



**Escola Tècnica  
Superior  
d'Enginyeria Agrària**

**ANÀLISI BIOQUÍMICA I QUIMIOMÈTRICA  
DELS DIFERENTS FACTORS IMPLICATS EN EL  
DESENVOLUPAMENT DEL COR MARRÓ I DEL  
LLOCAT DE LA PERA BLANQUILLA**

**TESI DOCTORAL  
ESTHER PINTÓ I PAGÈS  
LLEIDA, JULIOL DEL 2003**

# **ANÀLISI BIOQUÍMICA I QUIMIOMÈTRICA DELS DIFERENTS FACTORS IMPLICATS EN EL DESENVOLUPAMENT DEL COR MARRÓ I DEL LLOCAT DE LA PERA BLANQUILLA**

Memòria de Tesi Doctoral presentada per Esther Pintó i Pagès per optar al grau de Doctora Enginyera Agrònoma de la Universitat de Lleida

El present treball ha estat realitzat al laboratori de Fisiologia i Bioquímica, de l'Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA, sota la direcció del Dr. Christian Larrigaudière, investigador de l'esmentat Centre. La Dra. Immaculada Recasens, Catedràtica de la Universitat de Lleida, ha dut a terme la tutela de la mateixa.

Lleida, maig del 2003

Amb el vist- i – plau de,

EL DIRECTOR

LA TUTORA

Dr. CHRISTIAN LARRIGAUDIÈRE

Dra. IMMACULADA RECASENS GUINJUAN

LA DOCTORANDA

ESTHER PINTÓ I PAGÈS

# AGRAÏMENTS

Un cop finalitzat el treball arriba el moment de donar les gràcies a totes les persones que d'alguna manera l'han fet possible.

Mereix una menció especial el Dr. Christian Larrigaudière, director de la tesi, del qual he après molt científicament i a qui he trobat sempre disponible per atendre els meus dubtes, revisar els meus escrits i suggerir-me constantment idees noves. Pels seus consells i suport incondicional, i sobretot per la confiança que sempre ha dipositat en mi.

A la Dra. Immaculada Recasens, per haver acceptat la tutoria d'aquesta tesi i per la seva valuosa opinió científica.

Al Dr. Jaume Puy, per la seva ajuda i consells en el camp de l'anàlisi multivariant i per tenir sempre un moment per atendre i resoldre els meus dubtes.

A la Irene, la meva "companya de tesi", amb qui he compartit els mateixos problemes. Pel seu optimisme, la seva activitat i per les seves aportacions, sempre enriquidores, en aquest camp.

A les companyes del laboratori de Fisiologia i Bioquímica del Centre UdL-IRTA, per ajudar-me en les frenètiques sortides de cambra i en les nombroses determinacions enzimàtiques. I com no, per aportar la nota "d'alegria" al laboratori. Al Just Salas, pel seu interès en mantenir les cambres a punt i fer que tot funcioni.

A la Rosa, veïna de laboratori i companya de carrera, amb qui he compartit els problemes que comporta la realització d'una tesi, per haver-me escoltat en tantes ocasions.

Als meus companys del Departament de Tecnologia de l'I.E.S. Manuel de Montsuar de Lleida, pel molt que m'han ajudat només escoltant-me. I en especial, als meus alumnes per utilitzar part del temps que els pertanyia.

A la Rosa, pel seu assessorament en els aspectes lingüístics.

A l'Antonieta, al Lluís, la Tresa i molts altres, que m'han demostrat un cop més la seva gran amistat amb ajuda i recolzament en tot moment.

I finalment als meus pares i al Jordi, pels quals no hi ha prou paraules d'agraïment al món. Pel seu optimisme i per les seves paraules de suport i ànims constants. Per la seva paciència i per estar sempre al meu costat. I sobretot, pel temps que emprat en l'elaboració d'aquesta tesi, he deixat de compartir amb ells. I com no, a l'altre Jordi, el meu germà, per la gran paciència que ha tingut.

## ABREVIATURES

a<sup>\*</sup>: Coordenada de l'espai de color (verd - vermell)  
AA: Àcid ascòrbic  
AAO: Ascorbat oxidasa  
AC: Atmosfera controlada  
ACC: Àcid 1-aminociclopropè-1-carboxílic  
ADH: Alcohol deshidrogenasa  
AOS: Active oxygen species (espècies actives de l'oxigen)  
APX: Ascorbat peroxidasa  
b<sup>\*</sup>: Coordenada de l'espai de color (blau - groc)  
CAT: Catalasa  
DARP: Departament d'agricultura, ramaderia i pesca  
DHA: Àcid dehidroascòrbic  
DHAR: Dehidroascorbat reductasa  
FN: fred normal  
GA3: Àcid giberèlic  
GR: Glutatió reductasa  
GSH: Glutatió reduït  
GSSH: Glutatió oxidat  
H<sub>i</sub>: Leverage  
HR: Humitat relativa  
IRTA: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària  
L<sup>\*</sup>: Coordenada de l'espai de color (luminositat)  
LO: Low oxygen (baix oxigen)  
LOX: Lipoxigenasa  
MACC: N-malonil ACC  
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación  
1-MCP: 1-metilciclopropè  
MDA: Malonaldehid  
MDHA: Àcid monodehidroascòrbic  
MDHAR: Monodehidroascorbat reductasa  
MLR: Multiple Linear Regression (regressió multilíneal)  
PBC: Pithy brown core (cor marró i sucós)  
PC: Principal Component (component principal)  
PC1: First Principal Component (primer component principal)  
PC2: Second Principal Component (segon component principal)  
PCA: Principal Component Analysis (anàlisi per components principals)  
PCR: Principal Component Regression (regressió per components principals)  
PDC: Piruvat descarboxilasa  
PLS: Partial Least Square (mínims quadrats parcials)  
PLSR: Partial Least Square Regression (regressió per mínims quadrats parcials)  
PLS1: Model PLS d'una variable-Y  
PLS2: Model PLS de més d'una variable-Y  
POX: Peroxidasa  
PPO: Polifenoloxidasa  
RMSEP: Root Mean Square Error of Prediction (Error de predicció)  
SBS: Skin black speck (taques fosques a la pell)  
SSC: Soluble solids concentration (contingut en sòlids solubles)  
S<sub>i</sub>: Distància al model  
SOD: Superòxid dismutasa  
UE: Unió Europea  
ULO: Ultra Low oxygen (molt baix oxigen)

# ÍNDEX

Agraïments .....	iii
Abreviatures .....	iv
Resum .....	v
Resumen .....	vi
Summary.....	vii
<b>PART I: INTRODUCCIÓ GENERAL.....</b>	<b>1</b>
1.- Anàlisi del sector de la fruita dolça .....	3
2.- La pera Blanquilla i la seva frigoconservació .....	4
2.1.- Caracterització varietal .....	4
2.2.- La maduració del fruit .....	4
2.3.- La conservació en atmosfera controlada.....	5
3.- El cor marró i el llocat .....	7
3.1.- Terminologia .....	7
3.2.- Definicions i simptomatologia .....	9
3.3.- Factors causants del cor marró i del llocat .....	10
3.3.1.- Factors precollita .....	11
3.3.1.1.- La nutrició mineral.....	11
3.3.1.2.- Altres factors de camp .....	12
3.3.2.- El grau de maduresa a la collita .....	12
3.3.3.- Les condicions de conservació .....	13
3.3.3.1.- La temperatura.....	13
3.3.3.2.- El nivell de CO <sub>2</sub> i d'O <sub>2</sub> .....	13
3.3.3.3.- Altres factors d'interès .....	14
4.- Bioquímica del cor marró i del llocat: hipòtesis de treball.....	15
4.1.- Hipòtesi I: El cor marró i el llocat com a conseqüència de l'enfosquiment enzimàtic i de l'acció de la PPO.....	15
4.2.- Hipòtesi II: El cor marró i el llocat com a conseqüència del procés fermentatiu .....	16
4.3.- Hipòtesi III: El cor marró i el llocat com a conseqüència del procés oxidatiu.....	18
4.3.1.- L'estrès oxidatiu.....	18
4.3.2.- Les espècies actives de l'oxigen .....	18
4.3.3.- Els sistemes antioxidants .....	20

4.3.3.1.- Els compostos antioxidants no enzimàtics .....	20
4.3.3.2.- Els sistemes enzimàtics .....	21
4.3.4.- El paper de l'àcid ascòrbic i del seu metabolisme en la prevenció del cor marró i del llocat .....	25
4.4.- Hipòtesi IV: El cor marró i el llocat com a conseqüència del procés de senescència i de la peroxidació de les membranes .....	26
4.4.1.- L'alteració de les membranes cel.lulars .....	26
4.4.1.1.- La peroxidació de les membranes .....	27
4.4.1.2.- La lipoxigenasa (LOX) .....	28
4.4.2.- Conseqüències de l'alteració de les membranes .....	29
4.5.- Hipòtesi V: Altres factors probablement involucrats en el cor marró i en el llocat .....	29
4.5.1.- Grau de difusió del CO <sub>2</sub> dins de la cèl.lula .....	29
4.5.2.- Disminució de l'energia disponible .....	30
4.5.3.- Acció tòxica d'algunes substàncies .....	30
OBJECTIUS .....	31
REFERÈNCIES .....	32
<b>PART II: PLA DE TREBALL I METODOLOGIA.....</b>	<b>43</b>
1.- Pla de treball .....	45
2.- Metodologia .....	48
2.1.- L'anàlisi multivariant o quimiomètrica .....	48
2.1.1.- Objectius principals de les tècniques multivariants .....	49
2.1.2.- Passos previs: el pretractament de les dades i els outliers .....	49
2.1.3.- L'anàlisi per Components Principals.....	50
2.1.3.1.- El diagrama de scores .....	50
2.1.3.2.- El diagrama de loadings .....	51
2.1.4.- La regressió multivariant.....	52
2.1.5.- La classificació.....	53
REFERÈNCIES .....	55
<b>PART III: RESULTATS .....</b>	<b>57</b>
Capítol 1: Involvement of oxidative processes in the development of core browning in controlled-atmosphere stored pears .....	61
C. LARRIGAUDIÈRE, E. PINTÓ, I. LENTHERIC, M. VENDRELL	
Capítol 2: Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears .....	69
E. PINTÓ, I. LENTHERIC, M. VENDRELL, C. LARRIGAUDIÈRE	

Capítol 3: Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorders in pear by multivariate analysis .....	79
C. LARRIGAUDIÈRE, I. LENTHERIC, J. PUY, E. PINTÓ	
Capítol 4: Relationship between quality parameters and internal disorders in pear by means of multivariate analysis .....	95
E. PINTÓ, I. LENTHERIC, J. PUY, C. LARRIGAUDIÈRE	
Capítol 5: Multivariate analysis of the metabolic pathways involved in core browning and brown heart disorder in pears .....	111
E. PINTÓ, I. LENTHERIC, J. PUY, C. LARRIGAUDIÈRE	
Capítol 6: Caracterització dels fruits sans i dels fruits alterats mitjançant l'anàlisi de classificació .....	127
<b>PART IV: DISCUSSIÓ GENERAL .....</b>	<b>143</b>
1.- Manifestació del cor marró i del llocat en pera Blanquilla. Efecte de diferents atmosferes de conservació i de la data de collita en el desenvolupament d'aquestes dues alteracions .....	145
2.- Efecte del CO <sub>2</sub> sobre alguns processos fisiològics probablement involucrats en el desenvolupament del cor marró i del llocat .....	146
3.- Bioquímica del cor marró i del llocat. Comprovació de les diferents hipòtesis plantejades .....	149
3.1.- El paper del metabolisme fermentatiu en el desenvolupament del cor marró i del llocat.....	149
3.2.- El paper del metabolisme antioxidant en el desenvolupament del cor marró i del llocat. Efecte protector dels antioxidants naturals.....	151
3.3.- El paper de la peroxidació de les membranes en el desenvolupament del cor marró i del llocat.....	153
3.4.- El paper de la PPO i la descompartimentació .....	153
4.- Esquema explicatiu del cor marró en pera Blanquilla .....	154
5.- Esquema explicatiu del llocat o descomposició interna en pera Blanquilla.....	155
6.- Es pot predir el cor marró i el llocat en la pera Blanquilla? Hi ha algun paràmetre que es pugui utilitzar com a indicador d'aquests desordres? .....	157
REFERÈNCIES .....	158
<b>PART V: CONCLUSIONS.....</b>	<b>163</b>

---

# I . INTRODUCCIÓ

---



# INTRODUCCIÓ GENERAL

## 1.- ANÀLISI DEL SECTOR DE LA FRUITA DOLÇA

En els últims anys, la producció de fruita dolça, especialment poma i pera, s'ha incrementat considerablement. L'excedent creat en el sector i el fet d'haver de competir amb la resta de països de la UE, grans productors i exportadors de fruita, en fan difícil la comercialització.

Així, doncs, per ser competitius en el mercat europeu, cal desviar els esforços cap al factor qualitat en detriment de la quantitat.

En els pròxims anys, les pautes de producció i comercialització incidiran molt en la bona presentació de la fruita i en la seva presència continuada en els mercats. L'existència d'una àmplia xarxa d'instal·lacions frigorífiques permet conservar la fruita i comercialitzar-la escalonadament al llarg de tot l'any; i enllaçar pràcticament una campanya amb la següent. Actualment, la capacitat frigorífica total de Lleida és d'uns 2.400.000 m<sup>3</sup> (García de Otazo, 1996).

Pel que fa al cultiu mundial del perer, la UE, amb un 26% de la producció global i amb una superfície de 143.000 ha, ocupa el segon lloc després de la Xina. Els principals països productors són Itàlia (44% de la producció), Espanya (21%) i França (13%) (Iglesias, 1998). A l'Estat Espanyol es van produir durant la campanya del 2000, 665.000 tones de pera. Catalunya, i més concretament, la zona fructícola de Lleida, són les principals zones productores, amb més del 50% de la producció total (MAPA, 2000). La perera és actualment l'espècie més important a les comarques de Lleida, amb una superfície de 19.029 ha (any 2000) i amb una producció de 331.302 tones l'any 2001 (DARP, 2001). Pel que fa a la distribució de varietats, la que ocupa el primer lloc al nostre país, tant en volum de producció com en superfície de conreu, és la Blanquilla, seguida molt de prop per la Conference.

La pera Blanquilla ocupa el cinquè lloc a la UE: només un 8% de la producció europea és d'aquesta varietat. L'Estat Espanyol n'és pràcticament l'únic productor (Iglesias, 1998). La seva qualitat organolèptica, el seu rendiment unitari i el fet que tingui una marcada presència quantitativa en la conservació frigorífica, fan d'aquesta varietat una de les més apreciades (expressió que sovint no implica que hagi de ser una de les més cotitzades). A més, hi ha molta exportació d'aquesta varietat a causa de la precocitat de les seves produccions respecte a la d'altres països europeus. També hem de dir que es veu sotmesa a un procés d'arrancada de plantacions velles, que en l'actualitat no es renoven amb el mateix ritme.

En definitiva, per tal d'assegurar la rendibilitat d'aquesta varietat en el nou marc del comerç global, cal millorar la qualitat del producte, millora que passa per l'eliminació i/o disminució de les pèrdues derivades del procés de frigoconservació, tan elevades en aquesta varietat.

## **2.- LA PERA BLANQUILLA I LA SEVA FRIGOCONSERVACIÓ**

### **2.1.- Caracterització varietal**

Aquesta varietat, denominada Blanquilla, Blanqueta, De Agua, i majoritàriament Blanca de Aranjuez, prové d'una selecció dins d'una població de "Agua de Aranjuez" realitzada a l'Estació Experimental d'Aula Dei (Saragossa).

El fruit és de calibre petit, amb un pes mitjà de 120 a 130 g. La seva forma típica és piriforme i a vegades ovoïdal. Els fruits partenocàrpics són de tipus piriforme allargat, forma que sovint s'identifica erròniament amb l'originària de la varietat. L'epidermis, de color verd, és llisa i fina. La polpa és blanca i fina, però a la vora del cor la textura és lleugerament granulosa.

És una de les varietats de fruita dolça amb millors qualitats organolèptiques: en el seu grau de maduresa òptima té una exquisida fragància i molt bon gust. Aquesta excel·lent qualitat solament s'aprecia quan s'aconsegueix la maduresa organolèptica adequada, fet que no sempre passa, ja que, com veurem, és una varietat que es veu sotmesa a un forta especulació: el fet de ser objecte de conservacions molt llargues obliga a recol·lectar el fruit quan aquest és encara massa verd.

Botànicament, la seva floració, que s'inicia durant la segona quinzena de març i la primera d'abril, és, per regla general, abundant; per a obtenir una producció abundant i de qualitat és necessària la polinització creuada. És força sensible a les gelades primaverals, fet que comporta l'aplicació d'àcid giberèlic, amb la consegüent obtenció de fruits partenocàrpics. Madura entre uns 140 i 150 dies després de plena floració, a la zona de Saragossa (Carrera, 1986) i la seva recol·lecció vindrà determinada en funció de la finalitat última del producte.

