizo más evidente la presencia y severidad de daños físicos, evitó el desarrollo de color y de los atributos de aroma, el sabor fue mantenido de manera directa al estado de madurez de los frutos; En frutos almacenados por tres semanas, se manifestaron aromas desagradables. Los frutos con índice de madurez II resistieron en mayor proporción el cambio de sabor en comparación con los otros dos estados de madurez. La interacción tiempo de almacenamiento-temperatura resulto significativa con relación a los parámetros de aspecto, color, aroma y sabor, mientras que las interacciones tiempo-índice de madurez y temperatura-índice de madurez no fueron significativas con ninguno de estos aspectos de calidad (Cuadro No. 10).

Cuadro No. 10. Significancia estadística de los factores de almacenamiento y estado de madurez sobre parámetros de calidad sensorial del fruto.

Factores	Parámetros de evaluación sensorial							
	Aspecto externo	Textura	Color externo	Aroma externo	Aspecto Interno	color interno	aroma interno	sabor
A.Tiempo	**	*	**	**	*	ns	**	**
B.Temp.	**	*	**	*	*	ns	**	*
C.Madurez	*	ns	**	ns	*	ns	**	*
Interacc.								
AB	*	ns	*	**	*	ns	*	**
AC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns



Fotografía No. 1. Apariencia externa de frutos de guayaba almacenada por 2 semanas a 4 (A) y 10°C (B).



Fotografía No. 2. Apariencia externa de frutos de guayaba almacenada por 3 semanas a 4 (A) y 10°C (B) y 3 semanas a 4°C más 3 días a 25°C (C).

7.4.- Control de Daños por frío a través de Atmósferas controladas.

7.4.1. Observaciones preliminares.

Debido a la escasa información sobre el efecto de la aplicación de atmósferas controladas en guayaba, los ensayos preliminares mostraron que concentraciones menores de 10% en O₂ y mayores de 5% de CO₂ por 24 horas, provocan escasa evolución de color, menor producción de etileno y daños en la calidad del fruto después de una semana de almacenamiento a 20°C. De manera general, los daños por la aplicación de estas A.C. "extremas", fueron mayores en los frutos tratados con 20% de CO₂, seguidos por los tratamientos de 5% de O₂, 10% de CO₂, 5% CO₂, 10% O₂ y finalmente el grupo control (Cuadro No.11).

Cuadro No. 11. Angulo de matiz en guayaba Media China con tratamiento de A.C. "extremas" después de almacenamiento

Tratamiento de A.C.	Angulo de matiz	
	1 semana a 20°C	3 semanas a 4°C + 3 días a 20°C
Control	91.42c	98.49a
5% O ₂	92.96b	95.77bc
10% O ₂	91.58c	93.27e
5% CO ₂	92.21c	94.00de
10% CO ₂	92.73b	94.92cd
20% CO ₂	96.15a	96.49b

La evolución de color (ángulo de matiz), fue mayor en los frutos tratados con 10% de O₂ y 5% de CO₂, seguidos de los tratamientos de 5% de O₂, 10% de CO₂ y finalmente los que recibieron la aplicación de 20% CO₂.

La aplicación del CO₂ redujo la producción de etileno en mayor proporción que los tratamientos de O₂, (Figura No. 12), este comportamiento coincidió con el reportado por Pal y Buescher (1993) para un fruto similar a la guayaba (feijoas californianas; *Feijoa sellowiana* Berg.), quienes encontraron que tratamientos altos de CO₂ podrían ayudar a mantener el fruto por períodos mas largos debido al efecto inhibitorio de este gas sobre la acción del etileno. Los tratamientos de 20 y 10% de CO₂ por 24 h provocaron también

la aparición de aromas y sabores desagradables, característicos de la fermentación etílica, mientras que el tratamiento de 5% de O₂, mantuvo los frutos firmes pero ácidos, por lo que se infirió que tratamientos $\geq 10\%$ de CO₂ o $\leq 5\%$ de O₂, pueden provocar daños en los frutos con baja aceptación de consumo después de una semana de almacenamiento a 20°C. Por esta razón, en experimentos posteriores con el objeto de reducir los procesos fisiológicos y bioquímicos del fruto por efecto del CO₂ y evitar daños atribuidos a la nula o baja concentración de O₂, (Kader et al., 1986., Mathooko, 1996a), los tratamientos aplicados fueron con 10% de O₂, 5% de CO₂ y la combinación de estos, los frutos con estos tratamientos, mantenidos en almacén por dos semanas a 4°C y su transferencia a 20°C, presentaron valores altos de aceptación para su consumo.

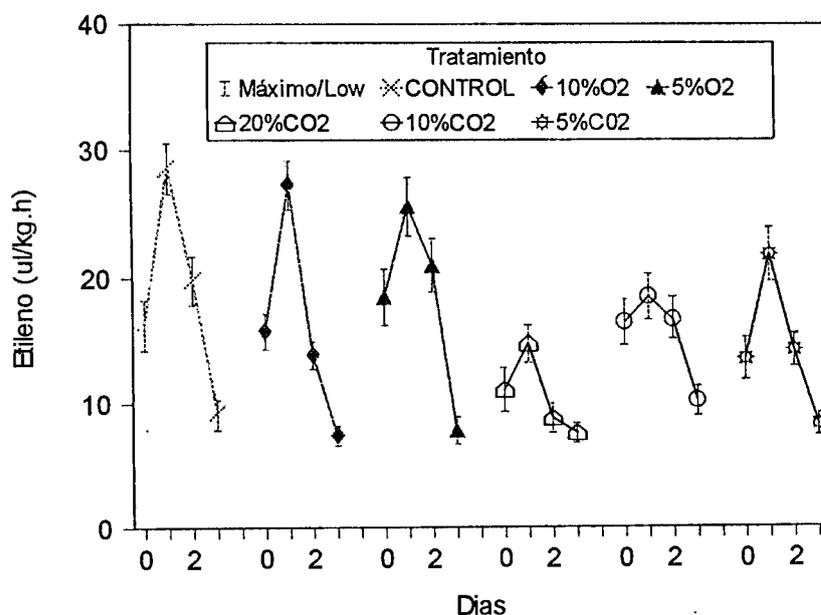


Fig. No. 12. Producción de etileno en frutos de guayaba tratados con A.C"extremas" por 24 h y mantenidos a temperatura ambiente.

7.4.2.- Desarrollo de color en frutos con tratamientos de A.C.

De manera general, el cambio de color fue influido en mayor grado por el efecto de la temperatura y en menor proporción por la acción de los gases; los tratamientos de 5% de CO₂ y la mezcla de 10% de O₂ + 5% de CO₂, retrasaron el desarrollo de color

superiores al tratamiento de 10% de O₂ y al grupo control, con valores 43 ± 9 N. En este mismo período y a temperatura de 10°C, solo los frutos del tratamiento de 5% de CO₂ alcanzaron valores de 40 ± 12 N, mientras que el resto se encontraron en el rango de 30 ± 9 N.

De manera general, los resultados mostraron mayor resistencia a la penetración en una relación inversa a la temperatura de almacenamiento, similares a las anotadas en su oportunidad por Reyes y Paúl (1995) y Paúl y Ago (1983) y el tratamiento de 5% de CO₂ por 24 h, permitió mantener la firmeza del fruto por períodos más largos de almacenamiento que el resto de los tratamientos de A.C. aplicados.

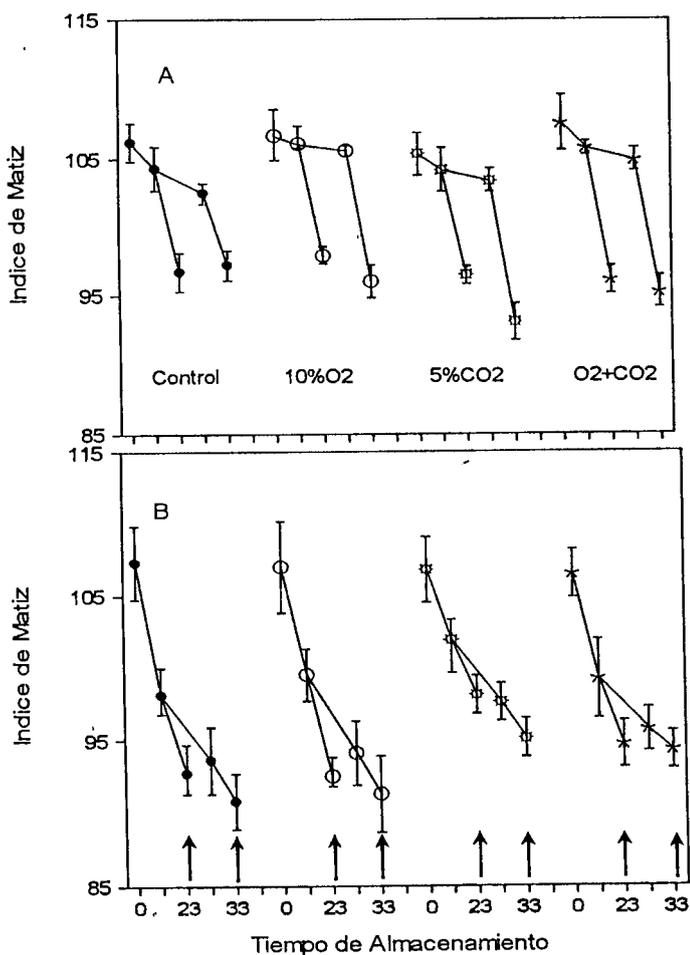


Fig. No. 13. Efecto de las A. C. y tiempo de almacenamiento a 4°C (A) y 10°C (B) más de tres días a 20°C (↑) sobre el ángulo de matiz en guayaba.

7.4. 4.- Cambio de sólidos solubles y acidez por efecto de tratamientos de A.C.

Los tratamientos de A.C. y los períodos de almacenamiento por dos y tres semanas a temperaturas de 4 y 10°C, no afectaron el contenido de sólidos solubles y acidez titulable de los frutos, los intervalos de sólidos solubles totales y acidez fueron de 10.7 ± 2.4 °Brix y de 1.28 ± 0.19 % (ác. cítrico en tejido fresco) respectivamente (Cuadros Nos. 12 y 13), los resultados obtenidos fueron similares en el contenido de sólidos a los reportados por Kumar y Hoda (1974) y Wilson (1980), la acidez fue ligeramente mas alta a la encontrada por Wilson (1980) y menores a los encontrados por Kumar y Hoda (1974).

Cuadro No. 12. Cambios en firmeza, acidez y sólidos solubles en guayabas después de dos semanas con tratamiento de A.C.

Tratamiento / 4°C	Firmeza (N)	SST (%)	Acidez(%)
Control	53.5±12 a	11.0 ± 0.8 a	1.3 ± 0.2 a
10% O ₂	50.0±13 b	11.4 ± 1.2 a	1.4 ± 0.15 a
5% CO ₂	63.6±15 a	10.5 ± 0.7 a	1.4 ± 0.25 a
10% O ₂ + 5% CO ₂	58.5±16 a	10.8 ± 1.0 a	1.3 ± 0.25 a
Tratamiento/10°C			
Control	41.2±20 b	11.2 ± 1.1 a	1.3 ± 0.3 a
10% O ₂	42.8±15 b	10.7 ± 1.0 a	1.2 ± 0.35 a
5% CO ₂	53.4±10 a	10.9 ± 0.6 a	1.4 ± 0.2 a
10% O ₂ + 5% CO ₂	45.8±19 b	10.6 ± 1.3 a	1.3 ± 0.5 a

Cuadro No. 13. Cambios en firmeza, acidez y sólidos solubles en guayabas después de tres semanas con tratamiento de A.C.

Tratamiento / 4°C	Firmeza (N)	SST (%)	Acidez(%)
Control	43.4±20 b	11.2 ± 1.6 a	1.2 ± 0.20 a
10% O ₂	43.9±24 b	10.8 ± 1.0 a	1.2 ± 0.15 a
5% CO ₂	61.1±80 a	10.7 ± 0.9 a	1.4 ± 0.15 a
10% O ₂ + 5% CO ₂	58.0±19 a	11.1 ± 1.2 a	1.3 ± 0.20 a
Tratamiento / 10°C			
Control	32.1±22 b	11.1 ± 1.4 a	1.1 ± 0.15 a
10% O ₂	32.1±18 b	11.0 ± 1.6 a	1.1 ± 0.15 a
5% CO ₂	40.7±24 a	10.6 ± 1.6 a	1.2 ± 0.12 a
10% O ₂ + 5% CO ₂	30.0±19 b	11.6 ± 1.3 a	1.2 ± 0.10 a

7.4.5.-Efecto de las A.C. sobre la producción de CO₂ y etileno

La aplicación de A.C. promovió el incremento de la respiración en los frutos mantenidos a 20°C, de forma particular, las concentraciones de 5% de CO₂ y 5% de CO₂ + 10% de O₂, retrasaron en un día el pico máximo de CO₂ (Fig. No. 14).

