

(043) 1998 SOR

1600196780X



24 JUL. 1998

E: 3606 S:



Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de Lleida

EL ESCALDADO SUPERFICIAL EN MANZANA GRANNY SMITH. FISILOGIA DE LA ALTERACIÓN Y ESTUDIO DE MÉTODOS DE CONTROL ALTERNATIVOS A LA DIFENILAMINA.

LA DIRECTORA

[Signature]

LA AUTORA

[Signature]



Tesis Doctoral
Yolanda Soria Villalonga
Julio 1998

Universitat de Lleida

1805-4936

0147-41860

**CARBON DIOXIDE, OXYGEN, AND ETHYLENE CHANGES IN RELATION
TO THE DEVELOPMENT OF SCALD IN GRANNY SMITH APPLES
AFTER COLD STORAGE**

A.D. BAUCHOT⁽¹⁾, P. JOHN⁽¹⁾, Y. SORIA⁽²⁾, I. RECASENS⁽²⁾

(1) Department of Agricultural Botany, Plant Sciences Laboratories, University of Reading,
P.O. Box 221, Reading, RG6 2AS, U.K.

(2) Area de Postcollita. CeRTA. Centro UdL-IRTA. Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure,
177, 25198 Lleida, España.

Publicado en:

Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 43, N° 12, 1995

Carbon Dioxide, Oxygen, and Ethylene Changes in Relation to the Development of Scald in Granny Smith Apples after Cold Storage

Anne D. Bauchot,^{†,‡} Philip John,^{*,†} Yolanda Soria,^{||} and Immaculada Recasens^{||}

Department of Agricultural Botany, Plant Science Laboratories, The University of Reading, Reading RG6 2AS, United Kingdom, and Area de Post-Collita, Universitat de Lleida, Institut de Recerca i Tecnologia, Agroalimentàries, Alcalde Rovira Roure 117, 25006 Llérida, Spain

To control the development of scald during storage at 0 to 1 °C, Granny Smith apples (*Malus domestica*) were treated with diphenylamine (DPA) or the sucrose ester-based coating Semperfresh, either alone or formulated with the food-approved antioxidant ascorbyl palmitate. Scald control by DPA was not associated with alterations in the internal atmosphere of the apples. However, the alterations in the internal gas atmosphere brought about by the Semperfresh coatings were correlated with the partial scald control observed with ascorbyl palmitate plus Semperfresh after 4 months of storage. Under certain conditions, coating could have affected activity of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase in vivo via decreased internal oxygen levels, but not via changes in the carbon dioxide levels. It is concluded that the limited control of scald by ascorbyl palmitate plus Semperfresh is partially related to the observed modification of the internal atmosphere of the apple.

Keywords: *Malus domestica*; ascorbyl palmitate; diphenylamine (DPA); ethylene; carbon dioxide; oxygen; Semperfresh; superficial scald

INTRODUCTION

Some apple varieties, such as Granny Smith, are susceptible to the storage disorder superficial scald (Fidler et al., 1973), which appears to arise from the oxidation of a sesquiterpene (α -farnesene) to conjugated triene hydroperoxides (Huelin and Coggiola, 1970; Filmer and Meigh, 1971). Amine-type antioxidants, such as diphenylamine (DPA) and ethoxyquin, effectively reduce scald (Smock, 1957), but concern over residues is leading to a search for alternative measures.

Changing the atmosphere around the stored apples has been reported to control scald, with regimes of low oxygen and high carbon dioxide (Patterson and Workman, 1962) or low oxygen (Little and Taylor, 1981) advised. In some parts of the world, these techniques are applied commercially, but where they are not cost-effective, alternatives need to be found. Consequently, we have been examining the effectiveness of treating apples with edible coatings in combination with ascorbyl palmitate, a food-compatible antioxidant. The edible coating, marketed as Semperfresh, delays ripening by altering the permeability of the coated fruit so that internal oxygen levels decrease and carbon dioxide levels increase (Smith and Stow, 1984; Banks, 1985). Thus, our approach effectively combines an antioxidant with an alteration of the gaseous conditions of fruit during storage.

Elsewhere we report in detail on the effectiveness of the treatments used (Bauchot et al., 1995). In the present paper we describe the changes in the levels of carbon dioxide, oxygen, and ethylene that are associated with the development of scald in Granny Smith apples

that have undergone a variety of treatments designed to combat scald. Ethylene was included because the delay in ripening by storage in a controlled atmosphere and by the modified atmosphere created by coatings are partially due to alterations in ethylene production and action (Kader, 1986). Moreover, low ethylene (Little et al., 1985) or low oxygen and low ethylene (Lau, 1990) during storage have been shown to reduce scald development. More recently, Du and Bramlage (1994) have suggested that "ethylene has a fundamental role in changes associated with superficial scald development".

To understand further how the changes in carbon dioxide and oxygen might be controlling ethylene levels, we also examined the effect of carbon dioxide and oxygen on the enzyme in the apples that is responsible for the final step in the generation of ethylene, that is, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase. This enzyme uses oxygen as a substrate, and its activity is regulated by carbon dioxide levels both in vivo (Kao and Yang, 1982) and in vitro (Dong et al., 1992; Smith and John, 1993; Fernández-Maculet et al., 1993).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Material. Experiments reported here are part of a larger multisite trial (Bauchot et al., 1995). Internal atmosphere was measured on Granny Smith apples that were harvested in Moissac, France, on September 29, 1992 (~2 weeks prior to commercial harvest), treated after harvest, and then transported to Reading, U.K., and stored at 0–1 °C under normal atmosphere. Ethylene emission was measured on early-harvested Granny Smith apples from Llérida, Spain, that were treated after harvest and immediately stored in Llérida at 1(± 1) °C under normal atmosphere. The ACC oxidase was extracted from apples purchased in Reading.

Treatments. Replicates of 10 apples each were dipped after harvest in DPA at 2500 ppm, 1% Semperfresh, or ascorbyl palmitate at 1875 ppm in 1% Semperfresh. Active ingredients of Semperfresh are sucrose esters of fatty acids (E473) formulated with sodium carboxymethylcellulose and monoacyl- and diacylglycerols. Emulsions were prepared and supplied as concentrates by Surface Systems International, East Challow, U.K. Controls were not dipped.

* Author to whom correspondence should be addressed.

[†] Department of Agricultural Botany.

[‡] New address: HortResearch, 120 Mt Albert Road, Mt Albert, Auckland, New Zealand.

^{||} Area de Post-Collita.