### **2.2.- La maduració del fruit**

La maduració és un procés natural, força complex, que millora les característiques dels fruits. El principal objectiu de les baixes temperatures de conservació i de l'aplicació de l'atmosfera controlada (AC) és disminuir la maduració i la senescència del fruit i, en conseqüència, allargar-ne la vida útil, tot mantenint els seus atributs de qualitat.

Alguns fruits, com són les pomes, les peres, els préssecs, els tomàquets i altres, presenten un important augment de l'activitat respiratòria durant la maduració i són capaços de produir etilè ( $C_2H_4$ ) com a resposta a baixes concentracions d'aquest. Aquest fenomen rep el nom de climateri (Recasens, 1986). Els fruits climatèrics a nivells baixos d'etilè (alguns cops de l'ordre de 0,1 ppm) poden induir la maduració, com a conseqüència del procés autocatalític de l'etilè. Com a resposta a l'etilè, els fruits passen d'un estadi preclimateri al climateri pròpiament dit, augmenten la taxa respiratòria i comencen a tenir lloc els diferents processos relacionats amb la maduració. En canvi, en els fruits no climatèrics com la taronja, el llimó, la maduixa, la pinya, la cirera i altres, la producció de l'etilè és petita i no es dona el procés autocatalític.

L'etilè és sintetitzat a partir de l'aminoàcid metionina a partir del qual es forma l'àcid 1-aminociclopropè-1-carboxílic (ACC), que és l'intermediari d'aquesta hormona (Lieberman,

1979). Per la seva síntesi es requereix  $O_2$ , i no es forma sota condicions d'anòxia. A més, l'addició de  $CO_2$  en l'atmosfera de conservació facilita no solament la inhibició de la respiració sinó també la disminució de la producció d'etilè i conseqüentment frena o alenteix la maduració. Això és degut al fet que el  $CO_2$  i l'etilè competeixen pel mateix lloc d'unió de l'etilè (Burg i Burg, 1969). En peres, la producció d'etilè és inhibida per una pressió entre 5 i 20 KPa de  $CO_2$ . Malgrat tot, De Wild *et al.* (1999) van mostrar que en peres tractades amb 1-metilciclopropè (MCP, compost que bloqueja els efectes de l'etilè, probablement pel fet que competeix pels llocs d'unió amb l'etilè), el  $CO_2$  també tenia un efecte d'inhibició en la producció d'etilè. Això suggereix que la inhibició del  $CO_2$  per la producció de l'etilè no solament té lloc a nivell de la unió amb el receptor.

En definitiva, una baixa concentració d' $O_2$  i un alt nivell de  $CO_2$  inhibeixen la maduració i la producció d'etilè. En aquelles espècies on la taxa de producció d'etilè és elevada, l'avantatge principal de l'AC és l'efecte sobre l'acció mateixa de l'etilè. En canvi, en els cultivars amb una taxa de producció d'etilè baixa, l'AC actua inhibint-ne la producció i la seva acció.

En la pera Blanquilla, el grau de maduresa del fruit en el moment de la recol·lecció és un factor clau, ja que en ser una varietat d'estiu que sovint aconsegueix els millors preus durant els mesos de març i abril (alguns anys també els pitjors), ens veiem obligats a períodes de conservació de l'ordre d'uns 9 mesos. Com a referència, podem citar que es pot conservar en fred normal fins al desembre i en atmosfera controlada (AC) fins al mes de juny. Ara bé, per a aconseguir aquests objectius és necessària una recol·lecció primerenca, però en aquest cas el desenvolupament del climateri no es realitza plenament, cosa que dona lloc a fruits sense aroma i/o gust i de textura seca, i provoca que hi hagi risc d'escaldat comú i que sovint sigui necessària una postmaduració; amb la qual cosa, la pera deixaria d'interessar al consumidor. D'altra banda, una recol·lecció tardana suposaria un increment en el risc de determinades fisiopaties com la descomposició interna i/o el cor marró (Carrera, 1986; De la Plaza, 1986a i 1986b; Herrero, 1987), a la vegada que s'escurçaria el temps de conservació. D'això es desprèn que determinar el moment de la recol·lecció és de vital importància, sobretot ara que es consolida l'interès que alguns països comunitaris com ara Itàlia han demostrat per aquesta varietat.

### **2.3.- La conservació en atmosfera controlada**

En un primer moment, la utilització de l'AC com una alternativa a la frigoconservació convencional es va caracteritzar per un increment en el nivell de  $CO_2$  i va ser utilitzada comercialment per primera vegada en pomes a Anglaterra l'any 1929 (Thevenot, 1979). A partir d'aquestes primeres aplicacions en els anys 30 i 40, la tecnologia va anar evolucionant fins a l'aparició dels analitzadors de gasos paramagnètics i per infrarojos, que van permetre el gran desenvolupament industrial a finals dels anys 60 de l'AC com a nova tecnologia de frigoconservació.

El principi de funcionament de l'AC en cambres frigorífiques de conservació de fruita es basa en la modificació de cadascun dels components gasosos de l'atmosfera: l'oxigen es redueix d'un 21% a un 1-3%, el diòxid de carboni augmenta d'un 0,03% a un 0,5-5%; la part restant és de nitrogen. D'entre les noves aplicacions tecnològiques de què ha estat objecte aquesta atmosfera, la que ha tingut una major repercussió, a partir dels anys 80, és l'AC amb baixos nivells d' $O_2$ . Segons el nivell d' $O_2$  present a la cambra, podem parlar de l'atmosfera anomenada LO (*Low Oxygen*), que té un nivell d' $O_2$  entre l'1,9 i l'1,4%; i de l'atmosfera ULO

(*Ultra Low Oxygen*), amb un valor entre l'1,3 i el 0,9% (Recasens, 1997). La concentració de CO<sub>2</sub> ha de mantenir-se baixa, malgrat que per alguns autors poden aconseguir-se valors fins i tot del 3% (Graell, 1995). Ara bé, aquests valors s'han d'agafar solament com a referència, ja que variaran d'uns fruits als altres en funció del grau de tolerància per a cada espècie i varietat.

Les espècies de fruita dolça que s'adapten millor a una mitja o llarga conservació frigorífica són principalment les pomes, les peres i, en menor grau, altres tipus de fruits com són els préssecs, les cireres, els albercocs, etc.

La finalitat última de l'AC és allargar el període de conservació del fruit i això s'aconsegueix retardant els diversos processos catabòlics que condueixen a la senescència. Aquest retard, alhora s'aconsegueix gràcies a l'acció combinada de les baixes temperatures juntament amb una disminució de l'O<sub>2</sub> i/o un augment del CO<sub>2</sub>.

Una de les majors conseqüències de l'AC és la reducció de la taxa de respiració (Smock, 1979). El CO<sub>2</sub> inhibeix la glucòlisi i frena l'activitat d'enzims específics del cicle de krebs, com ara la succinat deshidrogenasa (Kader, 1986). En canvi, l'acció de l'O<sub>2</sub> provoca la pèrdua d'efectivitat de les oxidases, concretament de la citocrom oxidasa (Woltering *et al.*, 1994). Nombrosos treballs han demostrat que l'acció combinada de l'O<sub>2</sub> i del CO<sub>2</sub> té un efecte inhibitor en l'etilè (Bufler i Streif, 1986), malgrat que l'efecte de l'oxigen sembla molt més important (Plich, 1987). L'atmosfera controlada, a més de disminuir la producció d'etilè, mantenir la fermesa i l'acidesa, i retenir els sòlids solubles, permet mantenir la qualitat organolèptica del producte.

Malgrat tot, la conservació a llarg termini, especialment a alts nivells de CO<sub>2</sub>, pot portar a l'acumulació d'acetaldehid i d'etanol. Aquests compostos sovint desenvolupen olors desagradables, alteren el sabor del fruit i poden arribar fins i tot a causar la mort cel·lular i la desorganització de l'estructura del fruit. A més, un nivell massa alt de CO<sub>2</sub> també pot conduir a algunes alteracions en el fruit com ara, en el cas de la nostra varietat, el cor marró i la descomposició interna o llocat (Ke i Rodríguez-Sinobas, 1991). Altres respostes dels fruits en l'atmosfera controlada de baix O<sub>2</sub> i/o alt CO<sub>2</sub>, a més de la inducció de les vies fermentatives (Ke *et al.*, 1990), són l'acumulació de succinat i/o d'alanina (Monning, 1983) i la disminució del pH i l'ATP (Lange i Kader 1997, Nanos i Kader 1993).

La pera Blanquilla és una varietat que sovint es conserva en AC, però presenta el problema de ser una de les varietats més sensibles al CO<sub>2</sub>. L'acció del CO<sub>2</sub> li pot provocar diferents alteracions durant el procés de conservació: la descomposició interna o llocat i el cor marró. Segons De la Plaza (1986a), per tal d'evitar aquests danys per CO<sub>2</sub>, no s'hauria de superar una concentració del 2-3% d'aquest gas per un nivell del 3% d'oxigen, i si, a més, el grau de maduresa a la collita ha superat l'òptim, convenen fins i tot atmosferes exemptes d'aquest gas. D'acord amb això, un dels altres reptes que se'ns presenten per fer de la Blanquilla una varietat competitiva, és la millora de la seva qualitat via l'eliminació i/o disminució d'aquestes alteracions. Malauradament, aquestes representen la principal font de pèrdues durant el procés de conservació, amb un valor mig anual al voltant del 4% del total emmagatzemat (Palazón, 1984; Herrero, 1995).

### 3.- EL COR MARRÓ I EL LLOCAT

S'agrupen sota el terme d'alteracions fisiològiques o fisiopaties (*physiological disorders*) un conjunt d'anomalies en l'aspecte i en la qualitat organolèptica dels fruits que no són degudes a un organisme patogen. Els fruits més sensibles a patir fisiopaties en postcollita són aquells que tenen un període de conservació més perllongat, el qual sovint també està associat a unes condicions de conservació més complexes. En el cas de pomes i peres s'han descrit fins a 15 alteracions diferents (Murga i Palazón, 1984), en canvi, en fruita d'ós amb un període de conservació molt més curt, se n'han descrit només 6 o 7 (Snowdon, 1990).

La pera Blanquilla després del període de frigoconservació, tant en fred normal com en AC, pot presentar dues fisiopaties molt típiques com són la descomposició interna o llocat i el cor marró. Aquestes dues, a més de ser les responsables de moltes de les pèrdues ocasionades en el període postcollita, tenen el greu inconvenient que no s'aprecien externament. És a dir, un consumidor pot estar a punt de menjar una pera amb molt bona aparença exterior i pot trobar a l'interior una d'aquestes dues fisiopaties, les quals, evidentment fan que el fruit no sigui comestible.

#### 3.1.- Terminologia

A vegades és difícil fer una determinació exacta d'algunes fisiopaties: la terminologia emprada i la descripció dels seus símptomes poden crear, i creen, moltes confusions. A més, quan parlem d'aquelles que tenen una problemàtica comú al cor marró, existeix una gran polèmica i ambigüitat a l'hora de denominar-les.

El problema s'agreuja encara bastant més quan aquestes alteracions fan referència a la varietat Blanquilla, ja que en tractar-se d'una varietat local hem d'utilitzar la bibliografia existent d'altres varietats de pera.

Com a termes generals que fan referència a una simptomatologia similar, tenim,

*Brown heart* = "cor marró". Terme força general que fa referència a una alteració bastant localitzada del cor sense referir-se de forma concreta a alteracions de la polpa (Fotografia 1). Aquest terme pot incloure els dos següents:

- *Core browning* = "enfosciment del cor". Enfosciment de la zona del cor i lleugerament de la polpa.
- *Cavities* = "cavitats". Problema força més específic que consisteix en l'aparició de cavernes en la zona del cor que, posteriorment, poden estendre's a la polpa.



**Fotografia 1.-** Exemple típic de cor marró en la varietat Blanquilla. El cor marró és resultat d'alts nivells de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera de conservació. A més, la sensibilitat s'incrementa quan les peres han estat recol·lectades massa tard.

*Internal breakdown* = “descomposició interna”. També apareix sota els noms de *core breakdown* i *internal browning*. En català es coneix com el llocat de les peres, i, més concretament, com el llocat de la Blanquilla (Fotografia 2). Aquest és un problema més específic que combina l'enfosquiment amb una descomposició de caràcter tova del cor i la polpa.

A partir d'aquest punt, solament ens referirem al cor marró com a sinònim del *brown heart* amb presència o no de cavitats a la polpa i, al llocat o descomposició interna com a sinònim del terme *internal breakdown*.



**Fotografia 2.-** Exemple típic de descomposició interna o llocat en la varietat Blanquilla. La descomposició interna està molt relacionada amb l'estat de maduresa a la collita.

### 3.2.- Definicions i simptomatologia

La mateixa confusió, a la qual fèiem referència anteriorment, existeix també si revisem a la bibliografia que s'entén per cor marró segons els diferents autors. A més, una mateixa alteració fisiològica pot manifestar-se de forma molt diferent en funció de l'espècie i de la varietat en la qual es doni. Malgrat això, tots els autors estan d'acord que el cor marró és una d'alteració que en un grau normal de desenvolupament no presenta cap anomalia externa sobre els fruits afectats, de manera que a simple vista es podria afirmar que el fruit està sa. Pel que fa a la simptomatologia interna del cor marró, així l'han descrita els diferents autors;

- Per Herrero, 1982 i Herrero i Guàrdia, 1992: És una alteració típica de peres. En les primeres etapes de la seva aparició pot observar-se un enfosquiment de color marró en els teixits propers a les cavitats seminals, així com la presència d'un líquid dens i brillant al voltant de les llavors. Posteriorment, la polpa propera al cor presenta un enfosquiment general i, apareixen dins del fruit unes cavitats característiques que poden arribar a aconseguir una grandària considerable. La polpa propera a aquestes cavernes adquireix un aspecte sec i cotonós.
- Per Palazón, 1984: Aquesta alteració s'inicia en la zona del cor amb petites zones marronoses, que més tard s'estendran a tota la zona carpel·lar i a la polpa. Els teixits afectats són secs, tenen un aspecte semblant al suro i hi ha sovint cavitats, que en alguns casos poden arribar a fer-se de mida considerable però sense arribar a afectar mai la pell del fruit (Taula 1).
- Per De la Plaza, 1986b i 1989: El cor marró és un problema d'intoxicació amb desorganització cel·lular que, en un principi, és de tipus humit amb lesions d'aspecte cotonós. Posteriorment presenta un aspecte sec i cavitats distribuïdes, en general, en forma radial, conseqüència de la pèrdua d'aigua dels teixits danyats i de la seva posterior suberització. Segons aquest autor, en alguns casos, pocs però, es pot apreciar una lleugera deformació externa.
- Per Bondoux, 1994: Aquesta fisiopatia comença amb un enfosquiment pericarpel·lar, ferm i humit. Després, aquest enfosquiment pot estendre's al parènquima cortical i, amb la conseqüent pèrdua d'aigua dels teixits danyats, es poden formar cavitats força extenses.

En el moment de definir la descomposició interna o llocat els símptomes queden més clars, almenys pel que fa referència a aquesta varietat.

- Per Herrero, 1982 i Herrero i Guàrdia, 1992: El percentatge d'àrea afectada és important. Es caracteritza per la descomposició de la polpa a partir del cor, la qual avança com una taca de color beix translúcid. Es produeix també un remolliment general del fruit.
- Per Palazón, 1984: Es caracteritza per una descomposició del mesocarpi de caràcter tou i humit, que es produeix a partir del cor amb un color marró translúcid. Aquesta coloració marró pot estendre's totalment o parcial a la polpa i arribar fins a la pell. S'identifica pel fet que els teixits són molt tous i aquosos, amb escasses o nul·les cavitats, que en tot cas serien molt petites (Taula 1). El procés d'aquesta alteració és molt ràpid i fins i tot en estat avançat es pot donar una decoloració de l'epidermis del fruit.

A continuació es presenta una taula centrada en la pera Blanquilla que ens permetrà delimitar clarament l'abast de cadascuna d'aquestes dues alteracions, atenent-nos, és clar, als símptomes visuals que s'hi poden observar.

**Taula 1.- Diferències entre la descomposició interna o llocat i el cor marró de la pera Blanquilla.**

	<b>DESCOMPOSICIÓ INTERNA</b>	<b>COR MARRÓ</b>
<b>Textura</b>	Tova i aquosa	Seca
<b>Coloració</b>	Marró	Marró
<b>Cavitats</b>	Escasses i petites (*)	Freqüents i grans
<b>Zona afectada</b>	Cor i pràcticament tota la polpa	Cor i lleugerament la polpa
<b>Rapidesa d'extensió</b>	Elevada	Reduïda

*Font: I. Palazón, 1984. "Estudio de los problemas patológicos de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza". (\*) La varietat Blanquilla no presenta cavitats.*

Malgrat que els símptomes d'aquestes dues fisiopaties són diferents o lleugerament diferents en la varietat Blanquilla, quan els fem extensius a la resta de varietats de pera, sembla que aquestes diferències no són tan clares.