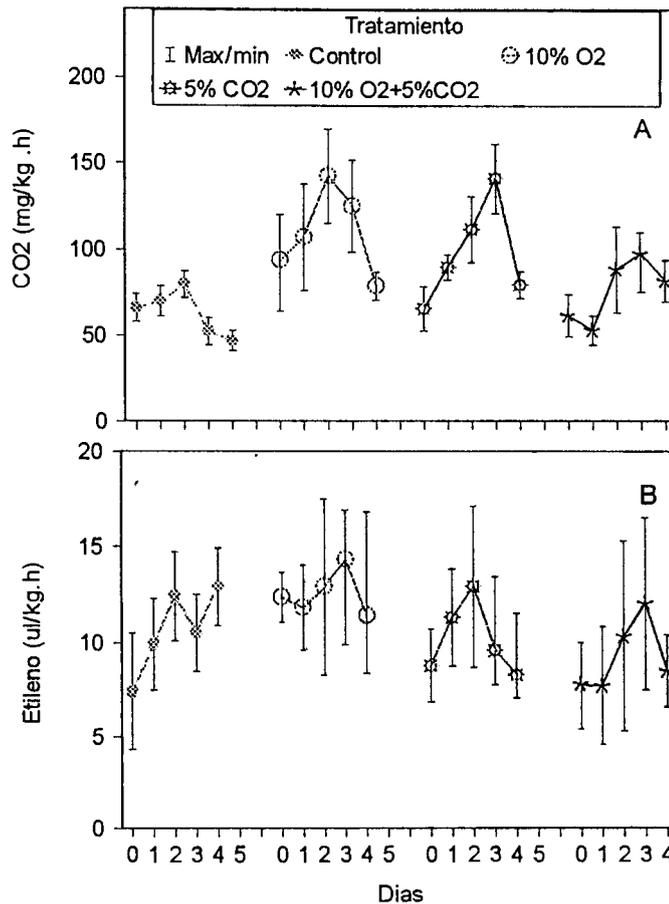


Fig. No. 14 Producciones de CO₂ (A) y etileno (B) de guayaba mantenidas a temperatura ambiente (20°C) después de su tratamiento con A.C.

Los frutos almacenados a 4°C por dos semanas presentaron picos climatéricos al día siguiente de ser transferidos a temperatura ambiente, con excepción del tratamiento de 5% de CO₂, que retraso un día este valor máximo (Fig. No. 15 A); este tratamiento y la mezcla de 10% de O₂ + 5% de CO₂, presentaron baja producción de CO₂ (60 mg/kg.h), en comparación con los frutos testigo y de 10% de O₂ (85 mg/kg.h). Después de tres semanas

a esta misma temperatura, todos los tratamientos mostraron su pico climatérico al siguiente día de ser transferidos a temperatura ambiente (Fig. No. 15 B).

Los frutos de todos los tratamientos después de dos semanas de almacenamiento a 10°C al de ser transferidos a temperatura ambiente, presentaron al primer día su producción más alta de CO₂ con valores similares (80 mg/kg.h), disminuyendo posteriormente (Fig. No.15 C). Después de tres semanas, los frutos del tratamiento control y de 10% de O₂ presentaron incrementos en su producción de CO₂ debido a contaminación microbiana, mientras que los frutos tratados con 5% de CO₂ y la mezcla de gases mantuvieron constante su producción (Fig. No.15 D).

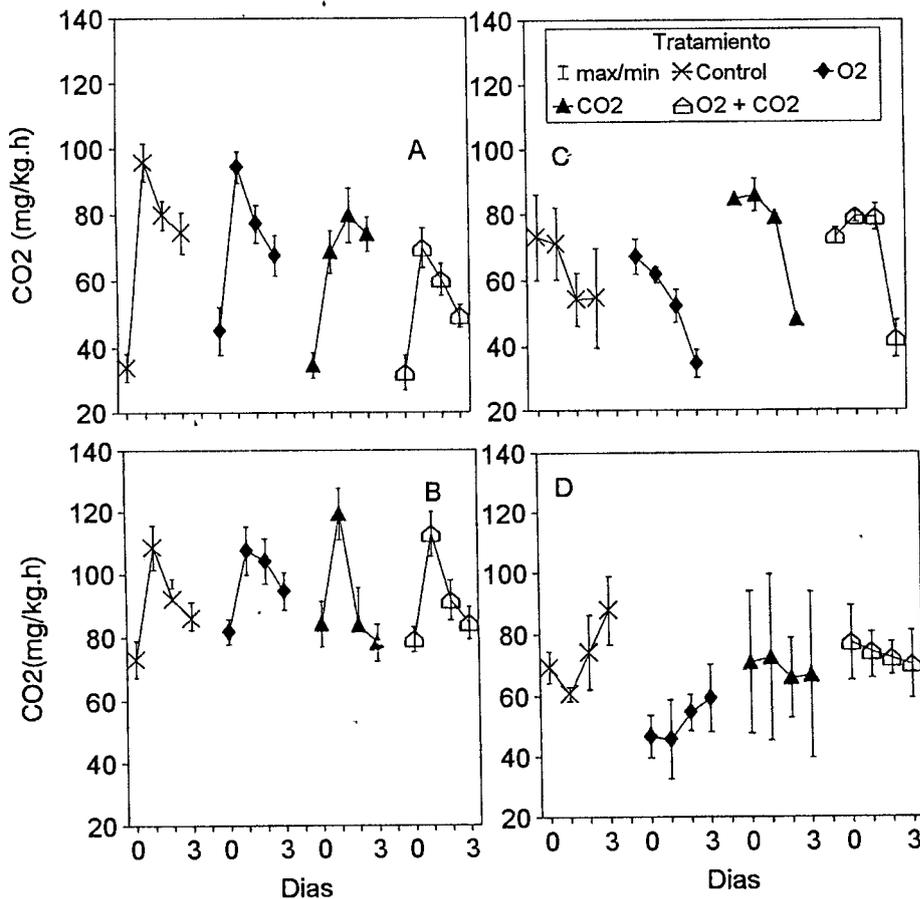


Fig. No 15 Efecto de las A. C. y tiempo de almacenamiento sobre la producción de CO₂ después de dos y tres semanas a 4°C (A, B) y 10°C (C, D).

De manera general, se observa que la aplicación de tratamientos de A.C. "extremas" reduce la producción de etileno y retrasa un día en el pico climatérico, en comparación a los frutos control (Fig. No.12), el tratamiento con 20% de CO₂ presentó la reducción más fuerte, similar a la reportada por Chavez-Franco y Kader (1993) en peras "Bartlett". Por su parte, los tratamientos "moderados" modificaron de forma diferente la producción de etileno, en los frutos retirados después de dos semanas a 4°C, todos presentaron su pico climatérico al tercer día después de ser transferidos de su almacenamiento a baja temperatura a la temperatura ambiente, sobresaliendo la baja producción de etileno en las muestras correspondientes al 5% de CO₂ (Fig. No.16A). Luego de tres semanas de almacenamiento, los picos climatéricos se presentaron al primer día en los frutos control y en la mezcla de 10% de O₂ + 5% de CO₂, mientras que los tratamientos de 10% de O₂ y 5% de CO₂, su valor mas alto se presentó al tercer día de ser transferidas a la temperatura ambiente (Fig. No.16 B); el tratamiento con 5% de CO₂ mantuvo niveles bajos de producción de etileno en ambos períodos de almacenamiento. En los frutos almacenados por dos semanas a 10°C, los tratados con 5% de CO₂, aunque presentaron una producción de etileno similares al resto de los tratamientos, retrasaron en un día su pico climatérico (Fig. No.16C), pero después de tres semanas los frutos de todos los tratamientos se encontraban en etapa de senescencia y no presentaron incremento en la producción de etileno (Fig. No.16 D).

Los resultados encontrados indicaron que los tratamientos con CO₂ tuvieron efecto sobre la producción de etileno y en menor escala sobre la tasa de respiración. Estos resultados coinciden con los encontrados en frutos de feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg), los cuales bajo tratamientos con CO₂ no alteraron su patrón de respiración pero si redujeron su producción de etileno (Pal y Buescher, 1993).

7.4.6.-Efecto de las A.C. sobre la calidad del fruto

Los frutos tratados con A.C., después de dos semanas de almacenamiento a baja temperatura y 3 días a temperatura de acondicionamiento, mantuvieron su calidad con relación al aroma, aspecto, color y sabor (7.75 ± 0.65) sobresaliendo los frutos de los

tratamientos de 5% CO₂ y 10% de O₂. Después de tres semanas de almacenamiento a 4°C, la calidad de los frutos se redujo en forma general (6.54 ± 0.66); sin embargo, los tratamientos de 5% de CO₂ y 10% de O₂ nuevamente conservaron mejor sus cualidades. De acuerdo a los datos obtenidos, las concentraciones "extremas" (menores de 10% en

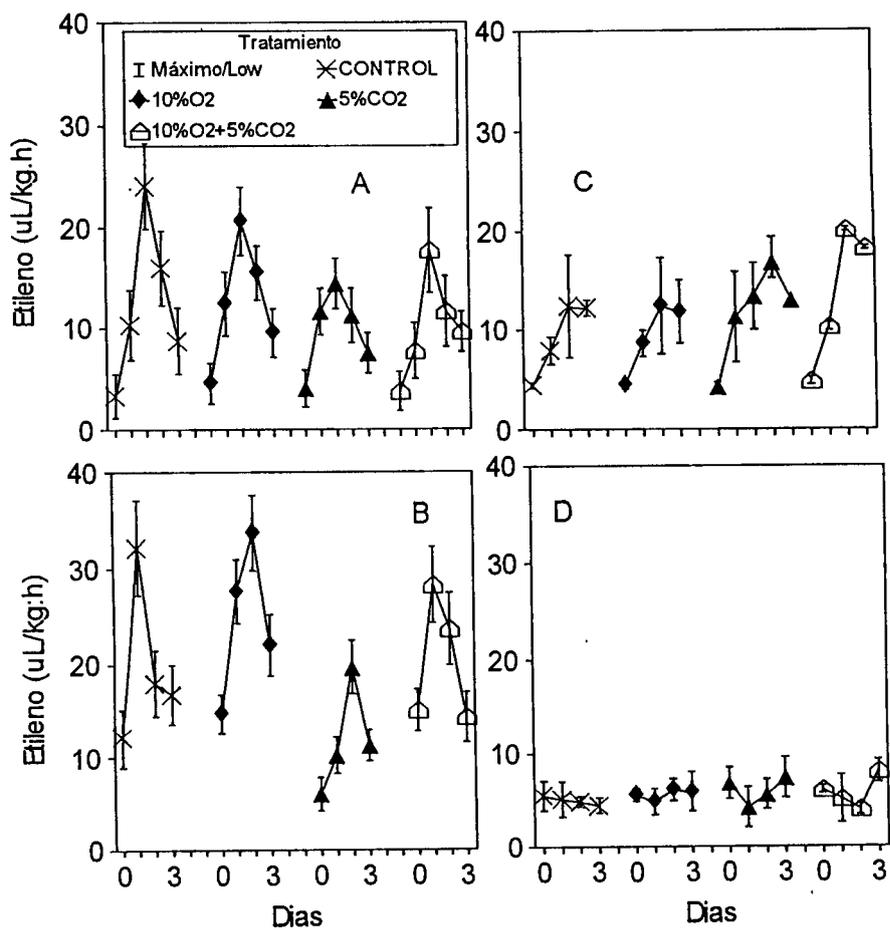


Fig. No. 16. Efecto de las A. C. y tiempo de almacenamiento sobre la producción de etileno después de dos y tres semanas a 4°C (A, B) y 10°C (C, D).