Table 1. Effect of Different Postharvest Treatments on the Incidence of Scald and Internal Atmosphere of Granny Smith Apples Stored at 0–1 °C for 4 and 6 Months^a

treatment	scald score		internal atmosphere					
	day 1	day 10	CO ₂ (%)		O ₂ (%)		C ₂ H ₄ (ppm)	
			day 1	day 10	day 1	day 10	day 1	day 10
After 4 Months of Storage								
control	1.9 ^a	3.0 ^a	5.2 ^a	6.4 ^c	15.6 ^b	17.2 ^a	105 ^c	289 ^c
DPA	1.0 ^b	1.2 ^c	5.8 ^a	6.2 ^c	17.2 ^{ab}	16.1 ^b	140 ^c	272 ^c
Semperfresh	1.7 ^a	3.0 ^a	2.4 ^c	8.2 ^b	19.0 ^a	15.7 ^b	389 ^b	463 ^b
Semperfresh + ascorbyl palmitate	1.1 ^b	2.3 ^b	3.8 ^b	8.9 ^a	9.3 ^c	13.2 ^c	595 ^a	649 ^a
After 6 Months of Storage								
control	3.5 ^a	3.9 ^a	8.5 ^c	7.0 ^b	16.7 ^a	15.5 ^b	29 ^c	143 ^d
DPA	1.5 ^c	1.6 ^b	6.1 ^d	4.3 ^c	18.3 ^a	16.8 ^a	19 ^c	211 ^c
Semperfresh	2.9 ^{ab}	4.0 ^a	14.0 ^a	9.2 ^a	7.7 ^b	11.8 ^c	187 ^b	389 ^b
Semperfresh + ascorbyl palmitate	2.5 ^b	3.6 ^a	9.2 ^b	8.6 ^a	9.3 ^b	11.8 ^c	283 ^a	459 ^a

^a Measurements were made on removal from the cold store (day 1) and after 10 days of storage at room temperature. Mean separation within columns for the same length of storage by Duncan's new multiple range test, 5% level. Values followed by different letters are significantly different.

Scald Scoring. After 4 and 6 months of storage, three to five replicates of each treatment were removed at room temperature and scald development was estimated on days 1 and 10. Intensity of scald was visually estimated according to the percentage of scalded surface with a scale from 0 to 4, where 0 = none, 1 = slight (<10% of the surface area affected), 2 = moderate (10–25%), 3 = severe (25–50%), and 4 = very severe (>50%). Mean scores were calculated for the replicates. Statistical analyses were carried out with appropriate SAS packages by the GLM procedure.

Emission of Ethylene. Five apples of the same batch of Spanish apples were enclosed in a 3-L jar. After 1 h, 1 mL of atmosphere was withdrawn from the jar through a septum with a hypodermic syringe. The ethylene content of the samples was determined as previously described (Mitchell et al., 1988).

Internal Atmosphere. For measurements of the internal atmosphere, 10 fruits from each treatment group were plunged in water and two 0.5-mL samples of the internal atmosphere were withdrawn from the core through the calyx end with hypodermic syringes. Carbon dioxide and oxygen were measured with a Pye Unicam gas chromatograph (GC) fitted with a Poropak R column and a thermal conductivity detector (TCD). Concentrations of the gases were determined by reference to air for oxygen and to a volumetrically prepared standard for carbon dioxide in nitrogen.

Preparation of ACC Oxidase-Enriched Fractions. The methods used were based on procedures published for other varieties of apple (Fernández-Maculet and Yang, 1992; Kuai and Dilley, 1992; Dupille et al., 1993). Apple pulp (100 g) was homogenized in a blender with 100 mL of 0.1 M Tricine-HCl (pH 8.0) containing 10% glycerol, 3 mM DTT, 1% PVP, and 0.1% Triton X-100. After filtration through a double layer of muslin, the homogenate was centrifuged for 20 min at 20 000×g, and the supernatant was adjusted to 30% (NH₄)₂SO₄. After centrifugation, the supernatant was adjusted to 90% (NH₄)₂SO₄ and centrifuged again.

The resulting pellet was resuspended in 10 mL of buffer A (20 mM Tricine-HCl, pH 7.5; 10% glycerol; 3 mM DTT) containing 1 M (NH₄)₂SO₄ and loaded onto a 25-mL Phenyl-Sepharose CL-4B column (Pharmacia, Uppsala). Fractions of 5 mL were collected from the column that was eluted at 1 mL min⁻¹ with buffer A [50 mL adjusted to 1 M (NH₄)₂SO₄, then 50 mL at 0.5 M, 50 mL at 0.1 M, and eventually 90 mL at 0 M]. Activity of ACC oxidase was eluted with buffer A alone. The eight most active fractions were concentrated to 25 mL with Centricon 10 cartridges (Amicon, Beverly, MA) and desalted on PD-10 column (Sephadex G-25 M, Pharmacia) then, 5-mL fractions were loaded onto a 1-mL Mono-Q HR 5/5 column (Pharmacia) equilibrated with buffer A and eluted with a NaCl gradient at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Fractions containing ACC oxidase were pooled and desalted with a column of Sephadex G-25 M.

ACC Oxidase Activity Assays. Enzyme activity was assayed by measuring the ethylene produced (Mitchell et al.,

1988) after incubation of 200 μL of extract for 15 min at 30 °C in a 7-mL vial containing 800 μL of reaction mixture (0.1 M Tricine-HCl, pH 7.5; 10% glycerol; 3 mM DTT; 10 μM FeSO₄; 1 mM ACC; 20 mM NaHCO₃; and 20 mM sodium ascorbate). When the concentration of oxygen was varied, ascorbate was initially omitted from the reaction mixtures and the vials were flushed with nitrogen. One milliliter of the vial gas phase was replaced by a gaseous mixture containing varying proportions of oxygen and nitrogen. After 1 h of equilibration at room temperature, the enzyme extract and ascorbate were added. After the assay was completed, the concentrations of oxygen and carbon dioxide in the headspace were measured by GC-TCD. All determinations were replicated at least four times, and the results are expressed as means.

RESULTS AND DISCUSSION

Scald Incidence. After withdrawal from 4 months of storage, the untreated apples suffered from scald on an average of 10–25% of their surface (Table 1). After 10 days at room temperature, scald increased to affect an average of 25–50% of the apple surface. Treatment with DPA controlled scald so that it never affected >10% of the apple surface. The formulation of ascorbyl palmitate plus Semperfresh also provided a slight control over scald at the beginning of the shelf life (Table 1).

After a further 2 months of storage, there was a corresponding increase in the severity of scald both in control and coated apples. Again, however, DPA treatment provided an effective control (Table 1). Semperfresh alone did not provide any benefit, but ascorbyl palmitate plus Semperfresh showed a modest measure of control. This modest control was lost after the apples remained at room temperature for 10 days (Table 1). In general, these findings are consistent with those of Kerbel et al. (1989) who found that Semperfresh alone did not prevent scald, Kallay (1994) who found that Semperfresh–antioxidant combinations were effective with Granny Smith apples, and Manseka and Vasilakakis (1993) who found some scald control with ascorbic acid on Starking Delicious apples. The apples used in our experiments were harvested early to exacerbate scald development, and we have described elsewhere (Bauchot et al., 1995) how the Semperfresh–antioxidant combination was more effective when ripe fruit was used.