En línies generals, com hem vist, molts autors creuen que es tracta de dos desordres diferents, malgrat que puguin ser ocasionats per causes molt similars. Rarament una pera afectada per llocat presenta cavitats; i a l'inrevés, en les afectades per cor marró no es dona la descomposició típica del llocat. Ara bé, el que no està tan clara és la relació entre l'enfosquiment del cor, i/o parcialment de la polpa, i la presència de cavitats. De la Plaza (1986b i 1989) i Bondoux (1994), suposen que hi ha una certa relació entre l'enfosquiment i la presència de cavitats. Per aquests dos autors, en un primer estadi es dona un enfosquiment de la polpa de tipus humit, el qual, posteriorment i com a conseqüència de la pèrdua d'aigua, pot donar lloc a la formació de cavitats. Per Hall i Scott (1977), el cor marró també comença amb un enfosquiment de tipus humit que pot estendre's a tota la polpa. Per Pierson *et al.* (1971) aquesta simptomatologia interna freqüentment està associada a símptomes externs semblants a l'escaldat.

### **3.3.- Factors causants del cor marró i el llocat**

Si, com hem vist, la determinació exacta de les fisiopaties no és fàcil, el repte el tenim quan volen saber quines són les causes que les provoquen. Sortosament, aquestes causes es poden agrupar en quatre grans blocs: els factors precollita, l'estat de maduresa en el moment de la recol·lecció, les condicions de conservació i els accidents de manipulació. Per realitzar un bon diagnòstic sempre és necessari conèixer bé les condicions de cultiu i de conservació de la fruita (Bondoux, 1994). Les alteracions fisiològiques que apareixen en les peres durant la conservació frigorífica estan relacionades amb la interacció de diversos factors de camp (adobat, regs, estat de maduresa, etc.) i de cambra, fet pel qual és extraordinàriament difícil establir quina és la causa exacta que provoca la seva aparició (García de Otazo, 1986). En el cas de les dues fisiopaties en estudi, ens centrarem en els tres grups primers ja que, com se sap, aquestes dues alteracions no són pas degudes a defectes de manipulació.



### 3.3.1.- Factors precollita

Les condicions de camp en les quals ha crescut i s'ha desenvolupat el fruit són d'extrema importància. Els factors climatològics, la nutrició i/o adobat, l'aportació d'aigua, els tractaments precollita i tots els aspectes relatius al cultiu condicionen la vida postcollita dels fruits (Kays, 1999).

#### 3.3.1.1.- La nutrició mineral

Com se sap, en el període postcollita els fruits han de sobreviure a partir de les reserves que han acumulat abans de la collita, les quals depenen de tots els factors i condicionants que han intervingut en el creixement del fruit (Dilley, 2000). No sempre els factors més òptims per al creixement del fruit són els millors per una bona conservació (Watkins, 2000).

Fins al moment poc se sap sobre la influència que poden tenir els factors nutricionals en la descomposició interna i el cor marró. La fertilització nitrogenada pot ser un dels factors que origina la presència de desordres fisiològics en peres, com els enfosquiments interns (Gherghi *et al.*, 1980). Concretament, peres de la varietat Conference fertilitzades amb alts nivells de nitrogen presentaven al final del període de conservació una major incidència de cor marró (Lentheric *et al.*, 1997). Una possible explicació és la proposada per Taulavuori *et al.* (1997), segons el qual, l'excés de nitrogen disponible en el sòl pot causar deficiències de magnesi i potassi en els teixits, les quals, al seu torn, poden incrementar l'estrès oxidatiu i, en conseqüència, els danys ocasionats per alteracions fisiològiques.

No existeix una relació directa entre alguns macronutrients com el K, Ca, Mg o P i el desenvolupament del cor marró en peres Conference (Streif *et al.*, 2001), però aplicacions de bor en precollita poden controlar l'alteració, ja que redueixen la permeabilitat de les membranes i augmenten el calci i l'ascorbat en els fruits tractats (Xuan *et al.*, 2001). A més, el bor pot protegir el sistema cel·lular de l'atac dels radicals lliures (Streif *et al.*, 2001). Aquesta teoria està recolzada en el fet que aplicacions de bor han incrementat el contingut d'àcid ascòrbic (Cakmak i Römhald, 1997; Xuan *et al.*, 2001). Estudis posteriors també van demostrar que tractaments foliaris amb bor en peres Conference feien disminuir la incidència de cor marró durant la seva conservació en AC (Xuan, 2001; Vilaplana, 2002). Segons la bibliografia, l'aplicació de bor augmenta l'assimilació del calci per part de la planta i així també es redueixen els desordres relacionats amb aquest element (Dixon *et al.*, 1993). El calci sembla ser un element important per una bona conservació de la fruita (Bangerth, 1979), ja que té un paper primordial com a estabilitzador de les membranes cel·lulars i com a activador de determinats enzims (Bush, 1995). Se sap també que el bor té efectes especials en mantenir l'estructura i la integritat funcional de les membranes cel·lulars, i de la paret cel·lular (Marschener, 1995). A més, aquest element pot millorar el sistema de defensa cel·lular contra els radicals lliures (Cakmak i Römhald, 1997), els quals es poden originar sota altes concentracions de CO<sub>2</sub> en l'emmagatzematge. No obstant, una excessiva quantitat de bor pot incrementar la incidència del llocat (Marlow i Lescher, 1984). En un estudi realitzat en peres Blanquilla, es va veure que el contingut mineral de les peres sanes era lleugerament diferent al que presentaven les peres afectades per cor marró (Delhom, 1982). Aquest autor va trobar diferències significatives en els ratis de K/Mg, K/(Ca+Mg), N+10, P+K.

### 3.3.1.2.- Altres factors de camp

Com a altres factors importants cal esmentar les condicions de camp (Luton i Holland, 1986) i les condicions climàtiques (Kays, 1999), les quals durant el creixement són definitives per induir o prevenir l'aparició d'alteracions durant el període postcollita. En la nostra varietat, climes frescos i plujosos en les dates properes a la recol·lecció afavoreixen la incidència de cor marró (De la Plaza, 1986b). Hi ha una més alta incidència de cor marró en els països de pluges abundants, com ara Alemanya i Holanda, que no pas en els països de clima mediterrani.

La presència de cor marró i, més concretament, de cavitats en la varietat Conference està fortament relacionada amb la càrrega de l'arbre (Roelofs i De Jager, 1997). Una baixa producció sembla estimular la incidència de cavitats. Segons Roelofs i De Jager (1997), la posició del fruit en l'arbre també afecta a la incidència d'aquest desordre. Així, fruits situats en la part superior de l'arbre, però no al cim, són més susceptibles de presentar aquesta alteració.

En la varietat Blanquilla, s'ha vist que aplicacions amb àcid giberèlic GA3 (De la Plaza, 1986b) fan augmentar la susceptibilitat al cor marró. Però per ara aquesta sembla ser més una relació indirecta que no pas una causa directa com a tal. Se sap que aplicacions amb GA3 fan augmentar el calibre del fruit i redueixen o anul·len el nombre de llavors i, anàlogament al CO<sub>2</sub>, disminueixen la respiració i modifiquen l'equilibri hormonal.

### 3.3.2.- El grau de maduresa a la collita

Està àmpliament reconegut que el grau de maduresa que tenen els fruits quan són recol·lectats afecta al desenvolupament de diversos desordres fisiològics. A diferència de l'escaldat, el qual té lloc en fruits més immadurs (Anet, 1972), la incidència del llocat i del cor marró augmenta significativament quan els fruits són recol·lectats excessivament madurs (Pierson *et al.*, 1971). En la varietat Blanquilla, una maduresa fisiològica avançada en el moment de la collita així com una maduresa avançada del cor (mesurada mitjançant l'acidesa) potencien el desenvolupament d'aquestes dues alteracions (De la Plaza, 1986b; Herrero, 1982; Herrero i Guàrdia 1992; Palazón, 1984). El desenvolupament del llocat s'accentuarà encara més si aquesta varietat es destina a conservació en fred normal (Herrero, 1982). En canvi, quan la collita té lloc en un estat poc avançat de maduració (6,4 a 7,3 kg de duresa amb punxó de 8mm), el fruit presenta una gran resistència a l'enfosquiment intern (Carrera, 1986).

Malgrat que la relació entre l'estat de maduresa a la collita i el desenvolupament d'aquestes fisiopaties està força comprovat, es desconeixen encara les bases bioquímiques que el regulen. Se sap que aquesta relació és bastant complexa i que té molt poc a veure amb els canvis en els paràmetres de qualitat que tenen lloc durant la maduració. El factor causal sembla ser més d'origen bioquímic, i pot ser el resultat dels canvis que tenen lloc en el metabolisme antioxidant quan els fruits han estat recol·lectats massa tard. Un increment en la maduració dels fruits va associat a un baix contingut d'antioxidants, com són l'ascorbat i el glutatió (Lentheric *et al.*, 1999).

Quan parlem de recol·leccions tardanes no hem d'oblidar el concepte de senescència prematura. Aquesta, en el cas de fruits climatèrics, implica nivells massa elevats d'etilè ja en el moment de la collita; alhora, implica alteracions que es manifesten en general com un

reblaniment dels teixits, textura farinosa de la polpa i, sovint, enfosquiments interns. La descomposició interna o llocat (*senescent breakdown*) és, alhora, un exemple de senescència accelerada, freqüent en la varietat Blanquilla després de períodes de conservació prolongats en fred normal (Recasens, 2000). Una forma de minimitzar aquests desordres és actuant sobre el propi mecanisme de la maduració i evitar així la producció d'etilè (Brackmann i Waclawosky, 2000). Per això també és convenient refredar el fruit immediatament després de la collita. Les atmosferes controlades o els xocs amb CO<sub>2</sub> són també eficaços per retardar l'aparició de la senescència.

### **3.3.3.- Condicions de conservació**

Les pròpies condicions de conservació són, en general, el principal desencadenant de les alteracions: especialment, la temperatura i la concentració dels gasos en l'atmosfera de conservació. Està àmpliament reconegut a la bibliografia que els sistemes de conservació condicionen en gran manera la vida postcollita del fruit.

#### **3.3.3.1.- La temperatura**

Com és ja molt conegut, la fruita un cop recol·lectada es col·loca en fred perquè a temperatures baixes el metabolisme s'alenteix i, amb ell, tots els processos de la maduració (Lara i Vendrell, 2000). S'ha de tenir en compte, però, que cada fruit té una temperatura líndar per sota de la qual les alteracions del metabolisme són irreversibles. Per exemple, fruites de zones temperades que poden conservar-se fins a temperatures properes a 0 °C, poden també presentar alteracions degudes al fred. En el desenvolupament d'aquestes alteracions també hi intervenen factors com el temps d'exposició a aquesta temperatura i la humitat relativa de l'atmosfera de conservació (Paull, 1999).

La pera blanquilla no és una varietat sensible al fred sinó que suporta bé temperatures properes i lleugerament inferiors a 0 °C. Les temperatures baixes es poden considerar com un factor que accentua l'acció del factor causant o principal com pot ésser, per exemple, una alta concentració de CO<sub>2</sub>. Segons De la Plaza (1986a i 1986b), l'efecte combinat de baixes temperatures i altes concentracions d'aquest gas són la causa principal del desenvolupament del cor marró en la varietat Blanquilla.

#### **3.3.3.2.- Nivell de CO<sub>2</sub> i d'O<sub>2</sub>**

La concentració dels gasos en les cambres de conservació condicionen la vida del fruit i la seva evolució durant la maduració. Baixos nivells d'O<sub>2</sub> i alts nivells de CO<sub>2</sub> alenteixen la respiració i la producció d'etilè, però també poden afectar a altres processos fisiològics associats amb la qualitat (Beaudry, 1999). En aquest cas poden aparèixer algunes fisiopaties relacionades o bé amb un metabolisme anaeròbic, o bé amb els efectes que pot tenir un alt nivell de CO<sub>2</sub> sobre les diferents espècies i varietats (Mitcham *et al.*, 1995; Carrier 1995). El punt de compensació anaeròbica varia segons cada espècie i varietat; fins i tot, segons l'estat de maduresa del fruit. Per exemple, en peres verdes aquest agafa valors del 1,6-1,7% d'O<sub>2</sub> mentre que, en peres madures els seus valors oscil·len entre el 2-5% d'O<sub>2</sub> (Nardin, 1990).

Diversos treballs posen de manifest que un alt nivell de CO<sub>2</sub>, especialment si l'atmosfera és pobra en O<sub>2</sub>, és el responsable de l'aparició de cavitats i de l'enfosquiment de la polpa en

varietats sensibles de poma i en la majoria de les varietats de pera (Recasens, 1997). En varietats de pera com la Blanquilla i la Conference un nivell elevat de CO<sub>2</sub> pot provocar les alteracions conegudes com el cor marró i la descomposició interna, que es donen quan el percentatge d'aquest gas en l'atmosfera supera el llindar de tolerància del fruit (Recasens, 2000). Un alt nivell de CO<sub>2</sub> és el factor determinant del cor marró, però l'acció d'aquest es veu força agreujada per altres factors, com són: recol·leccions tardanes, baixos nivells d'oxigen, temperatures massa baixes... (De la Plaza, 1986b). En canvi, altes concentracions de CO<sub>2</sub> en forma de xocs d'aquest gas, provoquen l'efecte contrari (Larrigaudière *et al.*, 2000; Lenthéric *et al.*, 2003). Segons aquests autors, peres Conference sotmeses a xocs de CO<sub>2</sub> d'una concentració del 10% i del 15% d'aquest gas, presentaven una disminució força significativa de la incidència de cor marró.

Per Kader (1992), la mínima concentració d'O<sub>2</sub> tolerada en peres és d'un 2% i la màxima de CO<sub>2</sub> tolerada és també aproximadament d'un 2%. Segons Hall i Scott (1977), per evitar la descomposició interna en cambres de fred normal, el nivell de CO<sub>2</sub> no hauria d'excedir l'1%. En AC, els cultivars menys sensibles (Barlett, Bosc, Doyenne de Comice) poden superar concentracions del 2%, mentre que les més sensibles, com la Blanquilla i la Conference, solament toleren bé concentracions per sota de l'1%. Segons Herrero i Guàrdia (1992), el cor marró es produeix a causa d'un excés de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera de conservació; i, més concretament, l'enfosquiment intern té lloc quan en 100 g de polpa hi ha una concentració de 100 mg de CO<sub>2</sub>; en casos greus poden arribar a formar-se cavitats de grans dimensions. El llocat també es veu agreujat considerablement per l'efecte d'una alta concentració de CO<sub>2</sub> (De la Plaza, 1986a); però l'efecte desencadenant d'aquesta alteració en fred normal és la senescència del fruit accelerada per una recol·lecció tardana (Herrero i Guàrdia, 1992).

### **3.3.3.3.- Altres factors d'interès**

Un fruit a temperatura ambient produeix més CO<sub>2</sub> que un fruit fred. Aquest fet posa de manifest la importància de refredar de forma ràpida el fruit per tal de reduir la respiració i la presència de desordres relacionats amb el CO<sub>2</sub>. La incidència de cor marró i de llocat en peres Conference després de la conservació augmenta si els fruits no són immediatament refrigerats (Roelofs i De Jager, 1997). Segons aquests autors, si peres d'aquesta varietat són refredades immediatament després d'haver-se recol·lectat i si, a més, es retarda l'establiment de l'atmosfera controlada un període mínim de 3 a 4 setmanes, es minimitza l'aparició de cor marró. En peres Blanquilla, un període més aviat curt entre la recol·lecció i el començament de la conservació sense haver refrigerat els fruits, és un factor que contribueix a l'acció del CO<sub>2</sub> i per tant augmenta la incidència de cor marró (De la Plaza, 1986b). La utilització de la prerefrigeració abans de l'entrada en cambra frena el desenvolupament del llocat i del cor marró en la pera Blanquilla (Herrero i Guàrdia, 1992).

Altres factors també importants són una adequada renovació de l'aire i no sobrepassar la densitat d'emmagatzematge en el cas de l'atmosfera normal. També es pensa, en la interacció entre el CO<sub>2</sub> i l'etilè intern com a possible causa del cor marró; així, doncs, eliminant l'etilè de la cambra es redueix considerablement la incidència d'aquest desordre (Scott i Willis, 1974).

## **4.- BIOQUÍMICA DEL COR MARRÓ I DEL LLOCAT: HIPÒTESIS DE TREBALL**

Es desconeixen encara les causes bioquímiques d'aquestes dues alteracions. Malgrat tot, hi ha diversos autors que han proposat diferents hipòtesis per tal d'explicar els metabolismes que hi estan involucrats. A continuació es presenten les hipòtesis que poden tenir una major rellevància per ajudar a elucidar la bioquímica d'aquestes dues alteracions.