O₂ y mayores de 5% de CO₂, por 24 horas) provocan daños por estrés, lo cual contrasta con las empleadas para el control de daño por frío en otros frutos y hortalizas; tales como 40% CO₂ por 3 días en limón (Bertolini et al., 1991) y 3% O₂ por 24 horas en aguacate (Pesis et al., 1994a), lo cual sugiere que la guayaba es sensible a concentraciones extremas de estos gases. En cambio la aplicación de concentraciones de gases más

cercanas a las del aire pueden detener el metabolismo del fruto incluyendo las relacionadas con los daños por frío; valores similares a los encontrados han sido utilizadas para conservar tejidos en crecimiento como en el caso de brócoli (8.5% de CO₂ y 2.5% de O₂) reportada por Makhlouf et al., (1990), o para frutos suaves como chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), en la cual concentraciones de 10 y 15% de O₂ retrasan el pico climatérico en este fruto mantenido a 10°C (Palma et al., 1993), mientras que tratamientos de tres días en atmósferas de 20% de CO₂ y 20% de O₂ mantienen la calidad del fruto almacenado a 6°C, previniendo el ablandamiento y la senescencia del fruto (Escribano et al., 1997); el comportamiento de estos frutos a tratamientos cortos de A.C. sugieren un largo efecto residual de los gases empleados.

Tercera etapa

7.5.- Efecto de la temperatura de almacenamiento y concentración de O₂ y CO₂ sobre la fracción lípidica de las membranas microsomales y la actividad fosfolipasa D.

7.5.1.-Contenido de proteínas, fosfolípidos y membranas microsomales (m.m.)

Después de someter los frutos a los tratamientos de A.C y tres semanas de almacenamiento a temperaturas de 4 o 10°C más tres días a temperatura ambiente, los datos obtenidos mostraron que tanto la temperatura como la concentración de gases afectaron ligeramente el contenido de membranas microsomales, proteínas y fosfolípidos de los tejidos (Cuadro No.14). Los frutos almacenados a 10°C mantuvieron mayores cantidades de membranas en comparación con los frutos almacenados a 4°C y con los almacenados por una semana a 20°C (madurez de consumo), debido al daño celular inducido por la baja temperatura (Marangoni et al., 1989) y al mayor ritmo metabólico de los frutos a la temperatura ambiente. Los tratamientos con 5 % de CO₂, redujeron la pérdida de membranas microsomales; por su parte, los frutos con marcado daño por frío y con tratamiento de mezcla de gases 10 % de O₂ + 5 % de CO₂ almacenados a 4°C, fueron los que sufrieron mayores pérdidas de membranas microsomales. El contenido de fosfolípidos, presentó un comportamiento similar a las membranas microsomales en función a la temperatura de almacenamiento, lo cual es una evidencia de pérdida de lípidos de la membrana microsomal, similar a la reportada por Sharom et al. (1994). Nuevamente se observó mayor contenido de estos compuestos en las membranas microsomales obtenidas de los tratamientos con 5 % de CO₂ en ambas temperaturas y en los frutos en madurez de consumo. El menor contenido de fosfolípidos fue para los frutos con severos daño por frío y los no tratados con A.C., comportamientos similares fueron reportados por Nguyen y Mazliak (1990), en tomate almacenado a temperatura de daño por frío (4°C), debido a pérdidas de galactolípidos y de fosfolípidos; Whitaker (1995), encontró también pérdidas de galactolípidos en frutos de pepino almacenados a 2°C. La cantidad de proteína en frutos almacenados a 4°C fue ligeramente mayor que la encontrada en frutos de 10°C, debido posiblemente a una respuesta metabólica para compensar el efecto de la baja temperatura o estar relacionado con el retraso en la actividad de proteasas, similares a las reportadas en frutos de chirimoya (Montero et al.,

1995) entre los tratamientos de A.C.aplicados, nuevamente el tratamiento de 5 % de CO₂, logró mantener mayor contenido de proteínas.

En resumen, el tratamiento 5 % de CO₂, logró mantener mayor contenido de fosfolípidos y proteínas, seguido por la mezcla de gases y finalmente el tratamiento de 10% de O₂, este comportamiento fue análogo al informado por Makhlouf et al. (1990), Quien utilizó el tratamiento de 8.5 % de CO₂ y 2.5% de O₂ para detener la pérdida de fosfolípidos en brócoli e incrementar ligeramente el grado de saturación de los ácidos grasos, confirmando así el beneficio de la aplicación de algunos tratamientos de A.C. moderados o por períodos cortos en la conservación de algunos productos hortofrutícolas como: aguacate, piña, tomate y calabaza (Wang, 1994., Ratanachinakorn et al., 1997).

Cuadro No. 14. Contenido de fosfolípidos y proteínas en membranas microsomales de guayaba después del tratamiento de A.C. y almacenamiento de tres semanas a 4 y 10°C más tres días a 20°C.

Tratamiento	Proteína (mg/mL ^a)	Fosfolípidos (mg/mL ^a)	Rel. Proteína: Fosfolípidos	Rendimiento m.m. ^a (μL/g)	μg proteína /g tejido
4°C					
Control	2.4375 bc	16.7307 bc	0.1456 ab	1.9833 a	4.834 b
10% O ₂	2.6575 de	17.2270 d	0.1542 cd	2.0583 b	5.470 c
5% CO ₂	3.5050 g	19.0135 e	0.1843 f	2.1166 b	7.418 e
10% O ₂ +5% CO ₂	2.6825 e	17.5425 d	0.1528 cd	1.9833 a	5.320 c
fruto con daño severo*	2.0925 a	15.0587 a	0.1389 a	1.9333 a	4.045 a
10°C					
Control	2.3300 b	16.5080 b	0.1411 ab	2.0333 b	4.737 b
10% O ₂	2.5175 c	17.0845 cd	0.1473 bcd	2.0916 b	5.265 c
5% CO ₂	3.2500 f	18.8127 e	0.1727 e	2.2083 c	7.177 d
10% O ₂ +5% CO ₂	2.5450 cd	17.3110 d	0.1469 bcd	2.0416 b	5.196 c
Temp. Amb.					
Fruto en madurez de consumo**	3.7375 h	19.2100 e	0.1946 g	2.0333 b	7.599 e

^a Membranas microsomales (m.m.)

* Frutos almacenados por cuatro semanas a 4°C y daños por frío severos

** Frutos en madurez de consumo (una semana a 20°C)

7.5.2.-Efecto de la aplicación de A.C. sobre el contenido de Acidos Grasos.

7.5.2.1. Contenido de ácidos grasos en frutos con y sin daño por frío.

El contenido de ácidos grasos fue modificado por efecto de la temperatura, los datos obtenidos muestran que los frutos almacenados a temperatura ambiente (una semana) al alcanzar la madurez de consumo, obtuvieron un total de 0.394 μg de ácidos grasos totales / g de m.m., de los cuales el 42% pertenecieron al grupo de los ácidos "saturados" (16:0, 16:1 y 18:0), distribuidos de manera casi homogénea con valores cercanos a 14.0% de cada uno de ellos; el 58% restante perteneció al conjunto de ácidos insaturados, correspondiendo 16% al ácido 18:1, 19.5% al 18:2 y 22.5% al 18:3, respectivamente. El fosfolípido mayoritario fue la FC con el 33.7% seguido por el FI y AF con 11.5% cada uno, el resto presentó valores entre el 7.7 y 10.2%. Por su parte, los frutos almacenados a 4°C por tres semanas que manifestaron un severo daño por frío, no alcanzaron su madurez normal y presentaron un total de 0.223 μg de ácidos grasos totales / g de m.m., lo cual representa solo el 52% de los ácidos grasos contenidos en un fruto en madurez de consumo, estos ácidos fueron distribuidos en 24.6% de saturados y 75.4% de insaturados, lo que marca un cambio significativo en el nivel de oxidación de ácidos grasos, ya que el contenido de saturados paso de 0.165 a 0.056 μg de ácido grasos saturados / g de m.m. Las mayores pérdidas de ácidos grasos en frutos con severo daño por frío fueron de ácido 18:2, seguidas por los ácidos saturados (16:0, 16:1 y 18:0) y finalmente por los 18:3 y 18:1(Cuadro No. 15).

Estos resultados, sugieren que al igual que en otros frutos, los síntomas de daños por frío en guayaba "Media China" involucran la pérdida de permeabilidad de la membrana por pérdida de lípidos e incremento en el índice de dobles enlaces calculado como: $\text{IDE}=[(\%C18:1)+2(\%C18:2)+3(\%C18:3)]$, de manera similar al reportado para pepino (Parking y Kuo, 1989). Por su parte, Bergevin et al. (1993), encontraron que los daños por frío en tomate verde-maduro causaron pérdidas del porcentaje de ácido linolénico (18:3) y aumentaron el IDE de los lípidos totales, pero no encontraron modificaciones en el contenido de fosfolípidos y supusieron que este efecto era debido a pérdidas en

galactolípidos, sin embargo, por la temperatura (1°C) utilizada por estos autores, se infiere escasa o nula maduración de los frutos con inhibición parcial de la síntesis de galactolípidos sugerida por Yu y Willemont (1997). Los datos obtenidos confirman que la guayaba "Media China", en su estado de madurez óptimo, alcanza el mayor nivel de ácidos grasos totales con una proporción de grasos saturados cercana a la de insaturados como fue ha sido reportado por Prasad y Azeemoddin (1994), mientras que la baja temperatura puede potenciar su oxidación e inducir la transición y separación lateral de las fases de lípidos, como síntomas de los daños por frío.

Whitaker (1992), en un estudio sobre daños por frío en pericarpio de tomate en dos estados de madurez (II) y IV) almacenados a 15°C y 2°C por cuatro días, reportó que a 15°C, el contenido de fosfolípidos presentó pérdidas entre el 10-15%, mientras que en los frutos que fueron mantenidos a 2°C, estos aumentaron entre el 7 y el 11%, durante los primeros cuatro días para después bajar hacia el día 12 de almacenamiento; la cantidad de galactolípidos presentó pérdidas tanto a 15 como a 4°C, siendo mayor a 15°C (25-35%), y fue mas acelerada para frutos en la etapa (IV), en comparación con los de la etapa (II), a los 4 y 12 días de almacenamiento. El índice de insaturación de ácidos grasos se incrementó en plástidos y membranas microsomales en ambas temperaturas, la relación MGDG/DGDG disminuyo notablemente a 2°C pero no 15°C (Whitaker, 1993), cambios similares fueron detectados en pimientos almacenados a 2°C, con mayor pérdida de galactolípidos en comparación con los fosfolípidos, lo cual permite suponer que los daños ocurren principalmente sobre la membrana de los cloroplastos (Whitaker, 1995).