Internal Carbon Dioxide and Oxygen. There was no effect of DPA on the internal levels of carbon dioxide and oxygen after storage for either 4 or 6 months (Table 1). By contrast, coating the apples with Semperfresh

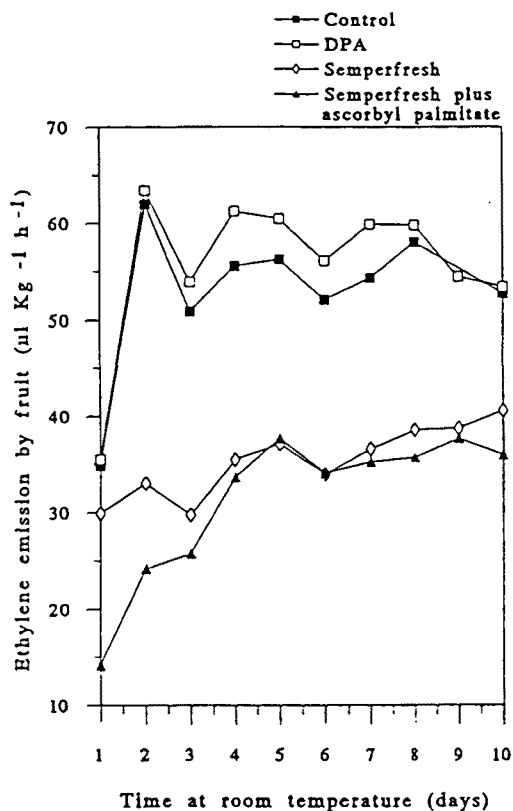


Figure 1. Ethylene emission by apples maintained at room temperature after 4 months of storage at 1 °C.

affected carbon dioxide and oxygen levels dramatically. Specifically, coating caused carbon dioxide levels to rise during the 10-day shelf life after 4 months of storage; but, this effect was not observed after 6 months of storage (Table 1). Moreover, the internal carbon dioxide levels were lower on withdrawal from 4 months of cold storage in coated apples compared with all the other treatments (Table 1).

Changes in the internal levels of oxygen were apparent with the ascorbyl palmitate plus Semperfresh after withdrawal from either 4 or 6 months of cold storage (Table 1). The relative stability of the oxygen levels during the shelf life of the coated apples after storage, in contrast to the accumulation of carbon dioxide that resulted from coating, suggests that the Semperfresh was more permeable to oxygen than to carbon dioxide with Granny Smith (see Banks, 1985).

Ethylene Accumulation and Emission. Compared with the untreated control, DPA treatment had only a slight effect on both the internal ethylene levels (Table 1) and on the rates of ethylene emission (Figures 1 and 2), despite the greater tissue damage suffered by the scalded control (Table 1). By contrast, coating with Semperfresh, either alone or with ascorbyl palmitate, raised the internal ethylene levels (Table 1) and depressed ethylene emission (Figures 1 and 2). The presence of ascorbyl palmitate plus Semperfresh increased the internal ethylene levels after 4 and 6 months of storage (Table 1) compared with Semperfresh alone, but otherwise ascorbyl palmitate plus Semperfresh had no effect the rate of ethylene emission (Figure 1). The surge in ethylene emission by the uncoated apples during the 10 days of shelf life (Figures 1 and 2) was matched by a dramatic increase in the internal ethylene levels in these uncoated apples during this period (Table 1). By contrast, the coated apples, having

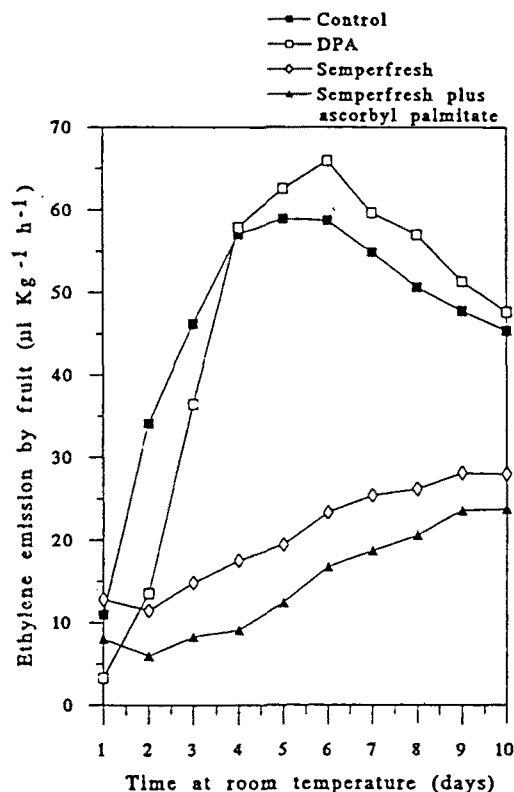


Figure 2. Ethylene emission by apples maintained at room temperature after 6 months of storage at 1 °C.

Table 2. Correlation Coefficients between the Concentrations of Internal Gases (O_2 , CO_2 , and C_2H_4) in the Apples and Scald Development^a

parameter	storage duration					
	4 months			6 months		
	O_2	CO_2	scald	O_2	CO_2	scald
C_2H_4	-0.92 ^b	0.98 ^b	0.83 ^b	-0.95 ^b	NS ^c	NS
O_2	-	-0.97 ^b	-0.97 ^b	-	NS	NS
CO_2	-	-	0.92	-	-	NS

^a All measured after 4 and 6 months of cold storage and a 10 day shelf life. Data from all treatments except DPA. ^b Significant at 0.01 level. ^c NS, Nonsignificant.

accumulated ethylene during cold storage (Table 1), had overall lower emission rates during the subsequent shelf life (Figures 1 and 2). These results are consistent with those of previous authors who had noted that sucrose ester-based coatings, such as Semperfresh, formed an effective barrier to ethylene diffusion from treated fruit (Kerbel and Kader, 1988; Kerbel et al., 1989).

Relationship between Internal Gases and Scald Incidence on Coated Apples. It is clear that the effectiveness of DPA is not related to changes in the internal atmosphere (Table 1). However, when ascorbyl palmitate plus Semperfresh delayed scald development during the early stage of shelf life after 4 months of storage, this treatment also induced a higher accumulation of ethylene and carbon dioxide and a lower accumulation of oxygen in the internal atmosphere of the apples compared with Semperfresh alone (Table 1). The correlations shown in Table 2 confirm that internal gas levels at day 10 are strongly correlated with scald development after 4 months of storage when the data obtained from DPA treatment are excluded. Thus, our results suggest that internal atmosphere may be related to scald development.