### **4.1.- Hipòtesi I: El cor marró i el llocat com a conseqüència de l'enfosquiment enzimàtic i de l'acció de la PPO**

Els fruits i els vegetals sovint pateixen enfosquiments interns i/o externs durant la seva conservació i processatge. En el cas dels fruits, aquest enfosquiment sempre és molt més elevat en el cor que en la polpa. A més, l'enfosquiment de la polpa mai ha estat observat sense un enfosquiment del cor; fet que suggereix que l'enfosquiment comença al cor i s'estén cap a la polpa (Larrigaudière *et al.*, 1998). Segons Porritt *et al.* (1982), aquests símptomes són similars als que presenten els fruits afectats per descomposició interna o per cor marró.

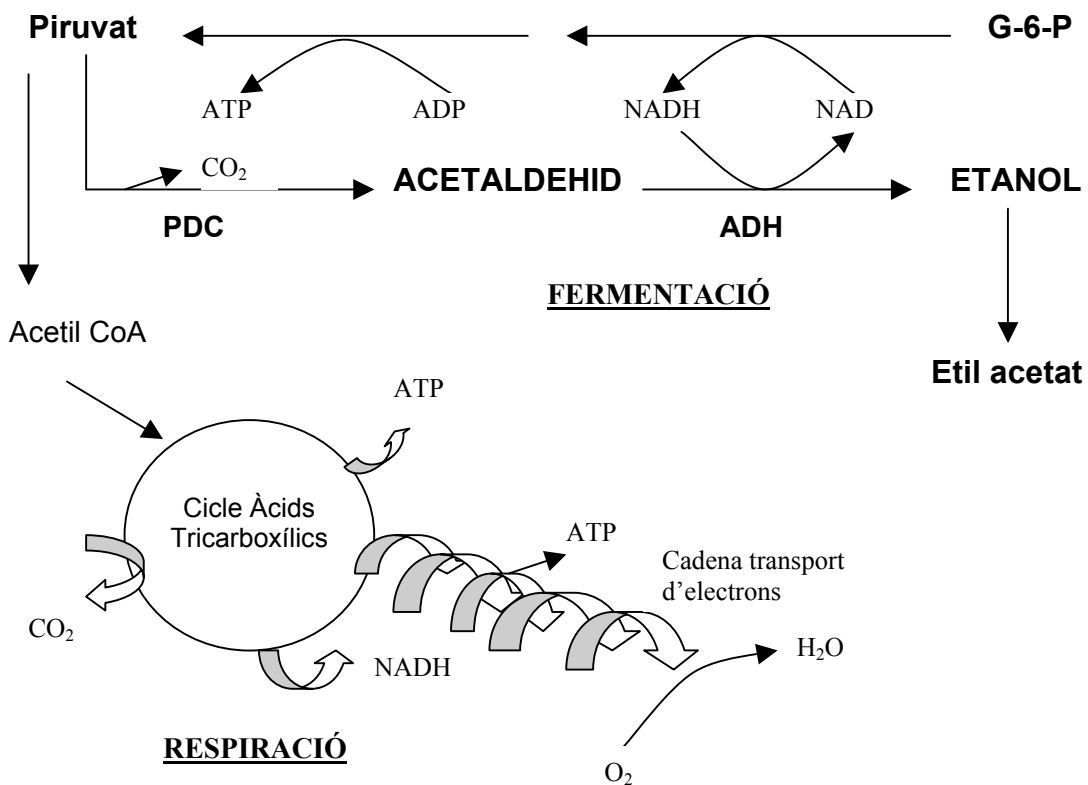
L'enfosquiment enzimàtic és degut principalment a l'oxidació natural dels compostos fenòlics en quinones, les quals, un cop polimeritzades, donen lloc a pigments de color vermellós-marronós (Mathew i Parpia, 1971; Murata *et al.*, 1995). El principal enzim implicat en aquesta oxidació és la polifenoloxidasas, PPO (Mayer i Harel, 1979). La PPO és un enzim que es troba als cloroplasts (Hutcheson i Buchanan, 1980), malgrat que en pomes també s'ha trobat en els mitocondris (Nicolas *et al.*, 1994; Mayer, 1987). En els teixits de les peres, tres compostos fenòlics representen més del 90% del contingut de fenols: l'àcid chlorogènic, el més abundant, l'(-)-epicatechin i la procianidina B2 (Amiot *et al.*, 1995) i aquests estan localitzats en els vacúols (Yamaki, 1984). Per tant, que el fruit sigui més o menys susceptible d'enfosquir dependrà de l'activitat de la PPO, del contingut de fenols, o bé d'ambdós (Goupy *et al.*, 1995). Perquè es pugui iniciar, però, la reacció de la PPO, cal que el substrat i l'enzim estiguin en contacte, fet que, com sabem, no es dona inicialment.

La poca correlació entre l'activitat de la PPO i la tendència a l'enfosquiment, ha estat bastant documentada en diversos fruits (Amiot *et al.* 1992; Cheng i Crisosto 1995) i això indica que aquest enzim no és el factor limitant de l'enfosquiment enzimàtic. Però, la PPO es troba principalment al cor dels fruits, que és la zona on l'enfosquiment és més intens (Murata *et al.*, 1995). Segons Larrigaudière *et al.* (1998), l'activitat de la PPO sembla no estar implicada directament en el desenvolupament del cor marró i de la descomposició interna en peres Conference. Fruits alterats per cor marró presentaven l'activitat de la PPO clarament inhibida. En canvi, en el primer estadi de desenvolupament de la descomposició interna sí que s'observà un increment de l'activitat d'aquest enzim (Larrigaudière *et al.*, 1998). Aquesta diferència mostra que els dos desordres probablement es deuen a processos fisiològics diferents, els quals estan encara per establir. Sembla ser que la PPO està implicada en l'últim esglaió del desenvolupament d'aquestes dues fisiopaties; per tant, l'enfosquiment enzimàtic és una conseqüència indirecta dels dos desordres (Larrigaudière *et al.*, 1998). Segons Veltman *et al.* (1999a), la reacció s'inicia quan a causa de la desintegració de les

membranes entren en contacte la PPO i els fenols. Així doncs, la PPO i els fenols són importants per al desenvolupament del cor marró però no són limitants; una baixa activitat de la PPO és suficient i a més els fenols són prou abundants perquè la reacció es pugui portar a terme (Veltman *et al.*, 1999a).

#### 4.2.- Hipòtesi II: El cor marró i el llocat com a conseqüència del procés fermentatiu

La disminució de la concentració d'oxigen en l'AC produeix un descens de la intensitat respiratòria a causa de les pèrdues d'efectivitat del sistema enzimàtic. Aquesta disminució té un límit biològic, que senyala el pas de la respiració aeròbica a l'anaeròbica, amb la conseqüent producció final d'etanol (Figura 1). Aquesta ruta metabòlica s'anomena fermentació.



**Figura 1.-** Representació simplificada de la via fermentativa (en negreta) i de la respiració aeròbica (cicle dels àcids tricarboxílics o de krebbs i cadena de transport d'electrons). Enzims involucrats en la fermentació: PDC (Piruvat descarboxilasa) i ADH (Alcohol deshidrogenasa).

La reducció en la concentració d'oxigen no és l'únic factor que condueix a la fermentació. Altres concentracions de CO<sub>2</sub> i un avançat estat de maduresa també porten a la fermentació i conseqüentment a l'acumulació d'acetaldehid i etanol, els quals produeixen una acció

tòxica en el fruit (Pesis *et al.*, 1988; Ke *et al.*, 1994). Segons Peppelenbos (1996), la fermentació també té lloc en alguns fruits sota condicions de normòxia.

Canvis en la fermentació han estat associats amb l'enfosquiment dels teixits i amb la mort cel·lular (Kader, 1986; Lidster *et al.*, 1990). A més, altres autors (Pesis *et al.*, 1988; Volz *et al.*, 1998) han trobat alts nivells d'acetaldehid i d'alcohol en fruits danyats. S'han considerat sovint els metabòlits de la fermentació com la causa d'alguns desordres que apareixen durant la conservació (Peppelenbos i Oösterhaven, 1998). Però, quin metabòlit juga un paper més important en el possible desenvolupament dels desordres? A més a més, els desordres són conseqüència de la disminució energètica que comporta el metabolisme fermentatiu?

Per Kader (1986), hi ha una relació directa entre la concentració d'etanol i la incidència de desordres. Perata i Alpi (1993) també fan referència als efectes tòxics de l'etanol però solament a molt altes concentracions, les quals mai es troben en les plantes. Segons Pfister-Sieber i Brändle (1994), la relació directa entre la concentració d'aquest compost i la incidència de desordres no està del tot clara. A més, quan els productes amb altes concentracions d'etanol són exposats a altes concentracions de CO<sub>2</sub>, l'etanol pot ser remetabolitzat, cosa que dona lloc a altes concentracions d'acetaldehid (Nanos *et al.*, 1992; Mateos *et al.*, 1993; Pfister-Sieber i Brändler, 1995). En canvi, l'acetaldehid ja es mostrava al 1928 com un compost més tòxic que l'etanol (Peppelenbos i Oösterhaven, 1998). Perata i Alpi (1991), entre altres autors, van reafirmar els efectes tòxics que tenia l'acetaldehid en els teixits de les plantes. Ara bé, no està clar si aquest s'acumula en suficient quantitat per a causar els esmentats danys (Jones 1989).

La fermentació, a més de l'acumulació dels compostos anteriorment esmentats, també comporta una disminució considerable en la producció d'energia. Segons Pfister-Sieber i Brändle (1994), els danys es produeixen quan es dona el metabolisme fermentatiu i són deguts bàsicament als canvis que es donen en el metabolisme energètic. Els desordres, probablement, són deguts a una baixa producció d'energia (baixa producció d'ATP i acidificació del pH), la qual no és suficient per a mantenir la funcionalitat de les cèl·lules (Peppelenbos i Oösterhaven, 1998). Saquet *et al.* (2000) han relacionat el cor marró amb els nivells d'ATP i amb el rati ATP/ADP, i han demostrat, així, que els canvis d'energia actuen precedint els factors que produiran els desordres.

En la varietat Blanquilla, la formació d'etanol i acetaldehid, resultat del procés de fermentació que va lligat a la descomposició dels teixits, està directament relacionada amb la incidència de la descomposició interna (Recasens, 2000). Una concentració mitjana d'etanol superior a 150 ppm en el suc d'una mostra de 30 peres, indica una predisposició dels fruits a patir l'alteració en un curt espai de temps si s'allarga la conservació (Ganau *et al.*, 1999).

En canvi, en el desenvolupament del cor marró, no sembla haver-hi una relació directa entre l'activitat enzimàtica implicada en el procés de la fermentació i l'aparició d'aquesta fisiopatia (Recasens *et al.*, 1997). En peres de la varietat Anjou, s'ha trobat un increment en l'activitat de la PDC, induïda per una baixa concentració d'oxigen (<1%), prèviament a la manifestació dels desordres SBS (taques fosques a la pell) i PBC (cor marró i sucós); s'utilitza l'activitat de la PDC com a indicador bioquímic d'aquests dos desordres (Chen 2000).

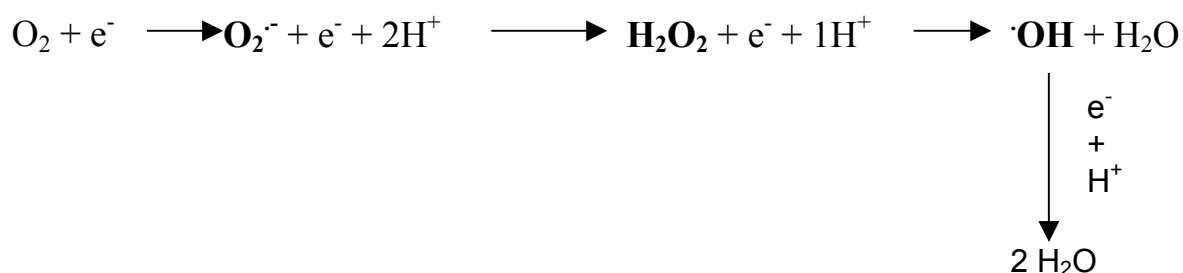
### 4.3.- Hipòtesi III: El cor marró i el llocat com a conseqüència del procés oxidatiu

#### 4.3.1.- L'estrès oxidatiu

A nivell general, els fruits presenten una ràpida resposta als canvis de les condicions ambientals (Lichtenthaler, 1996). Per exemple, un estrès provocat per baixes temperatures pot portar a l'acumulació d'espècies actives de l'oxigen (AOS), tals com el  $O_2^-$  i el  $H_2O_2$  (Prasad *et al.*, 1994). Aquests compostos són particularment reactius i poden causar de forma indiscriminada la peroxidació dels lípids de la membrana i la desnaturalització de proteïnes (Halliwell i Gutteridge 1989). Hi ha evidències que el radical superòxid ( $O_2^-$ ) està implicat en reaccions que alteren la funció de les membranes cel·lulars en flors (Mayak *et al.*, 1983) i té un paper important en el procés de maduració del fruit (Lacan i Baccou, 1998). Com a conseqüència, l'habilitat que tingui el fruit per a protegir-se i/o metabolitzar els radicals lliures i les AOS, serà un element molt important que determinarà la vida postcollita del fruit.

#### 4.3.2.- Les espècies actives de l'oxigen

Les espècies actives de l'oxigen (AOS, de l'anglès *active oxygen species*) són metabòlits que participen en el creixement i desenvolupament de les cèl·lules i, per tant, duen a terme un paper molt important en el metabolisme cel·lular quan es produeixen de forma controlada. Poden ésser produïdes per la llum, les altes temperatures, la invasió de patògens...; és a dir, per qualsevol situació d'estrès com pot ser la conservació en AC. Les AOS són intermediaris tòxics que provenen de les degradacions successives de l'oxigen, tal com es presenta en la figura 2.



**Figura 2.-** Esquema de les successives reduccions de l'oxigen i formació dels seus intermediaris reactius (Salin, 1988).

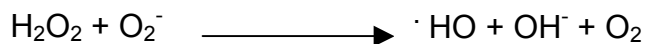
Durant aquesta reacció metabòlica es poden generar espècies amb electrons no aparellats anomenades radicals lliures, com el radical superòxid ( $O_2^{\cdot -}$ ) i el radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) o altres espècies amb l'habilitat de captar electrons com el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) (Scandalios, 1997). L'aparició d'aquests radicals pot produir força danys a les cèl·lules, especialment a les membranes i al material genètic. Les AOS són els principals mediadors dels danys oxidatius en la senescència de les plantes (Azcón-Bieto i Talón, 1993).



El radical  $\text{OH}^\cdot$  és un dels oxidants més potents que es coneix i també el més reactiu. Pot reaccionar pràcticament amb tot tipus de molècules presents en els sistemes biològics, i pot afectar a les membranes, on origina radicals lipídics per reacció amb els àcids grassos insaturats. Aquests, a la vegada, inicien una sèrie de reaccions de peroxidació que condueixen, d'una banda, a la modificació de la funcionalitat de les membranes, amb la consegüent alteració del metabolisme cel·lular, i, d'altra, al col·lapse i la mort cel·lular (Frank 1985; Halliwell i Gutteridge, 1989; Azcón-Bieto i Talón, 1993). També poden reaccionar amb les proteïnes, originant la inactivació d'alguns enzims i provocar mutacions en l'ADN (Frank 1985; Scandalios, 1997).

El radical  $\text{OH}^\cdot$ , a diferència de l'anió superòxid i del peròxid d'hidrogen, s'escapa de l'acció enzimàtica, de manera que solament se'n pot previndre la formació eliminant els metabòlits de l'oxigen precursors d'aquests radicals (Sandalio i del Río, 1991). En aquesta acció protectora hi poden intervenir diferents compostos antioxidants que actuen com a segrestadors dels radicals, sent d'especial importància l'àcid ascòrbic i el glutatió (Sandalio *et al.*, 1988; del Río *et al.*, 1990).