Cuadro No. 15. Contenido de ácidos grasos (ng de ácido graso/ g de muestra) en membranas microsomales de tejido de guayaba con y sin daño por frío

ng de ácido graso/ g de muestra										
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SUMA	SUMA 16:0+ 16:1+18:0	SUMA 18:1 +18:2+18:3	RELACION INSAT / SAT
Fruto Control										
FI	9.351	7.092	7.777	9.259	8.518	9.259	51.259	24.222	27.037	1.12
MGDG	1.145	1.636	2.424	7.939	9.393	8.242	30.781	5.206	25.575	4.91
FC	16.323	9.734	13.655	12.263	26.312	28.289	106.578	39.713	66.865	1.68
FG	6.742	7.771	8.666	6.171	4.171	13.038	46.561	23.180	23.380	1.00
FE	3.878	9.204	4.365	6.078	4.982	7.670	36.179	17.448	18.731	1.07
CL	9.276	7.717	6.159	7.643	8.615	4.842	44.256	23.153	21.102	0.91
AF	8.417	9.383	9.715	8.625	7.440	6.492	50.075	27.516	22.559	0.82
DGDG	1.841	1.716	1.386	6.108	8.217	9.240	28.511	4.943	23.567	4.76
Suma	56.976	54.257	54.151	64.090	77.652	87.075	394.203	165.384	228.818	1.38
Fruto con daño										
FI	3.677	1.924	2.821	2.251	2.285	3.504	16.463	8.423	8.040	0.95
MGDG	0.338	0.666	0.712	0.612	0.411	5.454	8.188	1.710	6.4784	3.78
FC	5.985	2.411	3.919	19.363	33.894	15.093	80.667	12.316	68.350	5.55
FG	0.509	10.400	4.509	9.935	1.558	12.666	39.578	15.418	24.160	1.56
FE	0.945	1.186	1.849	9.213	1.248	16.475	30.918	3.981	26.937	6.76
CL	0.658	1.757	1.791	1.393	4.088	3.260	12.951	4.208	8.743	2.08
AF	4.134	2.322	2.718	9.500	6.807	8.618	34.100	9.175	24.925	2.72
DGDG										
Suma	16.249	20.661	18.322	52.269	50.294	65.072	222.870	55.233	167.636	3.01

FI.-Fosfatidilinositol, MGDG.- Monogalactosildiacilglicerol, FC.- Fosfatidilcolina, FG.-Fosfatidilglicerol, FE.-Fosfatidiletanolamina, CL.-Cardiolipina, AF.-Acido fosfatídico, DGDG.-Digalactosildiacilglicerol

Cuadro No. 16. Contenido de ácidos grasos (ng de ácido graso/ g de muestra) en membranas microsomales de guayaba almacenada a 4 y 10°C.

ng de ácido graso/ g de muestra										
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SUMA	SUMA 16:0+ 16:1+18:0	SUMA 18:1 +18:2+18:3	RELACION INSAT / SAT
Testigo 4°C										
FI	3.952	2	2.547	1.132	2.299	3.012	14.945	8.5	6.445	0.75
MGDG	0.363	0.648	0.997	8.666	10.307	6.925	27.909	2.009	25.899	12.95
FC	0.588	1.335	4.220	12.410	20.909	9.376	48.841	6.145	42.696	6.94
FG	0.879	1.252	2.010	8.842	22.857	7.222	43.064	4.142	38.921	9.40
FE	0.890	1.920	3.256	4.699	1.349	5.307	17.423	6.067	11.356	1.87
CL	0.389	1.148	1.138	3.747	19.076	12.064	37.566	2.676	34.889	13.06
AF	2.826	2.260	3.782	25.563	3.482	6.611	44.526	8.869	35.656	4.02
Suma	9.889	10.567	17.953	65.062	80.282	50.520	234.276	38.411	195.865	5.07
Testigo 10°C										
FI	3.677	1.924	2.821	2.541	2.285	3.504	16.753	8.423	8.330	0.99
MGDG	2.38	0.66	1.24	1.612	4.211	5.454	15.558	4.28	11.278	2.63
FC	0.754	1.411	9.197	15.259	16.894	17.018	60.535	11.362	49.172	4.32
FG	0.509	6.104	4.509	6.935	11.558	6.866	36.482	11.122	25.360	2.28
FE	0.945	1.186	1.849	9.213	12.487	8.647	34.330	3.981	30.348	7.62
CL	0.658	1.757	1.791	8.935	10.888	2.260	26.293	4.208	22.085	5.25
AF	3.2	2.573	5.652	9.223	9.857	6.571	37.078	11.426	25.652	2.25
DGDG	0.290	0.178	0.136	0.226	3.913	2.688	7.433	0.606	6.827	11.25
Suma	12.416	15.796	27.197	53.947	72.096	53.011	234.465	55.409	179.056	3.23

FI.-Fosfatidilinositol, MGDG.- Monogalactosildiacilglicerol, FC.- Fosfatidilcolina, FG.-Fosfatidilglicerol, FE.-Fosfatidiletanolamina, CL.-Cardiolipina, AF.-Acido fosfatídico, DGDG.-Digalactosildiacilglicerol

7.5.2.2. Contenido de ácidos grasos en frutos tratados con A.C.

El contenido final de ácidos grasos totales en frutos control almacenados a 4 y 10°C por tres semanas presentaron valores similares (0.234 μg de ácido grasos / g de m.m.), pero menores a los encontrados en frutos en madurez de consumo (0.394 μg de ácidos grasos totales / g de m.m.), en ambos casos, la cantidad de ácidos grasos insaturados presentó una proporción alta en relación a la de ácidos grasos totales; 83.4% (0.196 μg de ácido grasos / g de m.m.), a los frutos almacenados a 4°C y de 76.5% (0.179 μg de ácido grasos / g de m.m.), a los almacenados a 10°C. En ambas temperaturas, el contenido mayoritario de ácidos grasos correspondió a la fosfatidilcolina, los lípidos en menor presentación en frutos almacenados a 4°C fueron; FI, FE y MGDG y no se detectó la presencia de DGDG, mientras que a 10°C, fueron DGDG, MGDG y FI, lo cual respalda la idea de inhibición de la biosíntesis de galactolípidos por efecto de la baja temperatura (Nguyen y Mazliak, 1990., Yu y Willemont, 1996). Los ácidos grasos "saturados" 18:0, 16:1 y 16:0 exhibieron valores ligeramente mas altos, en función directa a la temperatura de almacenamiento utilizada, con la consecuente baja en el contenido de los ácidos 18:1 y 18:2, sin embargo, en el contenido del ácido 18:3 mostró ligero aumento por efecto de la temperatura (Cuadro No. 16).

Por su parte, los tratamientos de A.C. provocaron diferentes efectos sobre el contenido final de ácidos grasos, atmósferas de 10% de O₂ permitieron mejor conservación de membranas microsomales, lo que representó a su vez alto contenido de ácidos grasos, alcanzando 0.330 y 0.313 μg de ácidos grasos totales / g de m.m para los frutos almacenados a 4 y 10°C, respectivamente, los cuales son superiores a los encontrados en membranas microsomales de frutos control almacenados a estas mismas temperaturas (0.234 μg de ácidos grasos totales) o de frutos con síntomas severos de daño por frío (0.223 μg de ácidos grasos totales), los ácidos grasos insaturados contribuyeron con el 79.1 y 80.9 % del contenido total para los frutos almacenados a 4 y 10°C respectivamente, los lípidos con mayor presencia en este tratamiento fueron FC, FG, AF y FE a 4°C y FC, FG, FE y AF a 10°C, los cuales

contrastaron con los bajos contenidos de DGDG y MGDG en la primera temperatura y MGDG, DGDG y FI en la segunda, en este tratamiento se observó baja presencia de galactolípidos en ambas temperaturas. (Cuadro No. 17). De manera particular, la cantidad de ácidos 16:0, 16:1, 18:1 y 18:3 en este tratamiento de A.C., se redujeron con la temperatura con el consiguiente aumento de los ácidos 18:0 y 18:2, el fosfolípido con mayor participación en el cambio de los ácidos 16:0 y 16:1 fue el FI.

Los tratamientos de 5% de CO₂, marcaron mayores diferencias en cuanto a la conservación de las membranas microsomales y el contenido de ácidos grasos totales, cuyos valores fueron cercanos a los obtenidos en membranas microsomales de frutos en madurez de consumo (0.394 µg / g de m.m.). A 4°C de temperatura, el contenido total de ácidos grasos totales alcanzó un valor de 0.305 µg / g de m.m., con el 75.5 % de insaturados, los lípidos con mayor presencia a esta temperatura fueron; FC, FE y CL, mientras que DGDG, FI y MGDG fueron los que se presentaron en menor cantidad. A 10°C, el contenido total de ácidos alcanzó el valor de 0.387 de µg / g de m.m. con el 72.4% de ácidos insaturados, los lípidos con mayor presencia a esta temperatura fueron; FC, FG y FE, en contraste, los de menores contenidos fueron DGDG, FI y MGDG, la conservación de mayor cantidad de membranas microsomales por este tratamiento, puede ser debido a una respuesta metabólica para reducir los daños en cloroplastos, siendo ligeramente mas efectivo a temperatura de 10°C que a 4°C. En este tratamiento fue notoria la pérdida del ácido 18:0, presente a 4°C, con el consecuente incremento de los ácidos 18:2>18:3>18:1 a 10°C (Cuadro No. 18).

Por su parte, la mezcla de 10% de O₂ + 5% de CO₂, presentó 0.231 µg de ácidos grasos totales / g de m.m, a temperatura de 4°C, con el 75.4% de ácidos insaturados, los lípidos con mayor contenido fueron FC, AF y FE, comparados con la ausencia de DGDG y los bajos contenidos de MGDG y CL. Por su parte, los frutos mantenidos a 10°C, conservaron 0.253 µg de ácidos grasos totales / g de m.m, con el 84.6% de ácidos insaturados, distribuidos principalmente en la FC, CL y FG, con la falta de DGDG y bajos niveles de MGDG y FI. El contenido relativamente alto de los ácidos

16:0, 18:0 y 18:1 presentes en los tejidos a 4°C (57µg) sufrió pérdidas a 10°C (39µg), con el consecuente incremento en los ácidos insaturados en tejidos de frutos almacenados a 10°C, particularmente de los ácidos 18:2 y 18:3 (Cuadro No.19). La ausencia de DGDG en ambas temperaturas, cuya síntesis se realiza en los plástidos, sugiere que este tratamiento no protege estos organelos del efecto de la baja temperatura y de la oxidación a los ácidos grasos.

Cuadro No. 17. Contenido de ácidos grasos en membranas microsomales de guayaba con tratamiento de AC de 10% de O₂.

ng de ácido graso/ g de muestra										
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SUMA	SUMA 16:0+ 16:1+18:0	SUMA 18:1 +18:2+18:3	RELACION INSAT/SAT
O ₂ 4°C										
FI	11.453	10.481	3.341	3.818	8.000	7.522	44.617	25.276	19.340	0.76
MGDG	2.768	0.845	0.547	0.664	6.769	2.545	14.139	4.160	9.979	2.40
FC	5.535	1.733	4.676	20.469	22.302	24.179	78.896	11.945	66.951	5.60
FG	1.368	2.005	2.417	2.094	35.280	9.170	52.337	5.792	46.545	8.04
FE	2.967	1.206	2.083	2.600	30.369	7.325	46.553	6.258	40.295	6.44
CL	0.407	1.033	1.416	5.982	14.612	9.289	32.742	2.857	29.885	10.48
AF	2.707	3.717	4.101	7.605	15.773	16.688	50.593	10.525	40.067	3.81
DGDG	1.621	0.594	0.450	0.558	5.714	1.349	10.289	2.666	7.622	2.86
Suma	28.830	21.617	19.035	43.793	138.822	78.072	330.170	69.482	260.688	3.75
O ₂ 10°C										
FI	1.185	1.458	2.916	3.142	4.057	5.411	18.173	5.560	12.612	2.26
MGDG	1.381	0.529	0.512	4.085	5.032	3.656	15.197	2.423	12.773	5.27
FC	4.567	1.957	9.219	12.116	29.897	10.155	67.914	15.744	52.169	3.31
FG	0.717	0.838	0.996	1.073	42.328	9.309	55.263	2.553	52.710	20.66
FE	4.382	1.6	2.504	2.888	36.923	6	54.298	8.486	45.811	5.40
CL	1.337	1.156	1.759	4.493	19.121	9.469	37.337	4.253	33.084	7.78
AF	3.199	2.356	7.030	5.340	12.995	16.984	47.907	12.586	35.321	2.80
DGDG	2.169	1.759	4.309	5.438	2.173	1.980	17.831	8.237	9.593	1.16
Suma	18.940	11.656	29.249	38.579	152.530	62.967	313.923	59.846	254.077	4.24

FI.-Fosfatidilinositol, MGDG.-Monogalactosildiacilglicerol, FC.- Fosfatidilcolina, FG.-Fosfatidilglicerol, FE.-Fosfatidiletanolamina, CL.-Cardiolipina, AF.-Acido fosfatídico, DGDG.-Digalactosildiacilglicerol

Cuadro No. 18. Contenido de ácidos grasos en membranas microsomales de guayaba con tratamiento de AC de 5% de CO₂.