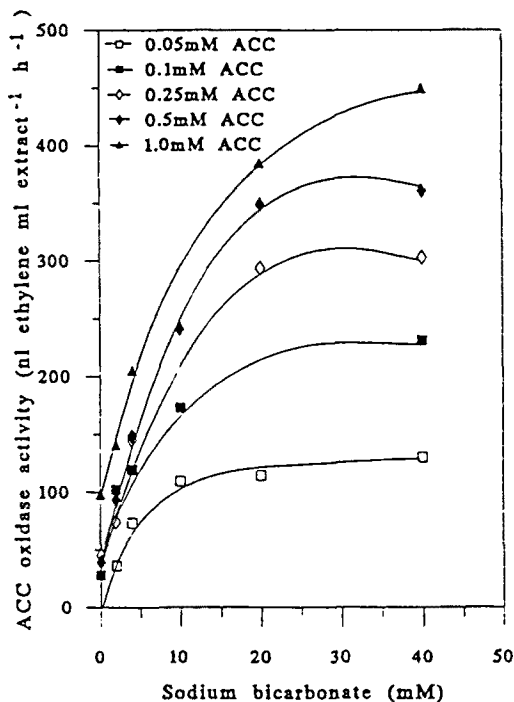


Figure 3. Effect of the concentration of sodium bicarbonate added to the reaction mixture on the activity of a partially purified ACC oxidase in the presence of different concentrations of ACC.

Effect of Carbon Dioxide and Oxygen on ACC Oxidase Activity. After 4 months of storage, ethylene levels are strongly correlated with oxygen and carbon dioxide levels (Table 2). Thus, it was appropriate to confirm whether ethylene synthesis could be affected directly by the internal levels of oxygen and carbon dioxide that had been measured.

When the ACC oxidase is assayed *in vitro* it is more convenient to supply defined levels of carbon dioxide in the form of graded concentrations of bicarbonate (Smith and John, 1993). The ACC oxidase from Granny Smith apples responded to increasing bicarbonate concentrations up to 10 to 20 mM added bicarbonate, depending on the ACC concentration (Figure 3). The ACC concentration at the site of the ACC oxidase *in situ* is unknown. The saturating value of 20 mM bicarbonate corresponded to a value of ~1.3% carbon dioxide measured in the headspace above the assay solution (Butler, 1982). Carbon dioxide levels in the apples studied here exceeded this value, varying from 2.5% to almost 14% (Table 1). Therefore, different carbon dioxide levels resulting from the different postharvest treatments applied probably did not act to regulate ACC oxidase activity *in vivo*, although the carbon dioxide may have inhibited ethylene action at these levels (Abeles et al., 1992).

The ACC oxidase activity from Granny Smith apples was half-saturated at ~7% oxygen when supplied with saturating carbon dioxide levels, but this value was lower when carbon dioxide was limiting (Figure 4). Thus, the range of internal oxygen concentrations measured (Table 1) after the different postharvest treatments (8–19%) could have affected *in vivo* ACC oxidase activity and thus ethylene synthesis. After 4 months of storage, the apples coated with ascorbyl palmitate plus Semperfresh, and, after 6 months of storage, all the coated apples, showed both lower internal oxygen levels (Table 1) and lower rates of ethylene emission (Figures 1 and 2) compared with the

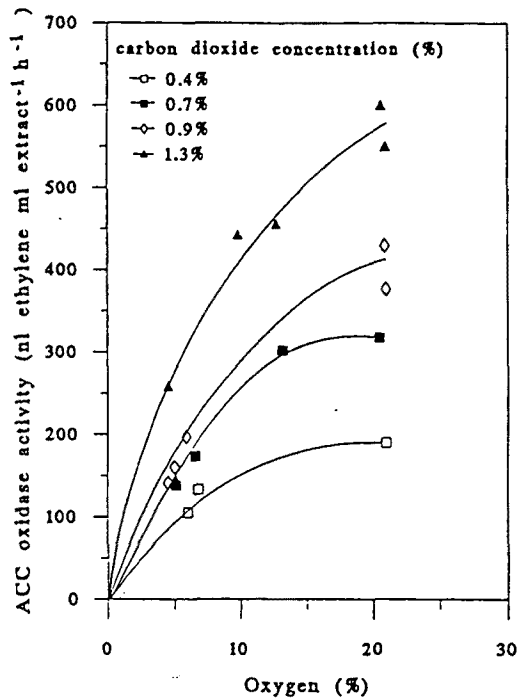


Figure 4. Effect of the oxygen concentration on the activity of a partially purified ACC oxidase in the presence of different concentrations of carbon dioxide. The carbon dioxide levels were varied by adding graded amounts of sodium bicarbonate to the reaction mixture. The actual concentrations of oxygen and carbon dioxide in the head space of the reaction vials were measured by GC-TCD at the end of the enzyme assay.

uncoated apples. However, we also note that after 4 months of storage, apples coated with Semperfresh alone had exceptionally high oxygen levels (Table 1) and low rates of ethylene emission (Figure 1). These were the conditions that gave the lowest carbon dioxide levels (Table 1), and if the carbon dioxide levels were even lower at the site of the ACC oxidase, they may have restricted its activity.

ABBREVIATIONS USED

ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; DPA, diphenylamine; GC, gas chromatography; TCD, thermoconductivity.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Godfrey Curtis and Surface Systems International for advice and assistance.

LITERATURE CITED

- Abeles, F. B.; Morgan, G. W.; Saltveit, M. E. Regulation of Ethylene Production by internal, environmental, and stress factors. in *Ethylene in Plant Biology*; Academic: New York, 1992; pp 56–119.
- Banks, N. H. Internal atmosphere modification in pro-long coated apples. *Acta Hort.* 1985, 157, 105–112.
- Bauchot, A. D.; John, P.; Soria, Y.; Recasens, I. Sucrose ester-based coatings formulated with food compatible antioxidants in the prevention of superficial scald in stored apples. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1995, 120, 491–496.
- Butler, J. N. The basic equations. In *Carbon Dioxide Equilibria and their Applications*; Addison-Wesley: Reading, MA, 1982; pp 15–43.
- Dong, J. G.; Fernández-Maculet, J. C.; Yang, S. F. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89, 9789–9793.