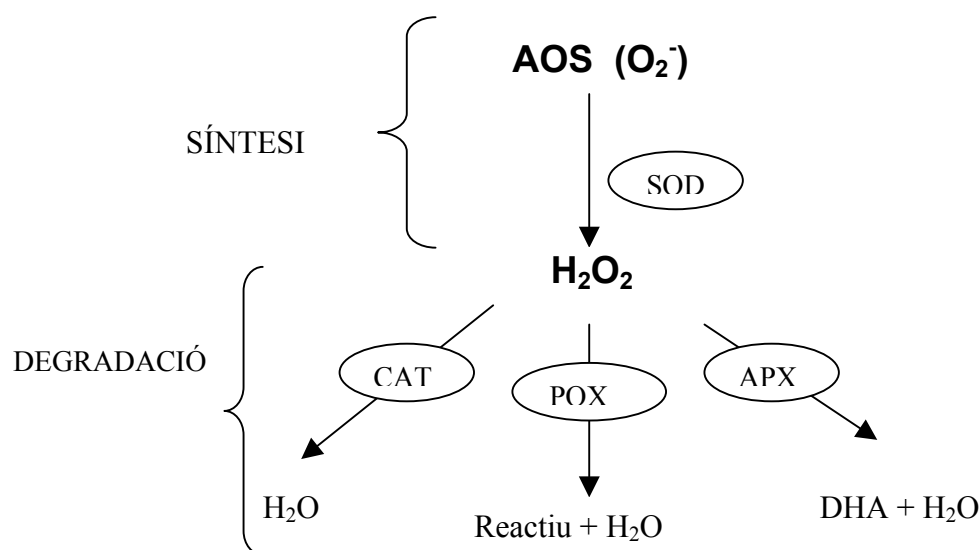
L'anió superòxid ( $\text{O}_2^\cdot$ ) és un radical poc reactiu però molt agressiu biològicament; és capaç de recórrer grans distàncies dins la cèl·lula, fins al punt de poder arribar a travessar les membranes cel·lulars (Sandalio *et al.*, 1988). La seva toxicitat, malgrat que en un principi es pensava que era altament destructiu, prové bàsicament de la generació d'espècies bastant més reactives que ell, com és el radical  $\text{OH}^\cdot$ . Aquest es forma quan el radical superòxid es combina amb el peròxid d'hidrogen segons la reacció següent (Scandalios, 1993).



Com a antioxidants solament es coneixen l'àcid ascòrbic i l'enzim SOD; a partir d'aquest últim el radical superòxid donarà lloc al peròxid d'hidrogen. La reducció d'aquest radical per l'ascorbat, tiols, ferredoxina o ions Mn, també porta a la producció de peròxid d'hidrogen (Asada i Takahashi, 1987).

El peròxid d'hidrogen és un dels constituents del metabolisme oxidant de la planta, el qual pot actuar com a oxidant i com a reductor, encara que té una reactivitat relativament baixa amb la majoria de molècules orgàniques. És un oxidant fort, capaç d'iniciar, en el lloc on s'acumula, danys oxidatius que poden portar a la destrucció de les funcions metabòliques i a la pèrdua de la integritat cel·lular (Foyer *et al.*, 1997). És l'espècie activa de l'oxigen amb més agressivitat biològica, capaç de difondre's ràpidament a l'altre costat de la membrana cel·lular. És relativament tòxic i està involucrat en la generació del radical hidròxil ( $\text{OH}^\cdot$ ).

El peròxid d'hidrogen és produït pel radical superòxid a través de dismutació espontània, o bé a partir de la reacció catalitzada per l'enzim superòxid dismutasa (SOD) (Takeda *et al.*, 1997). És el producte de reaccions que tenen lloc en els peroxisomes, en els cloroplasts i també en els mitocondris (Boveris, 1984). Donat el seu potencial redox extremadament positiu, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  és una molècula inestable que reacciona amb molts compostos reduïts i és fàcilment degradada per la catalasa (CAT). També pot ésser eliminada per altres vies com són: via de l'ascorbat mitjançant l'ascorbat peroxidasa (APX), i via altres peroxidases com la POX (Figura 3); aquestes, però, poden originar radicals lliures durant el procés, especialment de substàncies fenòliques (Sabater, 1990).



**Figura 3.-** Metabolisme del peròxid d'hidrogen.

#### 4.3.3.- Els sistemes antioxidants

Els canvis en el metabolisme antioxidant són una característica de la resposta de les plantes a canvis en les condicions ambientals. Com a resposta a l'estrès, les plantes normalment augmenten els components del seu sistema antioxidant (Jahnke *et al.*, 1991; Schöner i Krause, 1990). Aquesta resposta es pot donar a diferents nivells (Scandalios, 1997):

- Producció d'AOS.
- Resposta del sistema de defensa antioxidant com a conseqüència de l'augment d'AOS.
- Actuació dels enzims antioxidants involucrats en la detoxificació del peròxid d'hidrogen i en la protecció de la paret cel·lular.

##### 4.3.3.1.- Els compostos antioxidants no enzimàtics

Els antioxidants actuen reduint la velocitat d'autooxidació, o no permeten la propagació de la reacció en cadena (Loury, 1972). Entre les molècules que tenen propietats antioxidants es troben els anomenats antioxidants no enzimàtics. Aquests inclouen diversos compostos de baix pes molecular, com l'ascorbat (vitamina C), el glutatió, l' $\alpha$ -tocoferol i els carotenoides, que semblen actuar inactivant els radicals lliures (Taula 2).

L'ascorbat juga un paper molt important en la destrucció de les AOS: és un dels captadors de radicals lliures més important en les plantes; evita, així, el dany oxidatiu (Noctor i Foyer,

1998). El glutatió és el tiol predominant en les plantes i és un important antioxidant que intervé en la regeneració de l'ascòrbic (Foyer i Halliwell, 1976; Law *et al.*, 1983). Veurem detalladament en un altre apartat la regeneració de l'àcid ascòrbic mitjançant el cicle AA-GSH.

La vitamina C o àcid ascòrbic (AA), descoberta per Albert Szent-Györgyi al 1928, és un compost força important en la dieta humana i es presenta fonamentalment en fruits i hortalisses. És sintetitzat a partir dels sucres en el citosol de les cèl·lules i la forma natural en què es troba en els aliments és l'isòmer L. La forma D- només té un 10% d'activitat vitamínica i és la que normalment s'afegeix als aliments amb propòsits tecnològics, no nutritius.

S'ha demostrat que l'àcid ascòrbic és essencial en molts processos fisiològics de les plantes, com el creixement, la diferenciació i el propi metabolisme (Foyer 1993). Té altres funcions més específiques com la conversió de l'ACC en etilè (Smith *et al.*, 1992); i, en la fotosíntesi, elimina el peròxid d'hidrogen format durant la fotoreducció en el fotosistema I (Smirnov 1996).

Ara bé, la seva funció més coneguda, que és la que ens interessa en aquest estudi, és la d'actuar com a reductor de les AOS i minimitzar així els danys causats per l'estrès oxidatiu. És un antioxidant pràcticament insoluble en greixos i olis. En els sistemes aquosos té activitat antioxidant solament a concentracions elevades ( $10^{-3}$  M). La seva estabilitat es veu modificada per diversos factors com la pressió parcial, el pH, la llum, els enzims, els catalitzadors metàl·lics (com  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ ) i la temperatura.

L'àcid ascòrbic es troba en els cloroplasts, en el citosol i en els vacúols; si bé entre el 20 i el 40% d'aquest està localitzat en el cloroplast. Aquest orgànul conté els enzims necessaris per la seva regeneració ja sigui via MDHAR (monodehidroascorbat reductasa) bé via DHAR (dehidroascorbat reductasa), com es veurà més endavant.

#### **4.3.3.2.- Els sistemes enzimàtics**

El mecanisme enzimàtic de protecció contra l'estrès oxidatiu involucra una sèrie àmplia d'enzims antioxidants com la superòxid dismutasa (SOD) i la catalasa (CAT), els quals tenen un paper important en l'eliminació de les AOS, concretament en la formació i degradació del  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivament. Altres enzims, com l'ascorbat peroxidasa (APX), la dehidroascorbat reductasa (DHAR), la monodehidroascorbat reductasa (MDHAR) i la glutatió reductasa (GR) es troben especialment involucrats en la regeneració de l'ascorbat i netegen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que hi pugui haver en els cloroplasts i en els mitocondris.

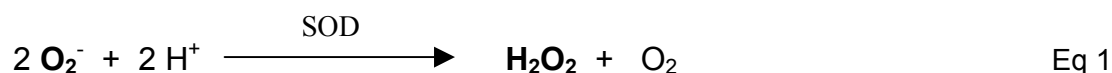
Altres enzims antioxidants com les peroxidases (POX) actuen eliminant l'excés de peròxid d'hidrogen acumulat en la paret cel·lular.

#### **El sistema SOD-CAT**

La SOD i la CAT formen el sistema antioxidant més eficient (Scandalios 1993, taula 2). La seva acció combinada permet convertir el perillós radical superòxid ( $\text{O}_2^-$ ) i el peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en aigua i oxigen molecular.

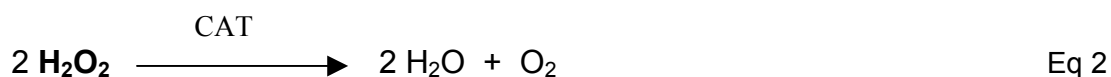
La superòxid dismutasa forma part d'un grup de metaloenzims que constitueix una defensa primària de les cèl·lules davant el radical  $O_2^-$ . Existeixen tres famílies principals de SODs que es diferencien en el metall del seu grup prostètic: Fe-SODs, Mn-SODs i Cu,Zn-SODs (Sandalo i del Rio, 1991). Aquests isoenzims són presents en molts teixits, si bé en baixes concentracions.

La SOD protegeix a les cèl·lules dels efectes dels radicals lliures com el  $O_2^-$ , format en diverses reaccions enzimàtiques. En solucions aquoses aquest mateix anió sofreix una dismutació mitjançant l'acció de l'enzim SOD segons la reacció següent (Equació 1).



L'eliminació del radical  $O_2^-$  en els cloroplasts es dut a terme pels isoenzims Cu,Zn-SOD i/o la Fe-SOD, amb formació de  $H_2O_2$ , que, a la vegada, és eliminat pel cicle ascorbat-glutatió, donat que aquests orgànuls no tenen activitat catalasa (Halliwell 1987; Asada i Takahashi 1987). En els mitocondris, la presència de Mn-SOD i Cu,Zn-SOD regula la producció de radicals superòxid (Rabinowitch i Fridovich, 1985). En els peroxisomes també ha estat demostrada la presència de les mateixes SODs que en el mitocondri.

La catalasa, que bàsicament es troba en els mitocondris i els peroxisomes, catalitza una reacció en la qual una molècula de peròxid d'hidrogen actua com a donadora i una segona molècula actua com acceptora d'àtoms d'hidrogen, segons la reacció (Equació 2) (Whitaker, 1994).



Malgrat que aquest enzim no necessita un donador d'electrons, es necessiten altes concentracions de CAT per a eliminar una baixa concentració de  $H_2O_2$  (Asada 1992).

Dins del peroxisoma es troben segregats la majoria dels enzims catalasa que utilitzen el peròxid d'hidrogen i el descomponen en aigua i oxigen (Lehninger, 1987).

La capacitat dels teixits de protegir-se enzimàticament del radical superòxid disminueix amb l'edat de les plantes (Sung 1996). Així, la superòxid dismutasa total disminueix en els cotiledons a mesura que el teixit es torna senescent (Pauls i Thompson, 1984). Molts estudis també han demostrat que l'activitat de la catalasa disminueix durant la senescència (Frenkel 1978; Dhinsa *et al.*, 1981).

**Taula 2.- Sistema d'enzims antioxidants en plantes superiors segons Scandalios (1993).**

<b>Localització Subcel·lular</b>	<b>Tipus d'AOS generats</b>	<b>Font d'AOS</b>	<b>Sistema Enzimàtic Protector</b>	<b>Productes</b>	<b>Protecció no enzimàtica</b>
<b>CLOROPLAST</b>	$O_2^-$ $H_2O_2$	PSII Enzimàtica	SOD APX	$H_2O_2$ DHA, GSSG i $NADP^+$	Flavonoides Carotenoides Xantofil·les $\alpha$ - tocoferol GSH i AsA
<b>MITOCONDRI</b>	$O_2^-$ $H_2O_2$	Transport d' $e^-$ Enzimàtica	SOD POX APX CAT	$H_2O_2$ $H_2O$ $H_2O$ i DHA $H_2O$ i $O_2$	
<b>CITOSOL</b>	$O_2^-$ $H_2O_2$	Enzimàtica	SOD CAT APX POX	$H_2O_2$ $H_2O$ i $O_2$ $H_2O$ i DHA $H_2O$	AsA GSH
<b>GLIOSIXOMA i PEROSIXOMA</b>	$H_2O_2$ $H_2O_2$	$\beta$ -oxidació Fotorespiració	CAT CAT	$H_2O$ i $O_2$ $H_2O$ i $O_2$	

### El cicle ascorbat-glutatió

Un mode alternatiu a la CAT per a la destrucció del  $H_2O_2$  són les peroxidases. Aquestes es troben àmpliament distribuïdes en la cèl·lula i, a més, la seva afinitat amb el  $H_2O_2$  és més gran que la que presenta la CAT. Les peroxidases, malgrat ser efectives a baixes concentracions, necessiten d'un donador d'electrons i d'un sistema regenerador d'aquest (Asada 1992). En el cas de les plantes, el substrat reductor més important per a la detoxificació del  $H_2O_2$  és l'ascorbat (AA), i també el glutatió (GSH), el qual permet regenerar l'ascorbat.

Un exemple de peroxidasa molt utilitzat per detoxificar el  $H_2O_2$  és l'enzim ascorbat peroxidasa (APX). Aquest mecanisme opera en el cloroplast, en el mitocondri i en el citoplasma (taula 2).

L'ascorbat peroxidasa (APX) utilitza dues molècules d'ascorbat per a reduir el  $H_2O_2$  a aigua, amb la conseqüent formació de dues molècules de monodehidroascorbat (MDHA; figura 4).

El MDHA té una vida curta: si no és ràpidament reduït, dona lloc a ascorbat i a dehidroascorbat (DHA). Dins de la cèl·lula (per exemple en el plasmolema o en la membrana tilacoïdal), el MDHA pot ser reduït directament a ascorbat. El donador d'electrons per la reducció del MDHA pot ser el citocrom-b, la ferredoxina reduïda o el NAD(P)H. Aquesta reacció és catalitzada per la MDHA reductasa, la qual es troba en molts compartiments cel·lulars. A més de la regeneració enzimàtica i no enzimàtica de l'ascorbat a partir del

MDHA, la ràpida desproporció del MDHA significa que sempre es produeix una quantitat de DHA. Aquest es reduït a ascorbat per l'acció de l'enzim DHA reductasa, el qual utilitza el GSH com a substrat reductor. Aquesta reacció genera glutatió disulfid oxidat (GSSG), el qual pot tornar a ser reduït a glutatió mitjançant l'acció de l'enzim glutatió reductasa (GR) utilitzant el NADPH. En cas que el DHA no sigui ràpidament reduït a ascorbat, serà catabolitzat a productes de 2 i 4 carbonis, com són l'oxalat i el tartàric, que poden acumular-se a molt altes concentracions (Loewus 1988).

L'eliminació del  $H_2O_2$  mitjançant aquest conjunt de reaccions es conegut com el cicle de l'ascorbat – glutatió. En definitiva, segons aquest cicle, l'ascorbat i el glutatió mitjançant l'acció de quatre enzims permeten la reducció del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  utilitzant els electrons derivats del NAD(P)H.

Un altre enzim que també intervé de forma indirecta en aquest cicle és l'ascorbat oxidasa (AAO), el qual oxida l'ascorbat a àcid dehidroascòrbic (DHA) segons la reacció de la figura 4 (Lin i Varner 1991; Loewus 1980). La funció biològica d'aquest enzim no està clara però se sap que participa en el sistema redox de l'àcid ascòrbic (Weis 1975). La seva localització cel·lular tampoc està ben determinada. Ha estat localitzada a la paret cel·lular on té un paper important en la reorganització d'aquesta, durant el ràpid creixement dels fruits de les cucurbitàcies (Lin i Varner, 1991).

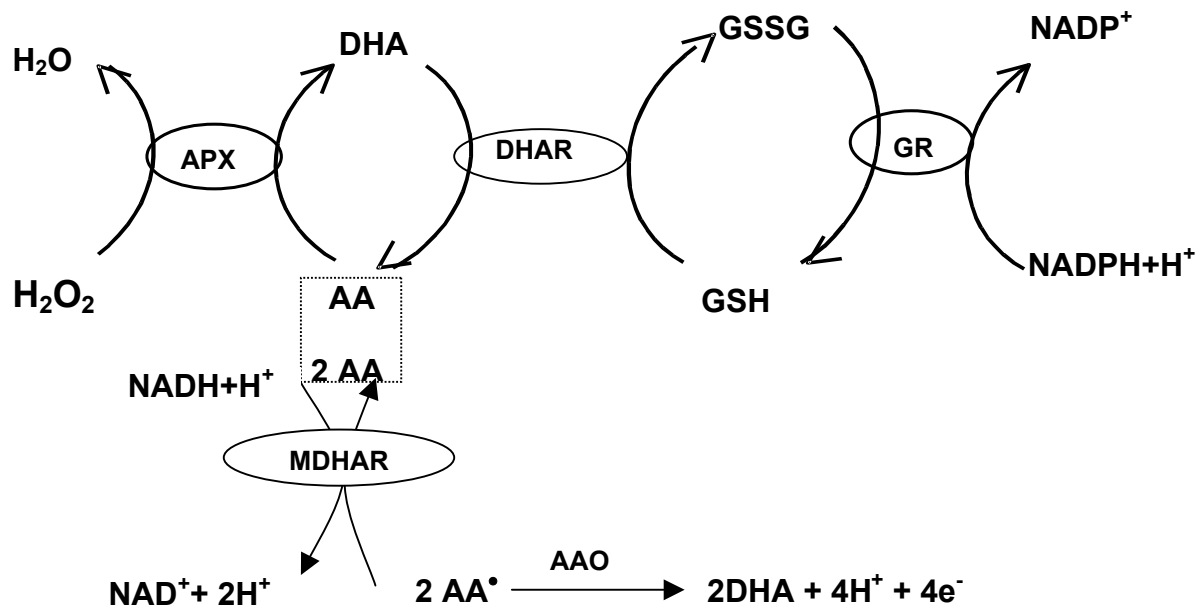
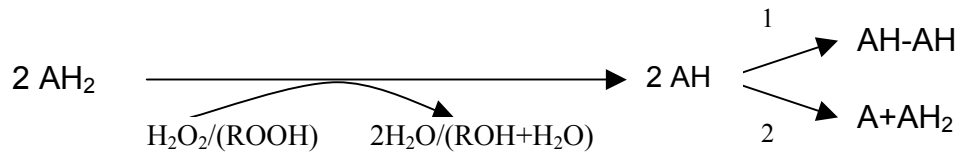


Figura 4.- Cicle de regeneració de l'ascorbat.