ng de ácido graso/ g de muestra										
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SUMA	SUMA 16:0+ 16:1+18:0	SUMA 18:1 +18:2+18:3	RELACION INSAT/SAT
C02 4°C										
FI	0.440	0.460	0.739	3.074	3.849	4.385	12.950	1.640	11.309	6.89
MGDG	0.041	0.397	0.534	2.709	6.442	6.588	16.714	0.973	15.740	16.22
FC	3.636	3.212	56.060	8.760	8.281	14.756	94.707	62.909	31.798	0.50
FG	0.142	0.106	0.172	2.539	4.2	9.238	16.399	0.421	15.977	38.04
FE	0.163	0.238	0.953	1.931	52.198	6.260	61.746	1.355	60.390	44.40
CL	0.735	1.482	1.776	13.131	3.065	36.140	56.330	3.993	52.336	13.11
AF	0.706	0.600	0.388	17.454	9.111	6.731	34.993	1.696	33.297	19.11
DGDG	0.719	0.566	0.305	2.235	4.153	2.651	10.631	1.591	9.040	5.68
Suma	6.584	7.065	60.931	51.836	91.303	86.752	304.473	74.581	229.892	3.08
C02 10°C										
FI	0.486	0.577	0.822	3.743	4.313	6.115	16.058	1.886	14.172	7.53
MGDG	0.032	0.447	0.512	4.032	6.190	7.667	18.883	0.992	17.890	18.07
FC	3.589	3.138	12.820	29.397	54.950	26.456	130.353	19.548	110.804	5.67
FG	0.175	0.091	0.151	2.477	49.441	13.082	65.419	0.417	65.001	155.87
FE	0.140	0.204	0.595	2.066	45.184	7.569	55.759	0.940	54.819	58.32
CL	0.790	1.158	1.526	12.192	3.067	26.474	45.210	3.475	41.734	12.02
AF	0.048	0.432	0.285	15.542	8.705	10.594	35.610	0.767	34.843	45.42
DGDG	0.192	0.471	0.285	1.991	3.696	4.808	11.444	0.948	10.495	11.04
Suma	5.456	6.521	17.000	71.443	175.549	102.768	378.739	28.978	349.761	12.06

FI.-Fosfatidilinositol, MGDG.- Monogalactosildiacilglicerol, FC.- Fosfatidilcolina, FG.-Fosfatidilglicerol, FE.-Fosfatidiletanolamina, CL.-Cardiolipina, AF.-Acido fosfatídico, DGDG.-Digalactosildiacilglicerol

Cuadro No. 19. Contenido de ácidos grasos en membranas microsomales de guayaba con tratamiento de AC de 10% de O₂ y 5% de CO₂.

ng de ácido graso/ g de muestra										
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SUMA	SUMA 16:0+ 16:1+18:0	SUMA 18:1 +18:2+18:3	RELACION INSAT/SAT
MZ 4°C										
FI	0.676	3.943	10.028	3.146	5.142	4.581	27.518	14.647	12.870	.087
MGDG	0.293	0.110	0.769	0.358	4.129	3.590	9.251	1.173	8.078	4.66
FC	1.611	1.233	3.552	26.756	9.056	10.169	52.381	6.398	45.982	7.18
FG	9.016	1.039	1.319	9.274	6.839	10.214	37.703	11.375	26.328	2.31
FE	1.747	2.658	3.323	5.511	15.827	9.608	38.676	7.729	30.947	4.00
CL	2.792	1.194	1.740	3.731	8.666	5.967	24.092	5.727	18.365	3.21
AF	5.718	2.544	2.129	9.064	11.391	10.564	41.412	10.392	31.020	2.98
DGDG										
Suma	21.855	12.724	22.863	57.841	61.054	54.697	231.037	57.443	173.593	3.02
MZ 10°C										
FI	0.128	5.120	3.2	1.44	1.777	10.215	21.881	8.448	13.433	1.59
MGDG	0.352	0.640	0.96	2.133	3.562	9.142	16.790	1.952	14.838	7.60
FC	1.464	1.001	1.424	1.974	37.592	20.759	64.217	3.890	60.326	15.50
FG	1.851	0.877	1.256	9.509	1.923	23.795	39.213	3.985	35.228	8.83
FE	1.544	1.711	2.017	4.8	15.264	8.915	34.253	5.273	28.980	5.49
CL	1.285	1.714	2.428	3.764	23.000	10.434	42.628	5.428	37.199	6.86
AF	5.881	2.118	2.153	6.981	8.090	9.500	34.724	10.153	24.571	2.42
DGDG										
Suma	12.508	13.182	13.439	30.603	91.210	92.763	253.708	39.130	214.578	5.48

FI.-Fosfatidilinositol, MGDG.- Monogalactosildiacilglicerol, FC. - Fosfatidilcolina, FG.-Fosfatidilglicerol, FE.-Fosfatidiletanolamina, CL.-Cardiolipina, AF.-Acido fosfatídico, DGDG.-Digalactosildiacilglicerol

En resumen, se observó que la aplicación de las A.C. mostraron diferentes grados de protección sobre la pérdida de lípidos en las membranas microsomales de guayaba "Media China", y escasos niveles de prevención sobre la oxidación de los ácidos grasos, reiterando los resultados de Makhlouf et. al. (1990), quienes reportaron que el tratamiento de 8.5 % de CO₂ y 2.5% de O₂ detuvo la pérdida de fosfolípidos en dos variedades de brócoli. Frutos "Media China", en madurez de consumo, mantuvieron mayor cantidad de ácidos grasos totales (394 ng de ácidos) y una relación de 1.38 entre los contenidos de ácidos insaturados: saturados (AGINS:AGS), seguidos por los tratamientos de 5% de CO₂; en los cuales la temperatura modificó ligeramente su contenido y grado de insaturación conservando 0.303 ng de ácidos grasos totales y 229 ng de insaturados a 4°C y 377 ng de ácidos totales con 349 ng de insaturados a 10°C (Cuadro No 20).

Cuadro No. 20. Resumen del efecto de los tratamientos de A.C. sobre el contenido final de ácidos grasos

Tratamiento	Σ ng de ácidos grasos / g de m.m.			ac insatur :ac. Satur
	saturados	insaturados	totales	
Fruto maduro	165 a	228 bc	393 a	1.38
Fruto con severo daño por frío	56 bc	167 c	223 d	2.98
4°C				
Testigo	38 cd	195 bc	233 d	5.13
10% de O ₂	69 b	261 b	330 abc	3.78
5% de CO ₂	74 b	229 bc	303c	3.09
Mezcla de gases	57 bc	173 c	230 d	3.03
10°C				
Testigo	55 bcd	179 c	234 d	3.25
10% de O ₂	59 bc	254 b	313 bc	4.30
5% de CO ₂	29 d	349 a	378 ab	12.03
Mezcla de gases	39 cd	233 bc	272 cd	5.97

Los tratamientos de 10% de O₂, mantuvieron también un alto nivel de protección con relación al contenido ácidos grasos; a 4°C alcanzaron 330 ng de totales con 261 ng de insaturados y una proporción de 3.78 de AGINS:AGS, por su parte este mismo tratamiento a 10°C mantuvo, 313 ng de ácidos totales, de los cuales 254 ng de ácidos fueron insaturados, formando una relación de 4.03 de AGINS:AGS.

La mezcla de gases a 4°C, presentó la menor capacidad para mantener la cantidad de ácidos grasos totales (230 ng), pero con mejor balance entre insaturados y saturados (3.03), esta baja capacidad fue repetida a 10 °C con una relación de ácidos insaturados a saturados de 5.97. Finalmente los frutos con severo daño por frío presentaron el menor contenido de ácidos grasos (222 ng de ácidos totales y 167 ng de insaturados), con la relación AGINS:AGS de 2.98. De acuerdo a estos resultados se observa que el *tratamiento* de 5% de CO₂, mantiene mayor cantidad de ácidos grasos totales e induce alto nivel de insaturación de ácidos grasos a baja temperatura, lo cual puede ser una respuesta para evitar la transición de fase de los lípidos de la membrana como lo apuntaran Nguyen y Mazliak (1990), Parkin y Kuo (1989) y Wang (1982). Los datos encontrados concuerdan en parte con los obtenidos en pericarpio de tomate almacenado a 1°C de temperatura (Bergevin et al., 1993), en el cual, el contenido de ácido linolénico (18:3) se incremento en quebranto de los ácidos oleico (18:1) y linoleico (18:2) en fosfolípidos, glucolípidos y esterilglucósidos acilados mientras que a 20°C, la proporción de ácido linolénico (18:3) decreció, aumentando los contenidos de palmítico (16:0) y oleico(18:1), este cambio de saturación en lípidos en tejidos de tomate con daño por frío fue también advertido por Whitaker (1995). Por su parte, Nguyen y Mazliak, (1990), reportaron que los frutos de tomate siguen su maduración normal a temperaturas de 8, 12 y 20°C con la consecuente pérdida de fosfolípidos pero no de galactolípidos, sin embargo, frutos almacenados a 4°C presentan síntomas de daño por frío con pérdidas tanto de fosfolípidos como de galactolípidos, lo cual fue confirmado por Bishop (1980) y Yu y Willemont (1996), indicando que esta pérdida era consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de galactolípidos por efecto de la baja temperatura. La mayor tolerancia a los daños por frío por el incremento en la insaturación de ácidos grasos ha sido

demostrada por Murata et al. (1992) utilizando plantas transgénicas.

De acuerdo a Nguyen y Mazliak (1990), la sensibilidad de las plantas al frío, está relacionada con su contenido de especies moleculares saturadas 16:0, 16:1 (3t) y 18:0 y de manera particular con el nivel de estos ácidos en el fosfatidilglicerol y en los galactolípidos MGDG y DGDG. En frutos de guayaba "Media China" en madurez de consumo utilizadas como testigo, el fosfatidilglicerol contribuyo con 11.8% (46 ng) del total de ácidos con un balance entre especies de ácidos grasos saturados e insaturados, por su parte, los galactolípidos contribuyeron con el 7.8 (30.8 ng) y 7.2% (28.5 ng) del total de ácidos y relaciones de ácidos insaturados a saturados de 4.91 y 4.76 en MGDG y DGDG respectivamente, mientras que en frutos con severos daños por frío, el fosfatidilglicerol representó el 17.8 % (39.6 ng) y relación entre ácidos AGINS:AGS de 1.56, no se detecto DGDG, el MGDG participó con 3.7% (8.2 ng), con una relación de ácidos de 3.78, lo cual sugiere que la baja temperatura incide directamente sobre el metabolismo de los galactolípidos.

De manera particular, las A.C. mostraron diferentes efectos sobre el contenido de ácidos grasos y su relación de ácidos insaturados a saturados en FG, MGDG y DGDG (Cuadro No. 21); En los frutos control y los tratados con 10% de O₂ + 5% de CO₂, el contenido de ácidos grasos de FG, MGDG y DGDG, fue menor en comparación al de los tratamientos de 10% de O₂ y de 5% de CO₂. Así mismo, fue notoria la ausencia de DGDG en los frutos control y de MGDG y DGDG en la mezcla de gases, lo cual confirma que estos tratamientos no protegen la síntesis de galactolípidos por efecto de la baja temperatura (Yu y Willemont, 1997), ó de la mayor actividad galactolipasa en tejidos sensibles a las bajas temperaturas como fueron reportados para plántulas de maíz por Kaniuga et al. (1998). El tratamiento de 5% de CO₂, produjo altos coeficientes de ácidos insaturados a saturados en estos lípidos, lo cual aunado a su fuerte nivel de conservación de ácidos grasos, permite suponer que este tratamiento contribuye en la modificación de la composición de las membranas microsomaes para soportar la baja temperatura. El tratamiento 10% de O₂, mantuvo

alto nivel en ácidos grasos con valores más equilibrados en sus relaciones de ácidos insaturados a saturados.