- Du, Z.; Bramlage, W. J. Roles of ethylene in the development of superficial scald in Cortland Apples. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1994, 119, 516–523.
- Dupille, E.; Rombaldi, C.; Lelièvre, J.-M.; Cleyet-Marel, J.-C.; Pech, J.-C.; Latché, A. Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruits. *Planta* 1993, 90, 65–70.
- Fernández-Maculet, J. C.; Yang, S. F. Extraction and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. *Plant Physiol.* 1992, 99, 751–754.
- Fernández-Maculet, J. C.; Dong, J. G.; Yang, S. F. Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 193, 1168–1173.
- Fidler, J. C.; Wilkinson, B. G.; Edney, K. L.; Sharples, R. O. Injuries to the skin of the fruit. In *The Biology of Apple and Pear Storage*; Fidler, J. C., Ed.; Commonwealth Agricultural Bureau: East Malling, U.K., 1973; Part 2, pp 67–75.
- Filmer, A. A. E.; Meigh, D. F. Natural skin coating of the apple and its influence on scald during storage: oxidation products of α -farnesene. *J. Sci. Food Agric.* 1971, 22, 188–190.
- Huelin, F. E.; Coggiola, I. M. Superficial Scald, a functional disorder of stored apples: VI. effect of applied α -farnesene, temperature and diphenylamine on the concentration and oxidation of α -farnesene in the fruit. *J. Sci. Food Agric.* 1970, 21, 584–589.
- Kader, A. A. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmosphere on fruits and vegetables. *Food Technol.* 1986, 40, 99–104.
- Kao, C. H.; Yang, S. F. Light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in leaves is mediated through carbon dioxide. *Planta* 1982, 155, 261–266.
- Kallay, T. New measures against superficial scald in apples. *Acta Hort.* 1994, 368, 220–224.
- Kerbel, E.; Kader, A. Comparison between “Semperfresh” and “Nutri-Save” coatings on Granny Smith apples. In *Perishable Handling, Postharvest Technology of Fresh Horticultural Crops*; Cooperative Extension, University of California: Davis, 1988; No. 63, pp 4–5.
- Kerbel, E. L.; Mitchell, F. G.; Kader, A. A.; Mayer, G. Effects of semperfresh coating on postharvest life, internal atmosphere modification and quality maintenance of Granny Smith apples. In *Proceedings of the Fifth International Controlled Atmosphere Research Conference*, June 14–16, 1989, Wenatchee, WA; Vol. 1.
- Kuai, J.; Dilley, D. R. Extraction, partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 1992, 1, 203–211.
- Lau, O. L. Efficacy of diphenylamine, ultra-low O₂, and ethylene scrubbing on scald control in Delicious apples. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1990, 115, 959–961.
- Little, C. R.; Taylor, H. J. Orchard locality and storage factors affecting the commercial quality of Australian Granny Smith apples. *J. Hortic. Sci.* 1981, 56, 323–329.
- Little, C. R.; Taylor, H. J.; McFarlane, F. Postharvest and storage factors affecting superficial scald and core flush of Granny Smith apples. *HortScience* 1985, 20, 1080–1082.
- Manseka, V. S.; Vasilakakis, M. Effect of storage maturity, postharvest treatments and storage conditions on superficial scald and quality of apples. *Acta Hort.* 1993, 326, 213–224.
- Mitchell, T.; Porter, A. J. R.; John, P. Authentic activity of the ethylene-forming enzyme observed in membranes obtained from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *New Phytol.* 1988, 106, 313–319.
- Patterson, M. E.; Workman, M. The influence of oxygen and carbon dioxide on the development of apple scald. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1962, 80, 130–136.
- Smith, J. J.; John, P. Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by bicarbonate/carbon dioxide. *Phytochemistry* 1993, 32, 1381–1386.
- Smith, S. M.; Stow, J. R. The Potential of a sucrose ester coating material for improving the storage and shelf-life qualities of Cox's Orange Pippin apples. *Ann. Appl. Biol.* 1994, 104, 383–391.
- Smock, R. M. A comparison of treatment for control of the apple scald disease. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1957, 69, 91–100.

Received for review March 27, 1995. Revised manuscript received August 8, 1995. Accepted September 11, 1995.* This work was supported by the EC ECLAIR Programme (AGREE 0015). A. D. Bauchot was supported by an EC Grant (B/AGRE-913016).

JF950173L

* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, November 1, 1995.

**EFFECTO DE LA FRIGOCONSERVACION EN ATMOSFERAS BAJAS EN
OXIGENO SOBRE EL METABOLISMO Y LA CALIDAD DE
MANZANAS GRANNY SMITH**

**THE EFFECT OF COLD STORAGE IN LOW OXYGEN CONTROLLED
ATMOSPHERES ON METABOLISM AND QUALITY IN
GRANNY SMITH APPLES**

Y. SORIA, I. RECASENS

Area de Postcollita. CeRTA. Centro UdL-IRTA. Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure,
177, 25198 Lleida, España.

Enviado a:

Food Science and Technology International

**EFFECTO DE LA FRIGOCONSERVACION EN ATMOSFERAS BAJAS EN
OXIGENO SOBRE EL METABOLISMO Y LA CALIDAD DE
MANZANAS GRANNY SMITH**

**THE EFFECT OF COLD STORAGE IN LOW OXYGEN CONTROLLED
ATMOSPHERES ON METABOLISM AND QUALITY IN
GRANNY SMITH APPLES**

Y. Soria, I. Recasens

Area de Postcollita. CeRTA. Centro UdL-IRTA. Universitat de Lleida.
Av. Rovira Roure, 177, 25198 Lérida. e-mail: recasens@lleida.irta.es

RESUMEN . Manzanas Granny Smith fueron cosechadas en Lleida en dos fechas distintas, con una semana de intervalo y conservadas inmediatamente después de la recolección a 0,5  C en aire o en distintas condiciones de atmósfera controlada (AC): atmósfera controlada estándar (AC estándar) con 3% O₂ y 3% CO₂, atmósfera baja en oxígeno (LO) con 2% O₂ y 2% CO₂, y atmósfera muy baja en oxígeno (ULO) con 1% O₂ y 1% CO₂. Después de 2, 4, 6 u 8 meses de frigoconservación, la producción de etileno y la respiración variaron en función de la fecha de cosecha y de las condiciones gaseosas de la cámara. El contenido de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilico (ACC) se acumuló en los frutos conservados en ULO y la actividad de la ACC oxidasa se vió inhibida en las cámaras con bajo nivel de oxígeno. La firmeza y la acidez descendieron durante el almacenamiento, aunque los frutos conservados en LO y ULO mantuvieron valores elevados al final del periodo de conservación. El contenido en sólidos solubles apenas varió y los valores más elevados también se detectaron en las condiciones LO y ULO. En la zona de Lleida, la frigoconservación de manzanas Granny Smith en atmósfera controlada con bajo nivel de oxígeno es recomendable desde un punto de vista cualitativo.