### Altres peroxidases

Les peroxidases es localitzen en les parets cel·lulars i catalitzen l'oxidació d'un substrat, utilitzant el poder oxidant del peròxid d'hidrogen o dels hidroperòxids orgànics. En són exemples la guaiacol peroxidasa, la glutatió peroxidasa, la citocrom-c peroxidasa i la NADH peroxidasa. El substrat generalment és un compost aromàtic (tirosina, fenols...), encara que també poden actuar sobre compostos no aromàtics com l'àcid ascòrbic.

La reacció pot ésser de dos tipus segons els productes formats (Figura 5). Poden donar lloc a un dímer entre restes de fenols enllaçats a polisacàrids i formació de ponts entre els fenols (1a reacció) (Azcón-Bieto i Talón, 1993).



**Figura 5.-** Reacció de les peroxidases (Azcón-Bieto i Talón, 1993).

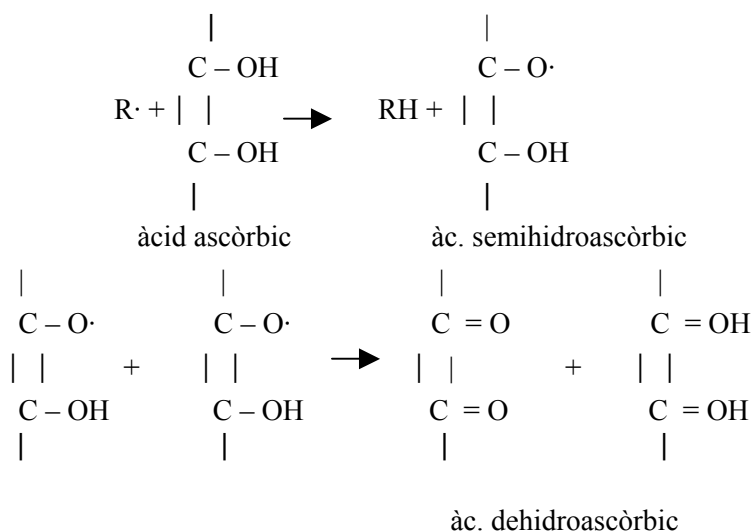
L'altre tipus de reacció (2a reacció) donarà lloc a l'oxidació del substrat sense produir una dimerització (dehidroascorbat). La funció d'aquests enzims en la paret cel·lular és doble: primer, la formació de dímers, cosa que provoca modificacions estructurals en la paret (1a reacció); segon, l'eliminació de peròxids sense modificar l'estructura de la paret (2a reacció). Ambdues reaccions competeixen pel  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 4.3.4.- El paper de l'àcid ascòrbic i del seu metabolisme en la prevenció del cor marró i del llocat

En resposta a determinades situacions d'estrès, les plantes normalment incrementen molts dels components del seu sistema antioxidant (Jahnke *et al.*, 1991; Schöner i Krause, 1990). Un augment en la quantitat d'ascorbat ha estat associat a determinades situacions d'estrès (Walker i Mckersie, 1993). Ponting i Joslyn, al voltant del 1948, ja van relacionar l'oxidació de l'AA amb l'enfosquiment dels teixits i van observar que l'enfosquiment no es donava fins que tot l'AA estava oxidat. El 1960, Bogdanski va relacionar el cor marró amb la desaparició d'àcid ascòrbic i va observar que les zones més alterades per aquest desordre presentaven una menor concentració d'aquest compost. Posteriorment es va comprovar l'existència d'una relació entre la disminució en la quantitat d'ascorbat i una menor capacitat per a previndre els danys oxidatius (Noctor i Foyer, 1998). Veltman i Peppelenbos (1998) van relacionar la disminució d'AA durant la conservació en AC amb desordres fisiològics, com el cor marró. A més, van observar que fruits amb un alt contingut d'AA solament desenvolupament lleugerament la fisiopatia (Veltman i Van Schaik, 1997). Segons Eccher Zerbini *et al.* (2002) el cor marró s'inicia en peres Conference quan el nivell d'AA ha disminuït per sota d'un determinat valor llindar. Aquesta disminució també s'ha observat en la senescència de les plantes (Borracino *et al.*, 1994).

Ara bé, com protegeix l'AA a les macromolècules vitals dels danys oxidatius? L'AA actua captant molècules d'oxigen o agents reductors i intervé en reaccions redox, gràcies a la seva funció eno-diol (Sabater, 1990). La molècula de l'àcid ascòrbic actua captant un radical lliure ( $\text{R}^\cdot$ ) i es transforma de manera transitòria en un radical que pateix una dismutació per donar dues substàncies no radicals (Figura 6). L'AA en presència d'oxigen s'oxida fàcilment i es transforma, de manera reversible, en àcid dehidroascòrbic (DHA), que posteriorment, en presència d'aigua passa a àcid 2,3-dicetogulònic, amb la conseqüent pèrdua d'activitat

vitamínica. El DHA és inestable a pH superior a 6, en descomposar-se, dona lloc a l'àcid tartàric i a l'oxalat.



**Figura 6.-** Mecanisme antioxidant de l'àcid ascòrbic (Sabater, 1990).

#### 4.4.- Hipòtesi IV: El cor marró i el llocat com a conseqüència del procés de senescència i de la peroxidació de membranes

La senescència comporta una sèrie de processos complexos que condueixen a la mort d'un òrgan o de tota la planta. El propi procés de la senescència implica múltiples i complexos canvis metabòlics que poden estar associats al desenvolupament de les fisiopaties; algunes d'elles són la manifestació d'aquest fenomen. La descomposició interna en la pera Blanquilla és un exemple de senescència accelerada (Recasens, 2000).

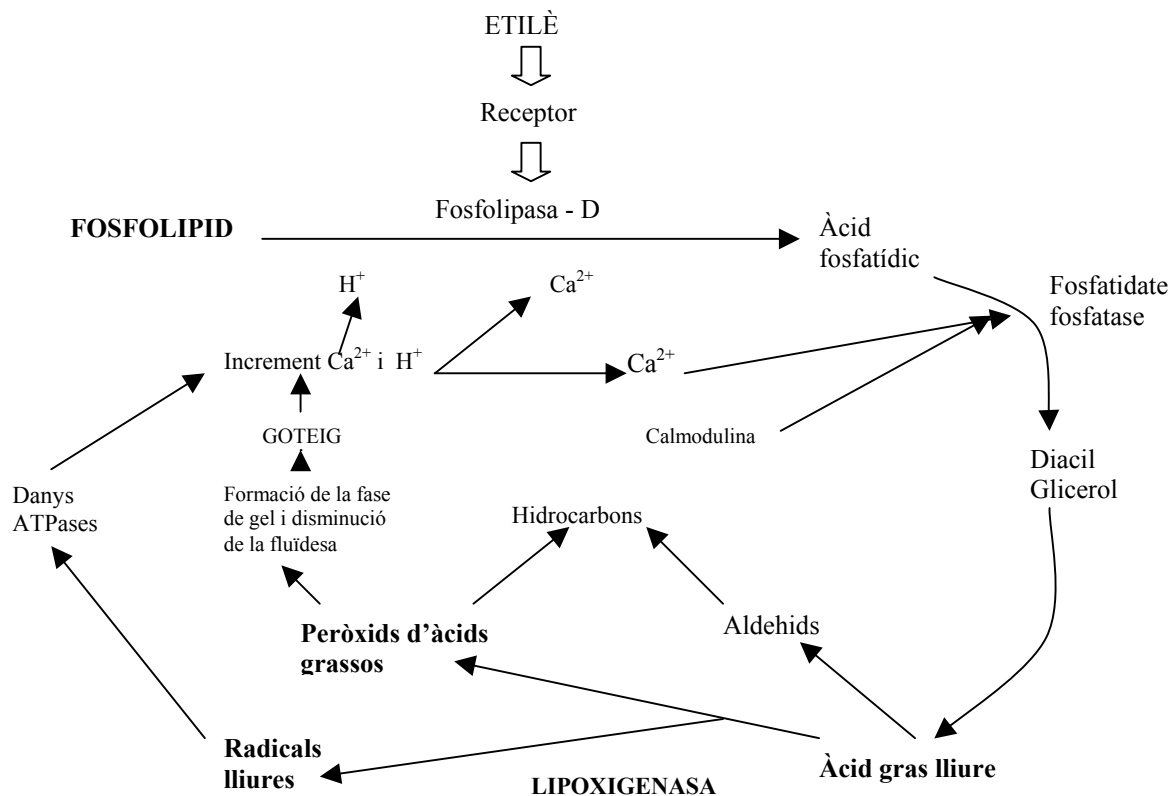
Entre els molts canvis metabòlics que aquesta comporta, cal esmentar els següents: increment de la síntesi d'etilè i, per tant, de la maduració en si; reducció del metabolisme respiratori (Knee, 1980) i, com a conseqüència, reducció de la producció d'ATP (Andreev *et al.*, 1993); augment del metabolisme fermentatiu i producció de radicals lliures. Aquests darrers, en absència d'un sistema de protecció eficient, produiran la peroxidació dels lípids de les membranes i finalment la degradació d'aquestes amb tot el què això comporta. També s'ha de tenir en compte l'acció de les poliamines, en ser substàncies captadores de radicals lliures, tenen una acció antisenescent i estabilitzadora de les membranes (Tiburcio *et al.*, 1993).

##### 4.4.1.- L'alteració de les membranes cel·lulars

El deteriorament de les membranes cel·lulars és un fet demostrat en la senescència de les plantes i és el resultat del catabolisme dels lípids i de les proteïnes de la membrana. Com passa amb la senescència, el procés de maduració del fruit també implica un deteriorament de les membranes cel·lulars (Rogiers *et al.*, 1998).



Aquesta pèrdua de la integritat de les membranes pot estar associada a l'acció de les AOS i, especialment, al radical  $\text{OH}^-$ , o bé a l'acció enzimàtica d'alguns enzims com les lipases i la lipoxigenasa (LOX) (Figura 7). El radical  $\text{OH}^-$ , tret que sigui metabolitzat, pot causar la peroxidació dels lípids de les membranes i la desnaturalització de proteïnes (Halliwell i Gutteridge, 1989). Aquest radical lliure com a causant dels danys de peroxidació és descrit com un important mecanisme mediador en la maduració i senescència del fruit (Lacan i Baccou, 1998). Pauls i Thompson (1984) van associar increments de l'activitat de la LOX amb danys oxidatius.

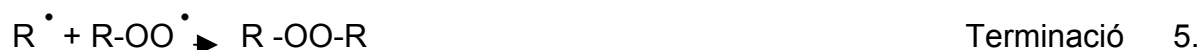
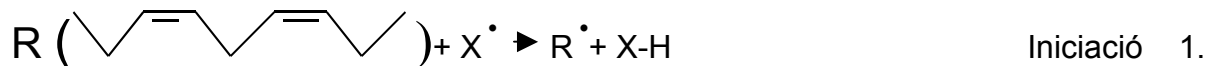


**Figura 7.-** Representació esquemàtica de les reaccions involucrades en el deteriorament de les membranes. La naturalesa autocatalítica del cicle prové de l'acumulació dels productes de degradació dels lípids, els quals condueixen a la desestabilització de la membrana i a la pèrdua de compartimentació (Paliyath i Droillard, 1992).

#### 4.4.1.1- La peroxidació de les membranes

La peroxidació dels lípids de la membrana pot ser la causa, o una de les causes, de la desestabilització de les membranes i aquesta, com a conseqüència, pot portar a la descompartimentació intracel·lular (Veltman *et al.*, 1999b).

Durant la peroxidació lipídica, l'oxigen molecular  $O_2$  és incorporat als àcids grassos poliinsaturats (XH) per formar hidroperòxids de lípids (R-OOH). Un iniciador ( $X^\bullet$ ) promou la peroxidació; més ben dit, aquesta comença amb la reacció anomenada d'iniciació (Equació 1).



En la reacció d'iniciació es forma un radical alquil ( $R^\bullet$ , Eq 1). Aquests radicals alquils fàcilment poden afegir  $O_2$  i formen un radical peroxil ( $R-OO^\bullet$ , Eq 2) i, segons es mostra en l'equació 3, la reacció es va propagant. Aquestes tres primeres reaccions constitueixen la reacció en cadena, ja que el radical  $X^\bullet$  que inicia l'atac en la reacció 1 es regenera en la reacció 3, i atacarà una altra molècula d'àcid gras poliinsaturat i així successivament. Les reaccions 4 i 5 són de terminació.

Com a resultat d'aquest procés de peroxidació s'han arribat a mesurar més de 100 productes diferents. Com a indicadors del grau de deteriorament de les membranes s'ha de mesurar el contingut en malonaldehid (MDA) o bé els continguts de pentà i età. D'acord amb això, Veltman *et al.* 1999b, van mostrar que peres Conference afectades per cor marró produïen i emetien età i, alhora, van afirmar que la quantitat d'età emesa es podia correlacionar amb el grau d'alteració. Es desconeix, però, si la quantitat de metà produïda depèn de la severitat de l'enfosquiment i de la formació de cavitats (Veltman, 2002).

#### 4.4.1.2.- La lipoxigenasa (LOX)

La lipoxigenasa (LOX), també coneguda com lipoxidasa i carotè oxidasa, catalitza l'oxidació dels àcids grassos que contenen un enllaç *cis,cis-1,4*-pentadiè; en la reacció es produeixen els corresponents hidroperòxids, els quals provoquen danys biològics a les membranes. Moltes lipoxigenases tenen poca afinitat pels àcids grassos esterificats, i prefereixen com a substrat àcids grassos poliinsaturats lliures, com l'àcid linoleic i l'àcid  $\alpha$ -linolènic (Tood *et al.*, 1990). Els hidroperòxids obtinguts en la reacció poden ser metabolitzats per diferents vies. Una d'elles és la que dóna com a producte alcohols i aldehids, com el MDA, el qual serveix per a quantificar la importància del procés de peroxidació dels lípids. També es pot obtenir, per una altra via, àcid jasmònic, el qual està directament implicat en la senescència; o bé, per una via alternativa, radicals lliures.

La LOX, en la majoria dels teixits de les plantes, està implicada en els processos de senescència (Marcus *et al.*, 1988). Els hidroperòxids dels àcids grassos poden causar la

senescència per diversos mecanismes: la inactivació de la síntesi de proteïnes, la inhibició de l'activitat fotoquímica en els cloroplasts i el deteriorament de les membranes cel·lulars (Hildebrand 1988). El primer pas en l'oxidació dels fosfolípids de les membranes és l'alliberació dels àcids grassos per part de les diferents lipases; més concretament, per la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Els radicals lliures (més especialment, el radical superòxid) promouen l'alliberament dels àcids grassos insaturats (San Filippo *et al.*, 1976). Seguidament es pot donar la peroxidació d'aquests àcids grassos per part de la LOX.

#### **4.4.2.- Conseqüències de l'alteració de les membranes**

El procés de peroxidació condueix a un increment de la permeabilitat de les membranes amb la conseqüent pèrdua de calci, fet que comporta un deteriorament d'aquestes i una pèrdua de les seves funcions metabòliques. En aquest estat, les membranes deixaran passar substrats inicialment compartimentats i, per tant, es podran desenvolupar reaccions d'oxidació enzimàtica que conduiran a l'enfosquiment enzimàtic. Veltman (2002) estableix la hipòtesi que l'inici del desenvolupament del cor marró té lloc, almenys parcialment, quan es dona la disrupció de les membranes intracel·lulars i la descompartimentació. Ara bé: com i sota quines condicions són danyades les membranes? Frenkel i Patterson (1973) van observar que peres sota determinades concentracions de CO<sub>2</sub>, presentaven alteracions en diversos orgànuls, com els mitocondris, els vacúols i els plastidis.