Cuadro No. 21. Efecto de los tratamientos de A.C. sobre el contenido de ácidos grasos y su relación insaturados : saturados

Tratamiento	Σ ng de ácidos grasos / g de m.m.					
	FG		MGDG		DGDG	
	4°C	10°C	4°C	10°C	4°C	10°C
Control	43.0 ng	36.4	27.9	15.5	-	7.4
	(18.4%) *	(15.5)	(11.9)	(6.6)	-	(3.2)
	9.4 ^a	2.3	12.9	2.6	-	11.2
10% de O ₂	52.3	55.2	14.1	15.2	10.3	17.8
	(15.8)	(17.6)	(4.2)	(4.8)	(3.1)	(5.6)
	8.0	20.6	2.4	5.2	2.8	1.2
5% de CO ₂	16.4	65.4	16.7	18.8	10.6	11.4
	(5.4)	(17.2)	(5.5)	(4.9)	(3.5)	(3.0)
	38.0	155.8	16.2	18.0	5.7	11.0
10% de O ₂ + 5% de CO ₂	37.7	39.2	9.2	16.8	-	-
	(16.3)	(15.5)	(3.9)	(6.6)	-	-
	2.3	8.8	4.6	7.6	-	-

	FG	MGDG	DGDG
Fruto en madurez de consumo (20°C)	46.6	30.8	28.5
	(11.8)	(7.8)	(7.2)
	1.0	4.9	4.8
Fruto con severo daño por frío después de dos semanas a 4°C	39.6	8.2	-
	(17.8)	(3.7)	-
	1.6	3.8	-

*porcentaje de ácidos grasos con relación al total de los lípidos identificados

^arelación de ácidos grasos insaturados a saturados

7.6.-Actividad Fosfolipasa D

La actividad fosfolipasa D de las membranas microsomales presentaron diferente actividad en función de la temperatura de almacenamiento y los gases utilizados en el tratamiento de A.C. (Cuadro No.24), la temperatura de almacenamiento no modificó significativamente la actividad de la enzima, pero mostró mayor actividad a 4°C que a 10°C. A 4°C, los frutos no tratados presentaron actividad específica de 44.6 μmoles de colina / mg de proteína x min y el tratamiento de 5% de CO₂, redujo casi el 40% de

esta actividad en función de la cantidad de proteína presente en las membranas microsomales. A 10°C, los frutos sin tratamiento mostraron actividad de 38.6 μ moles de colina / mg de proteína x min, es decir solo el 86.5 % de la actividad fosfolipasa D, que se observó para el mismo tratamiento a 4°C; El tratamiento de 5% de CO₂, solo fue capaz de reducir el 30% del efecto de fosfolipasa D, en comparación con las muestras testigo a esta misma temperatura. En ambas temperaturas el tratamiento de la mezcla de gases (10% O₂ + 5% CO₂) fue la menos capaz para reducir la actividad fosfolipasa D. Las membranas microsomales provenientes de frutos con severos daños por frío, presentaron mayor actividad fosfolipasa D, mientras la actividad fosfolipasa de membranas microsomales de frutos en estado de madurez de consumo, fue menor (Cuadro No. 25), esta información permiten constatar que la actividad fosfolipasa D puede estar presente a temperaturas entre 20 - 4°C como fue descrito Parkin y Kuo, (1989) y Todd et al., (1992), tener mayor actividad en membranas microsomales en tejidos sensibles al frío Grittle et al., (1998), e incluso incrementarse por el efecto de daños por frío (Yoshida, 1979). La actividad fosfolipasa D, mostró una relación inversa con el grado de protección de los tratamientos de A.C. aplicados, por lo que puede inferirse una asociación del daño por frío con la actividad de esta enzima como lo han admitido varios autores (Willemot 1983, Yoshida 1979), pero no apoya su supuesta contribución en la formación de fosfatidilglicerol como lo sugirieron Yang et al. (1967) ya que el aparente incremento de FG es debido a la incapacidad de síntesis de galactolípidos, y el cambio de relación de cada uno de los lípidos presentes con el total de los mismos. Los valores de actividad encontrados, fueron similares a los encontrados en otros tejidos (Dyer, et al., 1994., Jandus et al., 1997., Novotná et al., 1999).

Cuadro No. 22. Actividad Fosfolipasa D en frutos de guayaba con tratamientos de A.C. almacenados a 4°C y 10°C

Tratamiento 4°C	fosfolipasa D μmoles de colina / g de m.m / 10 min		μg de proteína / g de m.m	Actividad específica μmoles de colina / mg de proteína x min	
	Sin FC	Mas FC		Sin FC	Mas FC
Testigo	0.813	2.157	4.834	16.82	44.62
10% O ₂	0.936	1.951	5.470	17.10	35.66
5% CO ₂	1.024	1.995	7.418	13.80	26.89
10% O ₂ + 5% CO ₂	0.767	2.029	5.320	14.42	38.14
Tratamiento 10 °C					
Testigo	0.960	1.830	4.737	20.26	38.63
10% O ₂	0.904	1.728	5.265	17.17	32.82
5% CO ₂	0.969	1.937	7.177	13.50	26.98
10% O ₂ + 5% CO ₂	0.790	1.903	5.196	15.20	36.62

Cuadro No. 23. Actividad Fosfolipasa D en frutos de guayaba en madurez de consumo y con daños por frío severos

Fruto	fosfolipasa D μmoles de colina / g de m.m / 10 min		μg de proteína / g de m.m	Actividad específica μmoles de colina / mg de proteína x min	
	Sin FC	Mas FC		Sin FC	Mas FC
En madurez de consumo	0.898	1.798	7.599	11.82	23.66
con daño por frío severo	0.733	2.364	4.045	18.12	58.44

VIII.- Conclusiones

8.1.- Crecimiento del fruto

La guayaba Media China, tiene patrón de desarrollo doble sigmoide, cuya duración depende de la época de producción, siendo de 130 días para la estación primavera-verano y de 190 para la estación otoño-invierno.

El contenido de sólidos solubles, acidez total y ácido ascórbico en el fruto se incrementan notablemente en su tercera etapa de desarrollo, pasando de 8 a 14% el primero, de 0.155 a 0.823 % acidez (como ácido cítrico) el segundo y de 20 a 398 mg /100g el tercero.

8.2.-Factores que determinan el índice de madurez

De acuerdo a los datos obtenidos, el tamaño, no es un parámetro que permite definir el índice de corte del fruto; la gravedad específica, es un elemento útil, pero no confiable para separar frutos en sus diferentes estados de madurez; y la resistencia a la penetración puede servir para determinar el índice de madurez de guayaba "Media China", con el inconveniente de ser una prueba destructiva.

El color expresado como ángulo de matiz en guayaba (H°), permite diferenciar tres etapas de madurez; verde, verde-amarillo (sazón) y amarillo (maduro), frutos en color verde-amarillo corresponden a la mejor etapa para su cosecha con rangos de H° de 105 ± 5 , que pertenecen a valores de a^* de -17 ± 1.5 , b^* de 45 ± 1.5 , y de L^* de 55 ± 5 , medidos con un iluminante C y un observador de 2° .

De acuerdo a los patrones de producción de CO_2 y etileno de la guayaba "Media China", permiten clasificar el fruto como climatérico.

8.3.-Respuesta del fruto a bajas temperaturas

La presencia de daños por frío en guayaba depende de la temperatura de almacenamiento y del estado de madurez. Frutos en estado de madurez III toleran más las bajas temperaturas, mientras que los frutos en madurez I son más sensibles a estas.

Frutos en estado de madurez II pueden desarrollar daños por frío después de dos semanas a 4°C, mientras que a 10°C conservan buenas características de calidad.

Las condiciones del almacenamiento de guayaba "Media China" modifican parámetros de la calidad sensorial del fruto, principalmente; apariencia, textura, color, aroma, y sabor.

Los principales síntomas de daños por frío de guayaba "Media China" son: incapacidad para madurar, oscurecimiento de la piel y pulpa, ablandamiento acelerado, incremento en la sensibilidad a las enfermedades y oscurecimiento de las zonas con daño mecánico.

El color expresado como ángulo de matiz permite determinar el oscurecimiento de la piel como efecto de los daños por frío.

8.4.-Efecto de los tratamientos de A.C. sobre el control de daños por frío.

El fruto de guayaba es altamente sensible a estímulos externos, incluyendo la aplicación A.C., concentraciones de $O_2 < 10\%$ y $CO_2 > 5\%$ por 24 h provocan daños que se manifiestan por incapacidad de maduración, oscurecimiento del tejido y aparición de compuestos del metabolismo anaeróbico como etanol y acetaldehído.

La aplicación de CO_2 detiene el metabolismo del fruto, de manera particular concentraciones de $CO_2 \geq 10\%$, disminuyen la producción de etileno; mientras que concentraciones de $\leq 20\%$, inhiben totalmente su producción.

Las concentraciones de gases en los tratamientos de AC utilizadas en guayaba no afectan la relación acidez: sólidos solubles totales durante la maduración del fruto.

Los tratamientos de A.C. influyen de forma diferente sobre el control de los daños por frío. El tratamiento con 5% CO_2 , reduce los síntomas de daños y permite mantener parámetros de calidad del fruto como; textura, sabor, apariencia, color, y sabor.

8.5. Efecto de los tratamientos de A.C. sobre la composición de las membranas microsomales y actividad fosfolipasa D

Los tratamientos de A.C. influyen de forma diferente sobre el contenido de membranas microsomales, fosfolípidos y proteínas, así como de ácidos grasos y su grado de saturación.

En frutos almacenados a bajas temperaturas (4 y 10°C) por tres semanas, el contenido de membranas microsomales presentó pérdidas hasta del 30%, en comparación con las de los frutos en madurez de consumo (2.03 $\mu\text{L/g}$ de tejido), este comportamiento fue similar para la cantidad de ácidos grasos totales.

El tratamiento de 5% de CO_2 , evitó parcialmente la pérdida de fosfolípidos y proteínas (~25%), comparado con el resto de los tratamientos probados, pero no fue capaz de reducir el nivel de insaturación de ácidos grasos posiblemente por su efecto sobre algunas reductasas.

Los frutos con severo daño por frío, control y del tratamiento de 10% O_2 + 5% CO_2 , almacenados a 4°C presentaron bajos niveles de MGDG y pérdida total de DGDG, lo cual respalda la idea de inhibición de la biosíntesis de galactolípidos por efecto de la baja temperatura.

La actividad fosfolipasa D, se encuentra presente a las temperaturas de almacenamiento probadas (10 y 4°C) y se modifica de forma diferente por la concentración de gases en los tratamientos de A.C. utilizados, mostrando mayor actividad a 4°C que a 10°C., lo que permite inferir su asociación con los daños por frío.

El tratamiento de 5% de CO_2 , reduce la actividad fosfolipasa D de forma más eficiente que el resto de las A.C. probadas.

IX.-Bibliografia

- Adsule, P.G. and D.K. Tandon. 1983. The assessment of LDPE bags for enhancing shelf life of guava. *Indian Food Packer*. 37: 82-87.
- Abousalham, A., M. Riviere., M. Teissere and R. Verger. 1993. Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochem et Biophysica Acta* 1158:1-7
- Ahlawat, V.P., R. Yamdagni and P.C. Jindal. 1980. Studies on the effect of postharvest treatments on storage behaviour of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Sardar (L 49). *Haryana Agric. Univ. J. Res. Vol. X (2):* 242-247
- Akamine, E.K. and T. Goo. 1979. Respiration and ethylene production in fruits of species and cultivars of *Psidium* and species of *Eugenia*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104:632-635
- Ames, B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 8:115-118
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official analytical chemists. 15th Ed., Kenneth Helrich Ed. Virginia, USA
- Bagnall, D.J. and J.A. Wolfe 1978. Chilling sensitivity in plants: do the activation energies of growth processes show an abrupt change at a critical temperature. *J. of Experimental Botany* 29:1231
- Banas, A.I.J. and S. Stymne. 1992. Plant microsomal phospholipases exhibit preference for phosphatidylcholine with oxygenated acyl groups. *Plant Sci.* 84:137
- Ben Arie, R. and Y. Zutkhi, 1992. Extending the storage life of Fuyu persimmon by modified atmosphere packaging. *HortScience* 27(7):811-813
- Bergevin, M., G.P. L'Heureux, J.E. Thompson and C. Willemont. 1993. Effect of chilling and subsequent storage at 20°C on electrolyte leakage and phospholipid fatty acid composition of tomato pericarp. *Physiol. Plant.* 87:522-527
- Bertolini, P., G. Lanza and G. Tonini. 1991. Effects of pre-storage carbon dioxide treatments and storage temperatures on membranosis of 'Femminello comune' lemons. *Sci. Hortic.* 46:89-95
- Bishop, D.G. 1986. Chilling sensitivity in higher plants: the role of phosphatidylglycerol.