Palabras clave: Manzanas, Granny Smith, frigoconservación, atmósfera controlada, etileno, respiración, calidad.

SUMMARY. Granny Smith apples were harvested in Lleida (Spain) on two different dates, with a week's interval, and immediately after picking were stored at 0,5  C in air or in three different controlled atmosphere (CA) conditions: CA standard (3% O₂ / 3% CO₂), low oxygen (LO) (2% O₂ / 2% CO₂), and ultra low oxygen (ULO) (1% O₂ / 1% CO₂). After 2, 4, 6, or 8 month's cold storage, the ethylene production and respiration rate varied according to the date of harvest and storage conditions. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) content was built up in the fruit kept in ULO conditions and the ACC oxidase activity was inhibited in fruit kept in low-oxygen storage. Firmness and acidity decreased during storage, although the fruit kept in LO and ULO showed higher values of both parameters at the end of the storage period. Soluble solids content hardly varied and the highest values were also detected in LO and ULO conditions. We recommend low level oxygen CA storage, with a view to maintaining quality of Granny Smith apples in the Lleida area.

Keywords: Apple, Granny Smith, cold storage, controlled atmosphere, ethylene, respiration, quality.

INTRODUCCION

El almacenamiento en atmósfera controlada (AC) es una práctica que se utiliza habitualmente en manzanas para alargar su periodo de comercialización. Las condiciones idóneas que deben mantenerse en la cámara han sido y son objeto de estudio ya que afectan notablemente a la calidad de los frutos. En AC convencional o estándar la concentración de oxígeno se disminuye del 21%, su valor en el aire, hasta un 3-5%. El dióxido de carbono se aumenta del 0,03% al 3-5%. Sin embargo, el control automático de la atmósfera que se mantiene en la cámara y los equipos utilizados para reducir rápidamente la tasa de oxígeno y absorber el exceso de gas carbónico producido por los frutos, han permitido, a partir de los años 80, la introducción de la conservación en AC con bajos niveles de O_2 .

El efecto beneficioso de la AC se produce como resultado de la supresión de cambios fisiológicos en el fruto junto con la reducción de la tasa de respiración (Jobling y McGlasson, 1995). Numerosos trabajos han demostrado el efecto inhibitorio de la AC sobre la producción de etileno y sobre la respiración en manzanas. Burg y Thimann (1959) comprobaron que una atmósfera con un 3% de O_2 reduce la síntesis de etileno en un 50%. Lidster et al. (1983) observaron que la producción es aún menor en atmósferas con muy bajo oxígeno (1% de O_2), en comparación con la AC convencional (3% de O_2); un resultado similar se obtuvo en la respiración. Stow (1989) evaluó la respuesta de manzanas Cox's Orange Pippin en atmósferas con distintos niveles de O_2 , desde un 2% hasta un 0,5%, confirmando que la producción de etileno se reduce al bajar la concentración de O_2 . Igualmente, los tratamientos pre-conservación con muy bajo O_2 (0,25% o 0,02%) disminuyen la producción de etileno y la respiración, aunque pueden favorecer la aparición de olores desagradables de naturaleza alcohólica (Ke et al., 1991).

Los cambios en los procesos metabólicos que provoca la AC se manifiestan en una mejora de parámetros cualitativos del fruto. Dos de los efectos más característicos del almacenamiento en AC son la mejor retención de la firmeza y acidez, siendo ambos criterios muy utilizados para evaluar la calidad comercial en los productos frescos (Smith, 1995). Lidster et al. (1981) describen una mejora de la firmeza en un promedio de 0,86 kg en manzanas McIntosh almacenadas 29 semanas en 1,5/1,0 (CO_2/O_2) y también después de 7 días a 20 °C, frente a una atmósfera 5/2,8. Según Stow (1987) la firmeza en manzanas Jonagold es notablemente mayor con un 1,25% de O_2 que con un 2% después de 7 meses de almacenamiento, e incluso a los 9 meses se mantienen las diferencias entre ambas condiciones atmosféricas. En Golden Delicious el almacenaje a 0,5 % de O_2 resulta favorable para la firmeza, sin presentar efectos adversos (Lau, 1990) y en manzanas Delícius se obtienen resultados similares con un 0,7% de O_2 (Lau y Yastremski, 1993).

El mantenimiento de la acidez corre bastante paralelo a la retención de la firmeza en la mayoría de estudios. Goffings y Herregods (1994) han observado que cuanto menor sea la concentración de O_2 en la cámara, más lento es el descenso de la acidez y de la firmeza. Según estos autores un almacenamiento con un 0,7% o un 1% de O_2 asegura un descenso muy pequeño de la acidez durante los primeros 6 meses de conservación. Resultados similares obtuvo Lau (1985) para atmósferas entre 1,5% y 1% de O_2 . Además de los bajos niveles de O_2 , la presencia de CO_2 ayuda a mantener la acidez. Así, Skrzynski (1994) observó que la

acidez total es ligeramente mayor con una atmósfera 3/1,5 (CO_2/O_2) que con 0/1,3. En otros trabajos, para muy bajos niveles de O_2 , el nivel de CO_2 en la cámara no influye en el contenido de ácido málico después del almacenamiento (Chen et al., 1985; Drake et al., 1993).

A diferencia de la firmeza y de la acidez, el tipo de atmósfera controlada que se mantiene en la cámara no ejerce un efecto claro sobre el contenido de sólidos solubles (SS) de los frutos, que evoluciona de forma variable y oscilante durante la frigoconservación (Miret, 1992). Graell et al. (1997) en manzanas Topred no detectaron diferencias significativas entre frutos almacenados en diferentes concentraciones de O_2 (1%, 2% o 3%). Sfakiotakis et al. (1993) obtuvieron resultados semejantes con manzanas Starking Delicious. Un estrés inicial de O_2 tampoco afecta al contenido de SS (Ke et al., 1991). Un factor que puede afectar al contenido de SS es la fecha de recolección, aunque estudios con la variedad Jonagold han dado resultados contradictorios. En ocasiones el contenido de SS al final del almacenamiento depende del estado de madurez en el momento de la cosecha (Herregods y Goffings, 1993) mientras que en otros casos la fecha de cosecha no influye en dicho contenido (Girard y Lau, 1995).

De estos estudios se desprende que las condiciones que se mantienen en la cámara determinan la calidad final de la fruta. Las nuevas tecnologías de almacenamiento permiten la utilización de concentraciones muy bajas de O_2 , lo cual puede ser recomendable dependiendo del cultivar, estado de madurez y periodo de conservación, entre otros factores. La zona de cultivo también influye en la eficacia de la AC con bajo O_2 (Chen et al., 1985). El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de diferentes condiciones de conservación sobre manzanas Granny Smith cosechadas en Lleida con dos estados de madurez, a través de la evolución de parámetros fisiológicos y cualitativos.