#### **4.5.- Hipòtesi V: Altres factors probablement involucrats en aquests desordres**

##### **4.5.1.- Grau de difusió del CO<sub>2</sub> dins la cèl·lula**

Una de les principals causes del cor marró i del llocat és el CO<sub>2</sub>. La concentració d'aquest gas dins del fruit dependrà de l'intercanvi de gasos. Aquest intercanvi està governat per la producció de CO<sub>2</sub> i el consum d'oxigen, d'una banda, i, d'altra, pel transport d'aquests gasos cap a la cèl·lula. Una de les dificultats amb què es troben aquests gasos és la baixa porositat i la resistència a la difusió que presenta el teixit de la pera (Williams i Patterson, 1964; Dadzie *et al.*, 1996; Streif 1999). Segons Rajapakse *et al.*, (1990), la principal via d'intercanvi pel O<sub>2</sub> i el CO<sub>2</sub> és a través de les lenticel·les del fruit. La fase aquosa dins del fruit és una altra barrera especialment per l'O<sub>2</sub>, ja que la solubilitat d'aquest gas en aigua és considerablement menor que la solubilitat del CO<sub>2</sub>. Això porta a una acumulació de CO<sub>2</sub> dins dels espais intracel·lulars i en la fase aquosa (De Wild i Peppelenbos, 2001). Però tenint en compte que el pH del citoplasma en peres està comprès entre 7 i 7,5 (Nanos i Kader, 1993), la majoria d'aquest gas (80-90%) estarà present en forma de bicarbonat (De Wild i Peppelenbos, 2001), el qual, en tractar-se d'una molècula gran, té molt difícil el seu pas a través de les membranes.

#### **4.5.2.- Disminució de l'energia disponible**

Una altra hipòtesi que podria explicar el desenvolupament d'aquestes fisiopaties en peres, és la caiguda de la concentració d'ATP per sota d'un determinat nivell (Peppelenbos i Oösterhaven, 1998). Com ja és conegut, el CO<sub>2</sub> disminueix notablement la respiració i, per tant, potencialment condueix a una disminució de la producció ATP. Nanos i Kader (1993) i Lange i Kader (1997) van relacionar la presència de desordres amb la disminució d'ATP i també amb la disminució del pH intracel·lular. Saquet *et al.*, (2000) també van relacionar el cor marró en peres Conference amb els nivells d'ATP i amb el rati ATP/ADP, i van mostrar que la disponibilitat d'energia pot ser un factor fonamental per a explicar la incidència d'aquests desordres. Aquests mateixos autors, en canvi, no van trobar cap mena de relació entre les concentracions de NAD(H) i NADP(H) i la incidència de desordres en peres Conference. Segons Veltman *et al.*, (2002), el cor marró pot ser iniciat pel fet de no haver suficient energia disponible per a mantenir l'estructura de les membranes. En cèl·lules de patata s'ha trobat una relació directa entre el metabolisme energètic i la integritat de les membranes (Rawlyer *et al.*, 1999).

#### **4.5.3.- Acció tòxica d'algunes substàncies**

Un altre fet que també podria conduir a aquests desordres és l'acumulació de certes substàncies tòxiques. Segons Williams i Patterson (1962), un increment en la concentració de CO<sub>2</sub> portaria a inhibir l'activitat de la succinat deshidrogenasa, la qual, com a conseqüència, conduiria a l'acumulació d'àcid succínic. Per Hulme (1956), aquests desordres són causats essencialment per la toxicitat de l'àcid succínic i, per Monning (1983), aquesta toxicitat es veuria accentuada per l'acumulació d'alanina.

De tota manera, sembla bastant clar que cap dels paràmetres anteriors no pot explicar per sí sol el desenvolupament d'aquestes dues alteracions. El llocat i el cor marró són, segurament, una combinació de tots ells (AA, AOS, nivells i producció d'ATP...) i potser, d'alguns més.

## OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi és avançar en el coneixement de les alteracions fisiològiques del cor marró i del llocat de la pera Blanquilla. Concretament, es volen determinar les causes involucrades en l'aparició i el desenvolupament de les fisiopaties esmentades, segons es detalla en els objectius següents:

1. Estudiar l'efecte de diferents atmosferes de conservació, especialment la d'alts nivells de CO<sub>2</sub>, sobre la incidència del cor marró i del llocat en la pera Blanquilla.
2. Avaluar la incidència d'aquestes dues alteracions en funció de l'estat de maduresa a la collita. Determinar el moment òptim de la collita per tal de minimitzar l'aparició d'aquests desordres.
3. Determinar si el cor marró i el llocat són dues fisiopaties diferents o bé són dues manifestacions diferents d'una mateixa alteració. Caracteritzar-les en funció dels factors que les determinen i en funció del temps d'aparició.
4. Caracteritzar la via o vies bioquímiques implicades en l'aparició i el desenvolupament tant del cor marró com del llocat. Aquest objectiu es concreta en l'estudi dels següents punts:
  - Determinar el paper del metabolisme fermentatiu en cadascuna de les alteracions.
  - Determinar la importància del metabolisme antioxidant en el desenvolupament d'aquestes alteracions.
  - Determinar la relació amb els processos de peroxidació de les membranes per tal d'establir la importància d'aquest procés en el desenvolupament dels desordres.
5. Confirmar amb l'anàlisi multivariant els resultats obtinguts prèviament amb les anàlisis bioquímiques.
6. Establir mitjançant l'anàlisi multivariant diferents models de predicció per a cada alteració. Estudiar-ne i avaluar-ne la seva posterior aplicació.
7. Proposar un paràmetre com a marcador, a ser possible fàcil de determinar, capaç de predir l'aparició dels desordres i/o de detectar els fruits alterats. Comprovar mitjançant la tècnica de classificació de l'anàlisi multivariant si el marcador proposat permet distingir els fruits alterats dels sans.

## Referències

- AMIOT, M.J., TACCHINI, M., AUBERT, S., NICOLAS, J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars and maturity. *Journal of Food Science*, 57: 958-962.
- AMIOT, M.J., TACCHINI, M., AUBERT, S.Y., OLESZEK, W. 1995. Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1132-1137.
- ANDREEV, D.L., COBB, B.G., JOHNSON, J.R., DREW, M.C. 1993. Hypoxic and anoxic induction of alcoholdehydrogenase in roots and shoots of seedlings of *Zea mays*. *Plant Physiology*, 101: 407-414.
- ANET, E. 1972. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. IX. Effect of maturity and ventilation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 23: 763-769.
- ASADA, K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 235-241.
- ASADA, E., TAKAHASHI, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: *Photoinhibition* pp. 221-286. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam-New York-Oxford.
- AZCÓN-BIETO, J., TALÓN, M. 1993. *Fisiología y Bioquímica vegetal*. Ed. Interamericana. McGraw-Hill.
- BANGERTH, F. 1979. Calcium-related physiological disorders of plants. *Annual Review of Phytopathology*, 17: 97-122.
- BEAUDRY, R.M., 1999. Effect of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharvest Biology and Technology*, 15: 293-303.
- BONDOUX, P. 1994. *Enfermedades de conservación de frutos de pepita, manzanas y peras*. Ed. Mundi-Prensa. ISBN 84-7114-334-8.
- BORRACINO, G., MASTROPASQUA, L., DE LEONARDIS, S., DIPIERRO, S. 1994. The role of ascorbic acid system in delaying the senescence of oat (*Avina sativa L.*) leaf segments. *Journal of Plant Physiology*, 144: 161-166.
- BOVERIS, A. 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide mitochondria. *Methods Enzymology*, 105: 429-435.
- BRACKMANN, A., WACLAWOSKY, A.J. 2000. Responses of “Gala” apples to preharvest treatment with AVG and low ethylene storage. *Proceedings of 4<sup>th</sup> International Conference on Postharvest. Jerusalem, Abstract*, pp. 80.
- BUFLER, G., STREIF, J. 1986. Ethylene biosynthesis of “Golden Delicious” apples stored in different mixtures of carbon dioxide and oxygen. *Scientia Horticulturae*, 30: 177-185.
- BURG, S.P., BURG, E.A. 1969. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiology*, 42: 144-145.
- BUSH, D. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 95-122.
- CAKMAK, I., RÖMHELD, V. 1997. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plants and Soil*, 193: 71-83.

- CARRERA, M. 1986. Agua de Aranjuez, 840 AD-T. *Fruticultura profesional*, 5: 17.
- CARRIER CORPORATION. 1995. Controlled Atmosphere Handbook; a Guide for Shipment of Perishable Cargo in Refrigerated Containers. Ed. Carrier Transicold Division, New York.
- CHENG, G.W., CRISOSTO, C.H. 1995. Browning potential, phenolic composition, and polyphenol-oxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120: 835-838.
- CHEN, M. 2000. Pyruvate decarboxylase is a reliable biochemical marker for forecasting physiological disorders of "Anjou" pears in CA storage. *Proceedings of 4<sup>th</sup> International Conference on Postharvest. Jerusalem, Abstract*, pp. 13.
- DADZIE, B., BANKS, N., CLELAND, J., HEWETT, E. 1996. Changes in respiration and ethylene production of apples in response to internal and external oxygen partial pressures. *Postharvest Biology and Technology*, 9: 297-309.
- DARP, 2001. Estadística i conjuntura agrària. Departament d'agricultura, ramaderia i pesca.
- DE LA PLAZA, J.L. 1986a. La vida post-recolección de los frutos. *Fruticultura profesional*, 2: 28-35.
- DE LA PLAZA, J.L. 1986b. Corazón pardo en pera. *Fruticultura profesional*, 6: 9.
- DE LA PLAZA, J.L. 1989. Control de las alteraciones fisiológicas ante la tecnología del frío y coadyuvantes. *Fruticultura profesional*, 26: 97-101.
- DE WILD, H.P.J., WOLTERING, E.J., PEPPELENBOS, H.W. 1999. Carbon dioxide and 1-MCP inhibit ethylene production and respiration of pear fruit by different mechanisms. *Journal of Experimental botany*, 50: 837-844.
- DE WILD, HPJ., PEPPELENBOS, HW. 2001. Improving the measurement of gas exchange in closed systems. *Postharvest Biology and Technology*, 22: 11-119.
- DEL RÍO, L.A., SANDALIO, L.M., PALMA, J.M. 1990. A new cellular function for peroxisomes related to oxygen free radicals? *Experientia*, 46: 989-992.
- DELHOM, M.J. 1982. La conservación frigorífica de las peras. *Publicaciones Agrarias*, 14/86 HD, 3-24.
- DHINSA, R., DINDSA, P., THORPE, R. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32: 93-101.
- DILLEY, D.R. 2000. Physiological disorders of apples: cause and control. *Proceedings of 4<sup>th</sup> International Conference on Postharvest. Jerusalem, Abstract*, pp. 28.
- DIXON, B., SAGAR, G.R., SHORROCKS, V.M. 1993. Effect of calcium and boron on the incidence of tree and storage pit in apples of the cultivar Egremont Russet. *Journal of Horticultural Science*, 48: 403-411.
- ECCHER ZERBINI, P., RIZZOLO, A., BRAMBILLA, A., CAMBIAGHI, P. 2002. Loss of ascorbic acid during storage of Conference pears in relation to the appearance of brown heart. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 1007-1013.
- FOYER, C, HALLIWELL, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21-25.

- FOYER, C. 1993. Ascorbic acid. In: *Antioxidants in higher plants*. Alscher RG, Hess JL, Ed. CRC Press: Boca Raton., pp. 31-58.
- FOYER, C., LÓPEZ-DELGADO, H., DAT, J., SCOTT, I. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100: 241-254.
- FRANK, L. 1985. Oxygen toxicity in eukaryotes. In: *Superoxide Dismutase (Oberley L.W., ed. )*, vol III, pp 1-14, CRS Press Inc. Boca Raton. Florida.
- FRENKEL, C. 1978. Role of hydroperoxides in the onset of the senescence process in plant tissue. In: *H.O. Hultin and M. Milner (eds). Postharvest Biology and Technology, Food and Nutrition Press, Westport. CT.* pp. 443-448.
- FRENKEL, C., PATTERSON, ME. 1973. Effects of CO<sub>2</sub> on ultrastructure of Barlett pears. *HortScience*, 9: 338-340.
- GANAU, D., RECASENS, I., GRAELL, J. 1999. Influencia de la fecha de recolección en la descomposición interna (*Senescent breakdown*) de peras Blanquilla durante su frigoconservación. *Actas de Horticultura, nº 27(4): 280-286*.
- GARCÍA DE OTAZO, J. 1986. Tratamientos de post-cosecha de frutos de pepita. *Fruticultura profesional*, 26: 84-93.
- GARCÍA DE OTAZO, J. 1996. Las mermas de post-cosecha de peras y manzanas. Soluciones avanzadas. *Fruticultura profesional*, 82: 36-37.
- GHERGHI, A., BURZO, I., MILLIM, K., PANAIT, E. 1980. Factors influencing physiological diseases of apples and pears during storage. *Bulletin de l'Académie des Sciences Agricoles et Forestières*, 10: 109-119.
- GOUPY, P., AMIOT, M.J, RICHARD-FORGET, F., DUPRAT, F., AUBERT, S., NICOLAS, J. 1995. Enzymatic browning of model solutions and apple phenolic extracts by apple phenoloxidase. *Journal of Food Science*, 60: 497-505.
- GRAELL, J. 1995. Conservació frigorífica de la fruita. *Catalunya Rural i Agrària*, 8: 8-10.
- HALL, E., SCOTT, J. 1977. *Storage and market diseases of fruit*. CSIRO, Food Research Laboratory, North Ryde, NSW, Australian.
- HALLIWELL, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemical Physics*, 44: 327-340.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. 1989. *Free radical in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, U.K.
- HERRERO, A. 1982. *Enfermedades y fisiopatías de peras y manzanas en conservación frigorífica*. Ed. Dilagro. Lleida.
- HERRERO, A. 1987. Fisiopatías en peras y manzanas. *Frut*, 5: 17.
- HERRERO, A., GUARDIA, J. 1992. *Conservación de frutos. Manual Técnico*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- HERRERO, A. 1995. *La innovació tecnològica en la conservació de fruits*. (Sense editar).
- HILDEBRAND, D.F. 1988. Lipxygenases. *Physiologia Plantarum*, 76: 249-253.



- HULME, AC. 1956. Carbon dioxide injury and the presence of succinic acid in apples. *Nature*, 178: 218-219.
- HUTCHENSON, S.W., BUCHAMAN, B.B. 1980. Polyphenol oxidation by *Ficia faba* chloroplast membranes. *Plant Physiology*, 66: 1150-1154.
- IGLESIAS, I. 1998. Fruticultura. Situación y evolución de las producciones y de las técnicas de producción de la U.E. *Fruticultura profesional*, 94: 7-21.
- JAHNKE, L., HULL, M., LONG, S. 1991. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in Zea mays and Zea diploperrenis. *Plant Cell Environment*, 14: 97-104.
- JONES, R.P. 1989. Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme Microbiology and Technology*, 11: 130-153.
- KADER, A.A. 1986. Biochemical and physiological bases for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology*, 40: 99-104.
- KADER, A.A. 1992. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Ed. University of California.
- KAYS, S.J. 1999. Preharvest factors affecting appearance. *Postharvest Biology and Technology* 15: 233-247.
- KE, D., VAN GORSEL, H., KADER, A.A. 1990. Physiological and quality responses of "Barlett" pears to reduced O<sub>2</sub> and enhanced CO<sub>3</sub> levels and storage temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115: 435-439.
- KE, D., RODRÍGUEZ-SINOBAS, L. 1991. Physiology and prediction of fruit tolerance to low-CO<sub>2</sub> atmospheres. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116: 253-260.
- KE, D., YAHIA, E., MATEOS, M., KADER, A.A. 1994. Ethanol fermentation of "Barlett" pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119: 976-982.
- KNEE, M. 1980. Physiological responses of apple fruits to oxygen concentrations. *Annual Applied Biology*, 96: 243-253.
- LACAN, D., BACCOU, J. 1998. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits. *Planta*, 204: 377-382.
- LANGE, D., KADER, A.A. 1997. Elevated carbon dioxide exposure alters intracellular pH and energy charge in avocado fruit tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122: 253-257.
- LARA, I., VENDRELL, M. 2000. Effects of chilling on the accumulation of ACC oxidase and ACC synthase proteins in "Granny Smith" apple fruits. *Proceedings of 4<sup>th</sup> International Conference on Postharvest. Jerusalem, Abstract*, pp. 57.
- LARRIGAUDIÈRE, C., LENTHERIC, I., VENDRELL, M. 1998. Relationship between enzymatic browning and internal disorders in controlled-atmosphere stored pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78: 232-236.
- LARRIGAUDIÈRE, C., LENTHERIC, I., PINTÓ, E. 2000. Efecto de tratamientos con altos niveles de CO<sub>2</sub> sobre el metabolismo oxidativo y su incidencia en la prevención de fisiopatías en peras Conference. *Post-recolección de Frutos y Hortalizas. V Simposio Nacional y II Ibérico*. Tenerife. pp. 195-199.
- LAW, M., CHARLES, S., HALLIWELL, B. 1983. Superoxide production by microsomal membranes from senescing carnation flowers: an effect on membrane fluidity. *Phytochemistry*, 22: 1375-1380.