- Clermont H. and R. Douce. 1970. Localisation de l'active phospholipasique dans les tissus vegetaux. FEBS letters 9(5): 284-286
- Coombe, B.G. 1976. The development of fleshy fruits. Ann. Rev. Plant Physiol. 27:507-528
- Dyer, J.H., S.B. Ryu and X. Wang. 1994. Multiple forms of fosfolipase D following germination and during leaf development of castor bean. Plant Physiol. 105:715-724
- Dhillon, B.S., S.N. Singh, G.S. Kundal and P.P.S. Minhas. 1987. Studies on the developmental physiology of guava fruit (*Psidium guajava* L.), II. Biochemical characteres. The Punjab Horticultural J. 27: 212-221
- Escribano, M.I., B. Del Cura, T. Muñoz, and C. Merodio. 1997. The effect of high carbon dioxide al low temperature on ribulose 1,5 biphosphate carboxilase and polygalacturonase protein levels in cherimoya fruit. J. Am. Soc. Hort. Sci. 122(2): 258-262.
- Forney, C. F. and W.J. Lipton. 1990. Influence of controled atmospheres and packaging on chilling sensitivity. In: Chilling Injury of Horticultural crops. (Wang, C.Y. Ed.) CRC Press. Inc. Boca Raton, Fda. USA.
- Ganguar, B.M. 1972. Biochemical studies on growth and ripening of guava. Indian Food Packer 26(5):13-15.
- Gemma, H., Y. Matsuyama and H.G. Wang. 1994. Ripening characteristics and chilling injury of banana fruit. Jpn. J. Trop. Agric. 38(3):216-220.
- Gibson, S., D.L. Falcone., J. Browse and C. Somerville. 1994. Use of transgenic plants and mutants to study the regulation and function of lipid composition. Plant, Cell and Environment 17:627-637.
- Gómez-Lim, M.A. 1992. La aplicación de la biología molecular en la fisiología poscosecha. 1a Reunión Latinoamericana de Tecnología Poscosecha. UAM-Ixtapalapa, México, D.F nov 30 -dic 4.
- González de la Vara L. and G. Medina. 1988. Effects of inorganic phosphate on the plasma membrane H⁺-ATPase from red beet (*Beta vulgaris* L.). Physiol. Plant 86:407-413

- Grittle, P.R., G. Paliyath., R. Y. Yada, and D.P. Murr. 1998. Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol Biochem.* 36(3): 213-224
- Gupta, V.K. and D.Mukherjee. 1980. Effect of morphacin on the storage of guava fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105(1):115-119.
- Hardenburg, R.E., A.E. Watada and C.Y. Yang. 1986. The commercial storage of fruits, vegetables, florist and nursery stocks, *Agricultural Handbook 66.* USDA, Agricultural Research Service.
- Harwood, J.L., 1997. Plant lipid metabolism. In: *Plant biochemistry*, Dey, P.M. and J.B. Harbone, Ed. Academic Press. New York.
- Hariyadi, P. and K.L. Parkin. 1993. Chilling-induced oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Calypso) seedlings. *J. Plant Physiol.* 141:733-738
- Idslein, H. and P. Schereir. 1985. Volatile Constituents from guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *J. Agric. Food Chem* 33:139 -144.
- Jagtiani, J., H., T. Chan and, W.S. Sakai. 1990. Guava. In *Tropical Fruit Processing.* Academic Press Inc. New York. p 9-43
- Jackman R.L., H.J. Gibson and D.W. Stanley. 1992. Effect of chilling on tomato fruit texture. *Physiol. Plantarum* 86:600-608.
- Jandus, j., O. Valentová, J. Kas, J. Daussant and C. Thévelot. 1997. Phospholipase D during tomato fruit ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 35(2):123-128
- Kader, A.A. 1980. Prevention of ripening in fruits by use of controlled atmosphere. *Food Tech.* 5:51-54
- Kader, A.A. 1986. Biochemical and Physiological basis for effect of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Techn.* 40(5):99-100, 102-104.
- Kader, A.A. and L.L. Morris. 1975. Amelioration of chilling injury symptoms on tomato fruits. *HortSci.* 110:324.
- Kane, O., M. Boulet and F. Castaigne. 1982. Effect of chilling injury on texture and fungal rot of mangoes (*Mangifera indica* L.). *J. Food Sci.* 47:992-995
- Kaniuga, Z., V. Saczynska, E. Miskiewicz. 1998. Galactolipase activity but not the

level of high-melting-point phosphatylglycerol is related to chilling tolerance in differentially sensitive *Zea mays* inbred lines. *Plant Cell Reports* 17:897-901.

Ke, D., L. Golgstein., M. O'Mahony, and A.A Kader. 1991. Effect of short term exposure to low O₂ and high CO₂ atmospheres on quality attributes of strawberries. *J. Food Sci.* 56:50-54

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

Knee, M. 1985. Ethylene effects in controlled atmosphere storage of horticultural crops. *Food Preservation by Modified Atmosphere*. CRC. Press Inc. Boca Raton, USA. 225-235

Kerbel, E.L., A.A. Kader and R.J. Romani. 1988. Effect of elevated CO₂ concentrations on glycolysis in intact "Bartlett" pear fruit. *Plant Physiol.* 86:1205-1209

Khedkar, D.L., K.W. Ansarwardkar, R.S. Dabhade and A.L. Ballal. 1982. Extension of storage life of guava (var L-49). *Indian Food Packer* 36(2): 49

Kubo, Y.A. Inaba and R. Nakamura. 1990. Effects of high CO₂ on respiration in various horticultural crops. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 114:975-978

Kumar, R. and M.M. Hoda. 1974. Fixation of maturity standards of guava (*Psidium guajava* L.) *Indian J. Hortic.* 31:140-144.

Kuo, S. and K.L. Parkin. 1989. Chilling injury in cucumbers (*Cucumis sativa* L.) associated with lipid peroxidation as measured by ethane evolution. *J. of Food Science.* 54(6):1488-1491.

Leshem, Y.Y. 1987. Membrane phospholipid catabolism and Ca²⁺ activity in control of senescence. *Physiol. Plant* 69:551-559

Lester, G. and E. Stein 1993. Plasma membrane physicochemical changes during maturation and posharvest storage of muskmelon fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 118(2):223-227

Lougheed, E.C. 1987. Interactions of oxygen, carbon dioxide, temperature and ethylene that may induce injuries in vegetables. *HortScience* 22(5):791-794

Lurie, S. and R. Ben-Arie. 1983. Microsomal membrane changes during the ripening of

apple fruit. *Plant Physiol.* 73:636-638

- Lurie, S. M., Z. Lapsaker and E. Fallik. 1997. Heat treatments to decrease chilling injury in tomato fruit. Effects on lipids, pericarp lesions and fungal growth. *Physiol Plant.* 100: 297-302
- Lurie, S., A. Andros, A. Sabahat, J.D. Klein, E. Fallik and R. Shapiro. 1995. The effect of high temperature on maintaining quality of harvested tomatoes. In *Postharvest Physiology, Pathology and technologies for horticultural commodities: Recent Advances*, 234-240 (A.Ait-Oubahou and M. El-Otmani Eds.) Institut Agronomique and Veterinaire Hassan II Agadir Morocco.
- Lyons, J. M. and Raison, J.K. 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45:386
- Lyons, J.M. 1973. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 4:445
- Makhlouf, J., C. Willemont., R. Couture., J. Arul and F. Castaigne. 1990. Effect of low temperature and controlled atmosphere storage on the membrane lipid composition of broccoli flower buds. *Sci. Hortic.* 42:9-19
- Marangoni, A.G., A.K. Smith., R.D. Yada and D.W. Stanley, 1989. Ultrastructural changes associated with chilling injury in mature green tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:958-962
- Marangoni, A.G., Butuner, Z. Smith, and D.W. Stanley, 1990. Physical and biochemical changes in microsomal membranes of tomato fruit associated with acclimation to chilling. *J. Plant Physiology* 135:653-661
- Marangoni, A.G., T. Palma and D.W. Stanley. 1996. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biol. and Tech.* 7:193-217
- Mathooko, F.M. 1996a. Regulation of respiratory metabolism in fruits and vegetables by carbon dioxide. *Postharvest Biol. and Tech.* 9:247-264
- Mathooko, F.M. 1996b. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biol. and Tech.* 7:1-26
- Mattoo, A.K. and M. Lieberman. 1977. Localization of ethylene synthesizing system in apple. *Plant Physiol.* 60:794-799
- Mazliak, D. 1980. Synthesis and turnover of plant membranes phospholipids. *Prog.*

- Phytochem. 6:49-102.
- McCormac, D.J., T.F. Todd, G. Paliyath and J.E. Thompson., 1993. Modulation of bilayer fluidity affects lipid catabolism in microsomal membranes of tomato fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 31:1-8.
- McDonald, R.E., T.G. McCollum and E.A. Balwin. 1999. Temperature of water heat influences tomato fruit quality following low temperature storage. *Postharvest Biol. Tech.* 16:147-155.
- McGlasson, W.B. 1985. Ethylene and fruit ripening. *HortScience* 20(1):51-53
- McGuire, R. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortSci.*27(2):1254-1255
- McGuire, R. 1995. Market quality of guavas after hot-water quarantine treatment and application of carnauba wax coating. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 108: 294-296
- Medlicott, A.P., A.J. Semple, A.J. Thompson, H.R. Blakbourne and A.K. Thompson. 1992. Measure of color changes in ripening bananas and mangoes by instrumental chemical and visual assessment. *Trop. Agric.(Trinidad)*, 69(2): 161-162
- Mercado-Silva. E., S. Pérez G., P. B. Bautista y V. M.A. García 1995. Evolución del color y factores fisicoquímicos en guayaba (*Psidium guajava* L.) en distintos estados de madurez. Memorias del VI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Horticultura. Hermosillo Son. Mex. Pp. 99
- Metcalfe, L.D., A.A. Schmitz, J.R. Pelka. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry* 514-515.
- Minorsky, P.V. 1985. An heuristic hypothesis of chilling injury in plants: a role for calcium as the primary physiological trasducer of injury. *Plant Cell Envir.* 8:75
- Montero, L.M., M.I. Escribano, J.L. De la Plaza and C. Merodio. 1995. Chilling temperature storage induces changes in protein patterns and protease activity in cherimoya fruit. *Posharvest Biol. and Tech.* 5:251-260
- Moon, B. Y., S.I. Higashi, Z. Gombos, and N. Murata. 1995. Unsaturation of membrane lipids of chloroplasts stabilizes photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 6219-6223

- Moore, T.S. Jr. 1982. Phospholipids biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:235-239
- Mowlah, G. and S. Itoo. 1982. Guava (*Psidium guajava* L.). sugar components and related enzymes at stages of fruit development and ripening. *Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi* 29(8):472-476.
- Mowlah, G. and S. Itoo. 1982. Changes in pectic components, ascorbic acid, pectic enzymes and cellulase activity in ripening and storage guava. *Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi.* 30(8):454-461
- Murata, N., N. Sato, N. Takahashi and Y. Hamazaki. 1982. Composition and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant and Cell Physiol* 23(6) 1071-1079
- Murata, N. 1983. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant and Cell Physiol.* 24:81-86
- Murata, N. and J. Yamaya. 1984. Temperature-dependent phase behaviour of phosphatidylglycerols from chilling sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Physiol* 74:1016-1024
- Murata, N., Q. Ishizakinishizawa, S. Higashi, H. Hayashi, Y. Tasaka and I. Nishida. 1992. Genetically engineered alterations in the chilling sensitivity of plants. *Nature* 356:710-713.
- Murata, N. and I. Nishida. 1990. Lipids in relation to chilling sensitivity of plants. In *Chilling Injury of Horticultural crops* (Wang, Ed.) CRC, Press, Inc. Boca Raton FL USA.
- Murata, N. and H. Wada. 1995. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochemical J.* 308:1-8
- Murkherjee, S.K. and M.N. Dutta. 1967. Physico-chemical changes in Indian guavas (*Psidium guajava* L.) during fruit development. *Current Sci.* 36: 675-676
- Nishida, I and N. Murata. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:541-568
- Nguyen, X.V. and P. Mazliak. 1990. Chilling injury induction is accompanied by galactolipids degradation in tomato pericarp. *Plant Physiol. Biochem.* 28:283-