MATERIAL Y METODOS

Material. Manzanas Granny Smith (*Malus domestica* Borkh.) fueron cosechadas en la provincia de Lleida con un intervalo de una semana. La primera cosecha se realizó el 10 octubre de 1993 (cosecha I), en estado todavía prematuro y la segunda el día 18 (cosecha II), dentro del periodo normal de recolección de esta variedad en dicha zona.

Tratamientos. Después de cada cosecha, los frutos se dividieron en lotes y se almacenaron a $0,5^\circ\text{C}$, en una cámara de atmósfera normal o en cámaras de atmósfera controlada con las siguientes concentraciones gaseosas: 3% O_2 / 3% CO_2 (AC estándar); 2% O_2 / 2% CO_2 (Low Oxygen o LO); 1% O_2 / 1% CO_2 (Ultra Low Oxygen o ULO). El estudio se realizó en cámaras experimentales, de 22 m^3 de capacidad. Las concentraciones deseadas de oxígeno se alcanzaban entre las 24 y 36 horas después del sellado de las cámaras mediante purga con nitrógeno. Las concentraciones de anhídrido carbónico se conseguían en 5 días mediante la respiración de los frutos e inyección de CO_2 en caso necesario, y se mantenían constantes mediante un equipo descarbonador de carbón activo. El control del O_2 y CO_2 a lo largo del almacenamiento se realizó con un analizador de gases paramagnético y un analizador de gases por infrarrojos, respectivamente.

Determinaciones analíticas. Los análisis se realizaron después de la cosecha y después de la frigoconservación. Se realizaron cuatro salidas de cámara (a los 2, 4, 6 y 8 meses de la cosecha). Para seguir la evolución de los parámetros fisiológicos y cualitativos, frutos

correspondientes a cada tratamiento se colocaban en una cámara climatizada en condiciones controladas de temperatura y humedad (20 °C y 80%, respectivamente) durante 10 días para simular el periodo de maduración del fruto durante la vida útil.

Medida de la producción de etileno y de la respiración. Se estimaron por la concentración gaseosa del espacio de cabeza de frascos ventilados que contenían los frutos. Para ello, se colocaban 5 manzanas en frascos de 10 l de capacidad, ventilados de forma continua por un flujo constante de aire húmedo y situados en la cámara climatizada. La concentración de etileno se determinó tomando de cada frasco muestras de 1 ml de gas e inyectándolas en un cromatógrafo de gases equipado con una columna de relleno con fase estacionaria de alúmina activada y un detector de ionización de llama. Los resultados se expresaron en microlitros de C_2H_4 por kilogramo de fruta y hora. La respiración de las muestras fue medida en función de la producción de CO_2 (Kidd y West, 1930). El CO_2 se analizó conectando la salida de aire de los frascos a un analizador de gases por infrarrojos. Los resultados se expresaron en miligramos de CO_2 por kilogramo de fruta y hora. Las determinaciones de CH_4 y CO se realizaron diariamente durante los 10 días siguientes a la cosecha o a cada salida de cámara. Se realizaron 2 repeticiones por tratamiento.

Análisis del contenido de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). La extracción del ACC se llevó a cabo a partir de pulpa liofilizada y congelada, siguiendo la técnica descrita por Apelbaum y Yang (1981). Para la cuantificación del ACC y su posterior valoración por cromatografía de gases, se siguió una adaptación del método de Lizada y Yang (1979), que se basa en la conversión del ACC en etileno con $NaOCl$ en presencia de Hg^{2+} . El análisis del contenido de ACC se realizó con frutos de la cosecha II, los días 1, 4 y 10 posteriores a la segunda salida de cámara. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Los resultados se expresaron en nmol de ACC por gramo de peso seco de pulpa.

Determinación de la actividad de la enzima ACC oxidasa. Se determinó la actividad de la ACC oxidasa en la pulpa de frutos correspondientes a la segunda cosecha, midiendo la conversión de ACC exógeno a etileno, según el método utilizado por Mansour et al. (1986). Para evitar la síntesis *de novo* de enzimas implicadas, debido al efecto de la herida en la pulpa o a la presencia de ACC exógeno (Yu y Yang, 1980), se esperaba 15 minutos antes de la incubación para permitir la salida del etileno interno. Las mediciones se realizaron en los días 1, 4 y 10 después de la cosecha o de la frigoconservación. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, expresándose los resultados en nmol de etileno por gramo de peso fresco de pulpa y hora.

Parámetros cualitativos. En frutos correspondientes a la segunda cosecha se determinó el peso, la firmeza, la acidez y el contenido en sólidos solubles. El peso se analizó con una balanza de 0,1 g de precisión y el resultado se expresó en gramos. La firmeza de la pulpa se midió mediante un penetrómetro, con pistón de 11 mm, en dos caras opuestas de la zona ecuatorial del fruto, una vez eliminada la piel. Los resultados se expresaron en libras. La acidez se determinó mediante la valoración de 10 ml de zumo de cada fruto con $NaOH$ 0,1N hasta el viraje de la fenoftaleína. El resultado se expresó en gramos de ácido málico por litro de zumo. El contenido de sólidos solubles en el zumo se midió con un refractómetro digital y se expresó en porcentaje (%). Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de la varianza para estudiar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos. Los datos corresponden a la media de 30 frutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de la fecha de cosecha y de las condiciones de conservación sobre la producción de etileno, el contenido de ACC y la actividad de la ACC oxidasa. Durante los 10 días siguientes a cada cosecha, no se detectó etileno y no hubo actividad de la enzima ACC oxidasa (Figura 1a), indicando que los frutos de las dos cosechas se encontraban en un estado preclimatérico en el momento de la recolección. Los frutos se mantuvieron en la cámara climatizada hasta la detección del máximo climatérico. En los frutos de la cosecha I, el etileno empezó a producirse a partir del día 15, alcanzándose un máximo de $28 \mu\text{l C}_2\text{H}_4 / \text{kg h}$ el día 19 después de la recolección. En la cosecha II, la producción se inició antes, concretamente el día 11, aunque al principio se detectaron niveles muy bajos (del orden de $3 \mu\text{l C}_2\text{H}_4 / \text{kg h}$), el máximo también fue inferior ($20 \mu\text{l C}_2\text{H}_4 / \text{kg h}$) y además se vió retrasado (día 24) respecto a la primera cosecha.

La fecha de recolección también afectó a la evolución de la curva de etileno después de la frigoconservación (Figura 2). Los frutos de la cosecha I mostraron un comportamiento climatérico normal, presentando un pico a los pocos días de la salida de la cámara frigorífica. En la cosecha II, la producción etilénica fue menor y solamente presentaron pico climatérico las manzanas conservadas en frío normal, mientras que en las atmósferas controladas la concentración de C_2H_4 aumentaba con la estancia a 20°C .