- LEHNINGER, A. 1987. *Principios de Bioquímica*. Ed. Omega, S.A. Barcelona.
- LENTHERIC, I., PINTÓ, E., LARRIGAUDIÈRE, C. 1997. Effect of N<sub>2</sub> fertilization on storage quality and Brown heart incidence in Conference pears. COST 97. MADRID. pp. 77
- LENTHERIC, I., PINTÓ, E., VENDRELL, M., LARRIGAUDIÈRE, C. 1999. Harvest date affects the antioxidative systems in pear fruits. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74(6): 791-795.
- LENTHERIC, I., PINTÓ, E., GRAELL, J., LARRIGAUDIÈRE, C. 2003. Effects of CO<sub>2</sub> pretreatment on oxidative metabolism and core-browning incidence in controlled atmosphere stored pears. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78(2):177-181.
- LIDSTER, P., BLANPIED, G., PRANGE, R. 1990. Controlled-atmosphere disorders of commercial fruits and vegetables. Agricultural Canadian Publication. 1947/E, *Communications Branch, Agriculture*, Canada, Ottawa.
- LIEBERMAN, M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Annual Review of Plant Physiology*, 30: 533-589.
- LITCHENTHALER, H. 1996. An introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148: 4-14.
- LIN, LS., VARNER, JE. 1991. Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiology*, 96: 159-165.
- LOEWUS, F. 1980. L-Ascorbic acid: metabolism, biosynthesis, function. In Stumpf pK and Conn EE. Eds. *Biochemistry of plants, carbohydrates, structure and function*, vol 3. Ed. J. Preiss. New York: Academic Press, 77-79.
- LOEWUS, F. 1988. Ascorbic acid and its metabolic products, in *The Biochemistry of Plants*, Ed by Priess J, Academic Press, New York, pp 18-45.
- LOURY, M. 1972. Les antioxygènes: structure, mécanisme d'action, application aux corps gras. *Revue Française des Corps Gras*, 19: 423-245.
- LUTON, M., HOLLAND, A. 1986. The effects of preharvest factors on the quality of stored Conference pears. I. Effects of orchard factors. *Journal of Horticultural Science*, 61: 23-32.
- MAPA, 2000. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Anuario de Estadística Agraria.
- MARCUS, L., PRUSKY, D., JACKOBY, B. 1988. Purification and characterization of avocado lipoxygenase. *Phytochemistry*, 27: 323-327.
- MARLOW, G.C., LESCHER, W.H. 1984. Watercore. *Horticultural Reviews*, 6: 489-521.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2<sup>a</sup> Edición. Ed. Academic Press. London.
- MATEOS, M., KE, D., CANTWELL, M., KADER, A.A., 1993. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to CO<sub>2</sub> enriched atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 3: 225-233.
- MATHEW, A.G., PARPIA, H.A. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research*, 19: 75-145.
- MAYAK, S., LEGGE, R., THOMPSON, J. 1983. Superoxide production by microsomal membranes from senescing carnation flowers: an effect on membrane fluidity. *Phytochemistry*, 22: 1375-1380.
- MAYER, A.M., HAREL, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215.

- MAYER, A.M. 1987. Polyphenol oxidases in plants Recent progress. *Phytochemistry*, 26: 11-20.
- MITCHAM, E.J., CRISOSTO, C.H., KADER, A.A. 1995. Recommendations for maintaining postharvest quality of "Gala", "Fuji" and "Granny Smith" apples. *Apple Postharvest Workshop*, March 1995, University of California, Davis and The California Apple Commission.
- MONNING, A. 1983. Studies on the reaction of Krebs cycle enzymes from apple tissue (Cv. Cox orange) to increased levels of CO<sub>2</sub>. *Acta Horticulturae*, 138: 113-119.
- MURATA, M., TSURUTANI, M., TOMITA, M., HOMMA, S., KANEKO, K. 1995. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5): 1115-1121.
- MURGA, J., PALAZÓN, I. 1984. *Manual de inspección de peras y manzanas*. Ed. Cámara Oficial de Comercio e Industria de Zaragoza. S.O.I.V.R.E.
- NANOS, G., ROMANI, R.J., KADER, A.A. 1992. Metabolic and other responses of "Barlet" pear fruit and suspension-cultured "Passe-crassane" pear fruit cells held in 0.25% O<sub>2</sub>. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117: 934-940.
- NANOS, G., KADER, A.A. 1993. Low O<sub>2</sub> induced changes in pH and energy charge in pear fruit tissue. *Postharvest Biology and Technology*, 3: 285-291.
- NARDIN, C. 1990. Nuevas orientaciones en el empleo de la atmósfera controlada en la conservación de manzanas. *Jornadas Técnicas de Frigoconservación y Comercialización de la Fruta Dulce*. Ed. Fundación Caja de Pensiones de Barcelona.
- NICOLAS, J.J., RICHARD-FORGET, F.C., GOUPY, P.M., AMIOT, M.J., AUBERT S.Y. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34: 109-157.
- NOCTOR, G., FOYER, C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- PALAZÓN, I. 1984. *Estudio de los problemas patológicos de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza*. Ed. Diputación Provincial de Zaragoza. Institución Fernando El Católico, Publi. 990, pp 147.
- PALIYATH, G., DROILLARD, M.J. 1992. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiology*, 30(6): 789-812.
- PAULL, R.E. 1999. Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. *Postharvest Biology and Technology*, 15: 263-277.
- PAULS, K., THOMSON, J. 1984. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiology*, 75: 1152-1157.
- PEPPELENBOS, H.W. 1996. *The use of gas exchange characteristics to optimise CA storage and MA packaging of fruits and vegetables*. Wageningen, ATO-DLO. pp. 157.
- PEPPELENBOS, H.W., OÖSTERHAVEN, J. 1998. A theoretical approach on the role of fermentation in harvested plant products. *Acta Horticulturae*, 464: 381-386.
- PESIS, E., LEVI, A., BEN ARIE, R. 1988. Role of acetaldehyde in the removal of astringency from persimmon fruits under various modified atmospheres. *Journal of Food Science*, 53: 153-156.
- PERATA, P., ALPI, A. 1991. Ethanol-induced to carrot cells. The role of acetaldehyde. *Plant Physiology*, 95: 748-752.

- PERATA, P., ALPI, A. 1993. Plant responses to anaerobiosis. *Plant Science*, 93: 1-17.
- PFISTER-SIEBER, M., BRÄNDLER, R. 1994. Aspects of plant behaviour under anoxia and post-anoxia. *Proceedings of the Royal Society Edimburg*. 102B: 313-324.
- PFISTER-SIEBER, M., BRÄNDLER, R. 1995. Response of potato tubers to hypoxia followed by reaeration. *Potato Research*, 38: 231-239.
- PIERSON, C.F., CEPONIS, M.J., CULLOCH, L.P. 1971. *Market diseases of apples, pears and quince*. U.S. Department Agriculture Handbook.
- PLICH, H. 1987. The rate of ethylene production and ACC concentration in apples cv. Spartan stored in low O<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub> concentrations in a controlled atmosphere. *Fruit Science Reports*, 14: 45-56.
- PORRIT, S.W., MEHERIUK, M., LINDSTER, P.D. 1982. Postharvest disorders of apples and pears. *Agricultural Canadian Publication*, nº 1737.
- PRASSAD, T., ANDERSON, M., STEWART, C. 1994. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiology*, 105: 619-625.
- RABINOWITCH, H.D., FRIDOVICH, I. 1985. Growth of *Chlorella sorokiniana* in the presence of sulfite elevates cell content of superoxide dismutase and impart resistance towards paraquat. *Planta*, 164: 524-528.
- RAJAPAKSE, NC., BANKS, NH., HEWETT, EW., CLELAND DJ. 1990. Development of O<sub>2</sub> concentration gradients in flesh tissues of bulky plant organs. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115: 793-797.
- RAWYLER, A., PAVELIC, D., GIANINAZZI, C., OBERSON, J., BRAENDLE, R. 1999. Membrane lipid integrity relies on a threshold of ATP production rate in potato cell cultures submitted to anoxia. *Plant Physiology*, 120: 293-300.
- RECASENS, I. 1986. Química del crecimiento, desarrollo y maduración del fruto. *Curso de frigoconservación de manzanas y peras*. Col·legi Oficial d'Enginyers Agrònoms de Catalunya.
- RECASENS, I. 1997. Atmósferas controladas – ULO en poscosecha de frutas. *Fruticultura profesional*, 90: 41-45.
- RECASENS, I., GANAU, D., GRAELL, J., LARRIGAUDIÈRE, C., LÓPEZ, L. 1997. Physiological and quality responses of Conference pears to reduced levels of O<sub>2</sub> under controlled atmosphere storage conditions. *Postharvest Horticultural Series of University of California, Davis*, 16: 258-263.
- RECASENS, I. 2000. Alteraciones fisiológicas de la fruta durante la poscosecha. *Post-recolección de Frutos y Hortalizas. V Simposio Nacional y II Ibérico*. Tenerife. pp. 165-174.
- ROGIERS, S., MOHAN KUMAR, G., KNOLES, R. 1998. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt, are accompanied by increasing oxidative stress. *Annals of Botany*, 81: 203-211.
- ROELOFS, F., DE JAGER, A. 1997. Reduction on brownheart in Conference pears. *Proceedings 7<sup>th</sup> International Controlled Atmosphere Research Conference*, Davis, July 13-18, *Apples and pears* vol 2, 138-144.
- SABATER, F. 1990. Radicales libres y especies afines. *Sociedad Española de Fisiología Vegetal*. Boletín 14: 3-13.

- SALIN, M.L. 1988. Toxic species and protective systems of the chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 72: 681-689.
- SAN FILIPPO, J., ROMANO, L., CHERN, C., VALENTINE, J. 1976. Cleavage of esters by superoxide. *Journal of Organic Chemistry*, 41: 586-588.
- SAQUET, A., STREIF, J., BANGERTH, F. 2000. Changes in ATP, ADP and pyridine nucleotide levels related to the incidence of physiological disorders in "Conference" pears and "Jonagold" apples during controlled atmosphere storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 243-249.
- SANDALIO, L.M., FERNÁNDEZ, V.M., RUPÉREZ, F.L., DEL RÍO, L.A. 1988. Superoxide free radicals are produced in glycosomes. *Plant Physiology*, 87: 1-4.
- SANDALIO, L.M., del RÍO, L.A. 1991. Especies de oxígeno activado en situaciones de estrés en plantas. *Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Boletín* N° 15, 3-10.
- SCANDALIOS, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101: 7-12.
- SCANDALIOS, J.G. 1997. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Ed. CSHL Press. New York.
- SCHÖNER, S., KRAUSE, H. 1990. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta*, 180: 383-389.
- SCOTT, K.J., WILLIS, R.B.H. 1974. Reduction of brown heart in pears by absorption of ethylene from storage atmosphere. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 14: 266-268.
- SMIRNOFF, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78: 661-669.
- SMITH, J.J., VERVERIDES, P., JOHN, P. 1992. Characterization of the ethylene-forming enzyme partially purified from melon. *Phytochemistry*, 31: 1485-1494.
- SMOCK, R. 1979. Controlled atmosphere storage of fruits. *Horticultural Reviews* 1: 301-336.
- SNOWDON, A.L. 1990. *A colour atlas of Postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol 1, Ed. Wolfe Scientific. London.
- STREIF, J. 1999. Gas-Diffusionsmessungen an Früchten (Abstract). In: Zertörungsfreie Qualitätsanalyse, 34. Vortragstagung der DGQ, Freising-Weihenstephan.
- STREIF, J., XUAN, H., SAQUET, A.A. 2001. Ca-storage related disorders in "Conference" pears. *Acta Horticulturae*, 553 (2): 635-637.
- SUNG, J.M. 1996. Lipid peroxidation and peroxida-scavenging in soybean seeds during aging. *Physiologia Plantarum*, 97: 85-89.
- TAKEDA, T., ISHIKAWA, T., SHIGEOKA, S. 1997. Metabolism of hydrogen peroxide by the scavenging system in *Chlamydomonas reibardtii*. *Physiologia Plantarum*, 99: 49-55.
- TAULAVUORI, E., TAULAVUORI, K., LAINE, K., PAKONEN, T., SAARI, E. 1997. Winter hardening and glutathione status in the bilberry (*Vaccinium myrtillus*) in response to trace gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) and nitrogen fertilization. *Physiologia Plantarum*, 101: 192-198.
- THEVENOT, R. 1979. *A history of refrigeration throughout the world*. Intl. Inst. Refrig. París, France. pp. 203-216.

- TIBURCIO, A.F., CAMPOS, J.L., FIGUERAS, X., BESFORD, R.T. 1993. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth regulation*, 12: 331-340.
- TODD, J., PALIYATH, G., THOMPSON, J. 1990. Characteristics of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiology*, 94: 1225-1232.
- VELTMAN, R., VAN SCHAİK, A. 1997. Membrane damage in fruits, perhaps the explanation of hollow core and flesh browning. *Fruittelt*, 87 (21): 12-13.
- VELTMAN, R., PEPPELENBOS, H. 1998. Healthy Conference pears in CA storage thanks to vitamin C. *Fruittelt*, 88 (29): 14-15.
- VELTMAN, R., LARRIGAUDIÈRE, C., WICHERS, J., VAN SCHAİK, A., VAN DER PLAS, W., OOSTERHAVEN, J. 1999a. PPO activity and polyphenol content are not limiting factors during brown core development in pears. *Journal of Plant Physiology*, 154: 697-702.
- VELTMAN, R., SANDERS, M.G., PERSIJN, S.T., PEPPELENBOS, H.W., OOSTERHAVEN, J. 1999b. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. Cv. Conference). *Physiologia Plantarum*, 107: 39-45.
- VELTMAN, R. 2002. *Doctoral thesis. On the origin of internal browning in pears (Pyrus communis L. cv Conference)*. Wageningen Universiteit.
- VELTMAN, R., LENTHÉRIC, I., VAN DER PLAS, L.H.W., PEPPELENBOS, H.W. 2002. Internal browning in *Pyrus communis* fruits is caused by a combined effect of oxygen free radicals and a limited energy availability. *Postharvest Biology and Technology*, (en premsa)
- VILAPLANA, R. 2002. Efectes de la fertilització foliar amb bor sobre la qualitat i incidència de fisiopaties en pera Conference. Projecte Final de Carrera. ETSEA de Lleida.
- VOLZ, R., BIASI, W., MITCHAM, E. 1998. Fermentative volatile production in relation to carbon dioxide-induced flesh browning in "Fuji" apple. *Hortscience*, 33: 1231-1234.
- WALKER, M., MCKERSIE, B. 1993. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in the chilling resistance of tomato. *Journal of Plant Physiology*, 141: 234-239.
- WATKINGS, C.B. 2000. Pre-harvest effects on post-harvest behaviour. *Proceedings of 4<sup>th</sup> International Conference on Postharvest*. Jerusalem, Abstract, pp. 13.
- WEIS, W. 1975. Ascorbic acid and electron transport. *Ann NY Acad Sc*, 258: 190-200.
- WHITAKER, J.R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. 2<sup>nd</sup> Edition. Ed. Marcel Dekker cop. USA.
- WILLIAMS, M.W., PATTERSON, M.E. 1962. Internal atmospheres in Bartlett pears stored in controlled atmospheres. *American Society for Horticultural Science*, 40: 129-136.
- WILLIAMS, M.W., PATTERSON, M.E. 1964. Non-volatile organic acids and core breakdown of Bartlett pears. *Agricultural and Food Chemistry*, 12: 80-83.
- WOLTERING, E.J., VAN SCHAİK, A.C.R., JONGEN, W.M.F. 1994. CA storage effect on the volatile flavour components of apples. *Proceedings of the Fifth International Controlled Atmosphere Research Conference*, Washington. Vol 1, 341-352.
- XUAN, H. 2001. Can boron prevent "Conference" pears from Brown heart injury during CA storage? *International Controlled Atmosphere Research Conference*. Rotterdam, The Netherlands. Abstract code P-02-02.

XUAN, H., STREIF, J., BANGERTH, F. 2001. Effect of boron applications on physiological disorders in Conference pears during CA-storage. *Acta Horticulturae*, 553: 249-253.

YAMAKI, S. 1984. Isolation of vacuoles from immature apple fruit flesh and compartmentation of sugars, organic acids, phenolic compounds and amino acids. *Plant and Cell Physiology*, 25: 151-166.