- Novotná, Z., J. Kás., J. Daussant., J. Sadjok and O. Valentová. 1999. Purification and characterisation of rape seed phospholipase D. *Plant Physiol. Biochem.* 37(7/8): 531-537.
- O'Hare, T.J. and A. Prasad. 1993. The effect of temperature and carbon dioxide on chilling symptoms in mango. *Acta Horti*, 343:244-250
- Ohlrogge, J. and J. Browse. 1995. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell.* 7:957-970.
- Orr, R.G. and J.K. Raison 1990. The effect of changing the composition of PG from thylakoid polar lipids of oleander and cucumber on the temperature of the transition related to chilling injury. *Planta* 181: 137-143
- Pal, R.K. and R.W. Buescher. 1993. Respiration and ethylene evolution of certain fruits and vegetables in response to carbon dioxide in controlled atmosphere storage. *J. Food Sci Tech* 30(1): 29-32
- Pal, D.K. and Y. Salvaraj 1979. Changes in pectin in guava and PE activity in developing guava fruits. *J. of Food Sci. and Tech.* 16:115
- Paliyath, G. and J.E. Thompson. 1987. Calcium and calmodulin regulated breakdown of phospholipid by microsomal membranes from bean cotyledons. *Plant Physiol.* 83:63-68
- Paliyath, G. and M.J. Droillard. 1992. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiol. Biochem.* 30:789-812
- Palma, T., A.G. Marangoni, D.W. Stanley. 1995. Environmental stresses affect tomato microsomal membrane function differently than natural ripening and senescence. *Posharvèst Biol. and Tech.* 6:257-273
- Palma, T. Stanley, D.W., Aguilera J.M. and Zoffoli J.P. 1993. Respiratory behavior of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) under Controlled atmospheres. *HortScience* 28(6).647-649
- Parkin, K.L., A. Marangoni, J.L. Jakman, R.Y. Yada and D.W. Stanley. 1989. Chilling injury: A review of possible mechanisms. *J. Food Biochem.* 13:127-153
- Parkin, K.L. and S.J. Kuo. 1989. Chilling induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L.) fruit. *Plant Physiol.* 90:1049-1056

- Patterson, B.D. and Graham, D. 1977. Effect of chilling temperatures on the protoplasmic streaming of plants from different climates. *J. Exp. Bot* 28:736
- Paull, R.E. 1990. Chilling Injury of crops of tropical and subtropical origin. In *Chilling Injury of Horticultural crops* (Wang, Ed.) CRC, Press, Inc. Boca Ratón Fl. USA
- Paull, R.E. and T. Goo. 1983. Relationship of guava fruit detachment force to the stage of fruit development and chemical composition. *HortSci.* 18(1): 65-67
- Pedrero, D.L. y R.M. Pangborn, 1989. Evaluación sensorial de alimentos, métodos analíticos. Ed. Alhambra Mexicana. México.
- Pesis, E., R. Marinansky, G. Zauberman, and Y. Fuchs. 1994a. Prestorage low-oxygen atmosphere treatments reduces chilling injury symptoms in 'Fuerte' avocado fruit. *HortScience* 29(9): 1042-1046
- Pesis, E., C. Ampunpong, B. Shushiri, and E.W. Hewett. 1994b. Enhancement of ethylene and CO₂ production in apple fruit following short-term exposure to high CO₂
- Platt-Aloia, K.A. and W.W. Thomson. 1987. Freeze fracture evidence for lateral phase separations in the plasmalemma of chilling-injured avocado fruit. *Protoplasma* 136: 71-80
- Prasad, N.B. and G. Azeemoddin. 1994. Characteristics and composition of guava (*Psidium guajava* L.) seed and oil. *JAOCS* 71(4):454-455.
- Quinn, P.J. and W.P. Williams 1978. Plant lipids and their role in membrane function. *Prog Biophys Mol. Biol.* 24:109-173
- Raison, J.K. 1980. Membrane lipids structure and function. *Biochemistry of plants* (P.K. Stumpf, Ed.) Academic Press New York.
- Raison, J.K., C.S. Pike and J. A. Berry. 1982. Growth temperature induced alterations in the thermotropic properties of *Nerium oleander* membranes lipids. *Plant Physiol.* 70:215-218.
- Raison, J.K. and L.C. Wrigth. 1983. Thermal phase transitions in the polar lipids of plants membranes. *Biochem Biophys Acta.* 731:69-78
- Raison, J.K. and J.M. Lyons. 1986. Chilling Injury: a plea for uniform terminology. *Plant Cell Environ.*, 9:685

- Raison, J.K. and G.R. Orr. 1990. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury, in: Chilling Injury of Horticultural Crops. Wang, C. Y. Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl. USA. Chap, 9.
- Ratanachinakorn B., A. Klieber and D.H. Simons. 1997. Effect of short controlled atmospheres and maturity on ripening and eating quality of tomato. Postharvest Biol. and Tech. 11:149-154
- Rathore, D.S. 1976. Effect of season on the growth and chemical composition of guava fruit. J. Hort. Sci. 51:41-47
- Reyes, M.U. and R.E. Paull. 1995. Effect of storage temperature and ethylene treatment on guava (*Psidium guajava* L.) fruit ripening. Postharvest Biol and Tech. 6:357-365.
- Rodríguez, R., P.C. Argawal and N.K. Saha, 1971. Physicochemical changes during development of Safeda guava fruit. Indian Food Packer 25:5-12
- Roughan, P. G. 1985. Phosphatidylglycerol and chilling sensitivity in plants. Plant Physiol. 77:740-746
- Roughan, G. and R. Slack. 1984. Glycerolipid synthesis in leaves. Trends in Biochem. Sci. 9: 383-386
- Salunke, D.K. and B.B. Besai. 1984. Guava. Postharvest Biotechnology of Fruits. Vol II. CRC Press Inc. Fl. USA. p 39-45.
- SAGARPA, 2000. Anuario Estadístico de Producción Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México.
- Samson, J.A. 1990. The minor tropical fruits. In tropical fruits. Logman Scientific Technical 2th Ed. New York. USA. Pp. 271-324.
- Sharaf, A. and S.S. El-Saadany. 1987. Biochemical studies on guava fruits during different maturity stages. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensn 10:145-149
- Sharom, M., C. Willemont and J.E. Thompson. 1994. Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. Plant Physiol. 105:305-308
- Shewfelt, R.L. 1986. Postharvest treatment for extending the shelf life of fruit and vegetables. Food Tech. 5:70-86
- Shewfelt, R.L. and M.C. Erikson. 1991. Role of lipid peroxidation in the mechanism of

membrane-associated disorders in edible plant tissue. *Trend in Food Sci. and Tech.* 152-154

Shewfelt, R.L. and A.C. Purvis. 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *HortScience* 30(2):213-218

Shinitzky, M. 1984. Fluidity and cellular functions in *Physiology of Membrane Fluidity* (Shinitzky, M. Ed), CRC, Press. Boca Raton Fl. USA.

Singh, B.P., H.K. Singh and K.S. Chauhan. 1981. Effects of postharvest calcium treatments on the storage life of guavas. *Indian J. Agric. Sci.* 51(1):44-47

Singer, S.L. and G.V. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731

Srivastava H.C. and P. Narasimhan. 1967. Physiological studies during the grow and development of different varieties of guavas (*Psidium guajava* L.). *J. Horticultural Sci.* 42:94

Suhaila, M., K.M. Kyi, S. Yusof. 1994. Effects of various surface treatments on the storage life of guava (*Psidium guajava* L.) at 10°C. *J. Sci. Food Agric.* 66:9-11

Tasaka, Y., I. Nishida, S. Higashi, T. Beppu and N. Murata. 1990. Fatty acid composition of phosphatidylglycerols in relation to chilling sensitivity of woody plants. *Plant and Cell Physiol.* 31(4): 545-550

Tandon, D.K., B.P. Singh and S.K. Karla. 1989. Storage behaviour of specific-gravity graded guava fruits. *Sci. Hortic.* 41: 35-51

Tandon, D.K., B.P. Singh and S.K. Karla. 1984. Effect of certain post-harvest treatments on the shelf life of guava fruits. *Indian J. of Hortic.* 41:88-92

Teotia, S.S., R.S. Tripathi and S. Bhan. 1970. Evaluation of indices for determination of maturity of guava (*Psidium guajava* L.). *Hortic. Adv.* 7:99-107

Thompson, J. E., R. L. Elgge and R. F. Bufler. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytopatology* 105:317-344

Todd, J. F., G. Paliyath and J. E. Thompson. 1990. Characteristics of a membrane associated lipoxigenase in tomato fruit. *Plant Physiol.* 94:1225-1232

Todd, J. F., G. Paliyath and J. E. Thompson. 1992. Effect of chilling on the activities of lipid degradation enzymes in tomato fruit microsomal membranes. *Plant Physiol.*

Biochem. 30(5):517-522

- Vazquez, O.R.I., 1985. Efecto de la temperatura y HR en el almacenamiento del fruto de guayaba. Tesis de Ing. Agrónomo. Fitotecnia. Univ. Autónoma de Chapingo. Méx.
- Vazquez-Ochoa, R.I. and M.T. Colinas-Léon. 1990. Changes in guavas of three maturity stages in response to temperature and relative humidity. HortScience 25(1):86-87.
- Wade, N.L. and D. G. Bishop. 1978. Changes in the lipid composition of ripening banana fruits and evidence for an associated increase in cell membrane permeability. Biochem. Biophys Acta 529:454-464.
- Wang, C. Y. and J. E. Baker. 1979. Effects of two free radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumber and sweet pepper fruits. Plant and Cell Physiol. 20(1):243-251
- Wang, C. Y. 1982. Physiological and Biochemical responses of plants to chilling stress. HortScience 17:173-174.
- Wang, C.Y. and D.O. Adams. 1982. Chilling-induced ethylene production in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Physiol. 47:424.
- Wang, C.Y. 1993. Approach 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, X. 2001. Plant Phospholipases. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52:211-231.
- Wang, H.G. and H. Gemma. 1994. Ripening characteristics and chilling injury of banana fruit. II Changes in degree of insaturation of fatty acids during exposure to chilling. Jpn. J. Trop. Agric. 8(3): 346-350.
- Whitaker, B.D. 1988. Changes in the steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening. Phytochemistry 27(11):3411-3416.
- Whitaker, B.D. 1990. Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker Ed. USA.

- Whitaker, B.D. 1991. Changes in lipids of tomato fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Phytochemistry* 30(3):757-761.
- Whitaker, B.D. 1992. Changes in galactolipids and phospholipids levels of tomato fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Phytochemistry* 31(8):2627-2630.
- Whitaker, B.D. 1993. Lipid changes in microsomes and crude plastid fractions during storage of tomato fruit at chilling and nonchilling temperatures *Phytochemistry* 32: 265-271.
- Whitaker, B.D. 1994. Lipid changes in mature-green tomatoes during ripening, during chilling and after rewarming subsequent to chilling. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119(5):994-999.
- Whitaker, B.D. 1995. Lipid changes in mature-green bell pepper during chilling at 2°C and after transfer to 20°C subsequent to chilling. *Physiol. Plant.* 93:683-688
- Whitaker, B.D. and C.Y. Wang. 1987. Effect of paclobutrazol and chilling on leaf membrane lipids in cucumber seedings. *Physiol. Plant.* 70:404-406.
- Willemot, C. 1983. Rapid degradation of polar lipids in frost damaged winter wheat crown and root tissue *Phytochemistry* 22:861-863.
- Wills, R.B., E.E. Mulholland, B.L. Brown, and K.J. Scott. 1983. Storage of two cultivars of guava (*Psidium guajava* L.) fruit for processing. *Trop. Agric.* 60(3):175-178.
- Wilson, C.W. 1980. Guava, in *Tropical and subtropical fruits: composition, properties and uses* S. Nagy and P. E. Shaw Ed. The AVI Pub. Co. USA. pp 279-299.
- Wilson, C.W. and P.E. Shaw. 1978. Terpene hydrocarbons from *Psidium guajava*. *Phytochemistry* 17: 1435-1436.
- Woods, C.M., M.S. Reid and B.D. Petterson. 1984. Response to chilling stress in plants cells.I.-Changes in cyclosis and cytoplasmic structure. *Protoplasma* 121: 8
- Yang, S.F., S. Freer and A.A. Benson. 1967. transphosphatidylolation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 242:477.
- Yang, S.F. and N.E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35: 155-189.
- Yoshida, S. 1979. Freezing injury and phospholipid degradation in vivo in woody plant

- cell. *Plant Physiol.* 64: 252-256.
- Yusof, S. and M. Suhaila. 1987. Physicochemical changes in guava (*Psidium guajava* L.) during development and maturation. *J. Sci. Food Agric.* 38:31-59.
- Yu, H.L. and C. Willemont, 1996. Inhibition of eukariotic galactolipid biosynthesis in mature-green tomato fruit at chilling temperature. *Plant Science* 113: 33-41
- Yu, H.L. and C. Willemont, 1997. Effect of chilling on lipid biosynthesis in tomato pericarp disk. *Plant Science* 125:21-30.