El almacenamiento en las atmósferas controladas redujo la producción de etileno respecto a la atmósfera normal (Figura 2). Este efecto fue especialmente notorio en la segunda cosecha, donde se observó además que la producción de etileno fue muy semejante con las tres condiciones ensayadas. Este resultado difiere con el de otros trabajos en los que la producción de etileno en las cámaras con bajo nivel de O_2 (1-2%) es sensiblemente menor que en la AC convencional (3% O_2) (Lidster et al., 1983; Stow, 1989). En las manzanas recolectadas con un estado de madurez más prematuro (cosecha I), el nivel de C_2H_4 detectado en atmósfera normal o controlada fue semejante, llegando a ser incluso mayor en los frutos almacenados en AC durante 6 u 8 meses. Esta pérdida de efecto de las condiciones atmosféricas también se observó en los frutos de la cosecha II después de 8 meses de conservación (Figura 2).

En los resultados obtenidos puede verse que el efecto de la frigoconservación y de las condiciones atmosféricas de la cámara está relacionado con la fecha de cosecha. Así, en la recolección precoz la estancia en frío provocó el inicio rápido de etileno, tanto en la atmósfera normal como en la controlada, confirmando los resultados de Larrigaudière y Vendrell (1993), según los cuales el frío induce un aumento de la producción de etileno en la variedad Granny Smith. Por contra, en la recolección más tardía el pico de etileno se retrasó (en atmósfera normal) o se vió inhibido (en AC).

El contenido de ACC fue semejante en la atmósfera normal y en la AC estándar, mientras que en la AC con muy bajo nivel de O_2 (ULO) se detectaron valores más elevados (Tabla 1). Fica (1991) también obtuvo los valores más elevados en la atmósfera con el menor nivel de O_2 , aunque no observó diferencias significativas entre las distintas condiciones de atmósfera controlada ensayadas. En el presente trabajo, la atmósfera ULO redujo la producción de etileno pero no disminuyó el contenido de ACC. Aunque las atmósferas con bajo nivel de O_2 reducen la biosíntesis de etileno al retrasar y suprimir la expresión de la enzima ACC sintetasa (Gorny

y Kader, 1996), las tensiones reducidas de O_2 tienden a estimular la acumulación de ACC (Levin et al., 1993). Probablemente esta acumulación se dé al quedar inhibida la conversión de ACC a etileno, a través de la enzima ACC oxidasa, paso que es enteramente dependiente de la concentración de O_2 .

El contenido de ACC también depende de la concentración de CO_2 en la cámara. El CO_2 inhibe la producción de etileno en los frutos climatéricos al inhibir la actividad de la ACC sintetasa (Bufler, 1984; Chavez-Franco y Kader, 1993; Mathooko et al., 1995), y retrasar, al igual que el bajo O_2 , la expresión de la enzima (Gorny y Kader, 1996). Sin embargo, el efecto del CO_2 en el contenido de ACC presenta controversia en la literatura. Según Cheverry et al. (1988) el alto CO_2 no afecta al nivel de ACC en Granny Smith, mientras para Chaves y Tomas (1984) provoca un incremento de ACC en esta misma variedad. Probablemente estos resultados contradictorios se deban a que el efecto del CO_2 en el contenido de ACC depende de varios factores como el estado de madurez, la temperatura, la combinación O_2 - CO_2 y el tiempo de exposición (Mathooko, 1996). Asimismo, el contenido de ACC detectado en la cámara de AC estándar (Tabla 1) pudo ser resultado de un equilibrio entre las concentraciones de O_2 y de CO_2 mantenidas en la cámara. Al efecto de la reducción del O_2 (al 3%), se unió el aumento de la concentración de CO_2 (al 3%), por encima de las otras cámaras. Estas condiciones provocaron un mayor descenso de la biosíntesis de ACC que las condiciones ULO, puesto que el contenido de ACC detectado era menor y la causa no pudo estar en la conversión de ACC a etileno, por ser la producción de etileno semejante en AC estándar y en ULO (Figura 2). En cambio, el menor contenido de ACC en los frutos conservados en aire sí puede explicarse por la conversión del aminoácido, gracias a la presencia de O_2 , ya que la producción de etileno en estos frutos fue mayor.

La salida a temperatura ambiente después de un periodo de frigoconservación provoca un incremento de la actividad de la ACC oxidasa en manzanas Granny Smith (Larrigaudière y Vendrell, 1993). En el presente trabajo la actividad de la ACC oxidasa también aumentó después de cada salida de cámara, viéndose influida por la duración de la estancia en frío y por las condiciones gaseosas de la cámara (Tabla 2). Los valores más elevados se detectaron en la última salida de cámara, después de 8 meses de frigoconservación. Gorny y Kader (1996) también observaron que la actividad de la ACC oxidasa incrementaba durante el almacenamiento, tanto en aire como en distintas condiciones de AC. Los frutos conservados en atmósfera normal y en AC estándar, presentaron una evolución similar: en los primeros meses de frigoconservación, la actividad de la enzima aumentaba paulatinamente al salir de la cámara, durante la estancia a 20 °C, mientras que a partir de los 4 meses la actividad se adelantaba, de manera que a los 6 y 8 meses de conservación, la máxima actividad se detectó inmediatamente después de la salida de la cámara. Sin embargo, la actividad de la ACC oxidasa fue menor en AC estándar que en aire, ya que el CO_2 inhibe la actividad de esta enzima en el tejido de manzana (Chaves y Tomas, 1984; Cheverry et al., 1988; Gorny y Kader, 1994). En los frutos conservados en LO y en ULO, la actividad de la ACC oxidasa se vió retrasada y además inhibida, como consecuencia de la reducción de la concentración del O_2 .

Efecto de la fecha de cosecha y de las condiciones de conservación sobre la respiración.

En el momento de la recolección, el nivel de CO_2 producido por la respiración de los frutos fue algo menor en la cosecha I que en la II (Figura 1b). La respiración aumentaba hasta alcanzar un máximo después de varios días a temperatura ambiente. En cambio, después de la frigoconservación, no se apreció un aumento climatérico, sino que la producción de CO_2 se

mantuvo prácticamente constante durante los 10 días siguientes a la salida de la cámara a 20 °C (Figura 3).

La conservación en las atmósferas controladas provocó una reducción de la respiración en los frutos de ambas cosechas. El nivel de O₂ de la cámara apenas afectó a la producción de CO₂, especialmente en las primeras salidas de cámara. Conforme se prolongaba el periodo de almacenamiento, la diferencia entre los tratamientos aumentaba, lo cual fue palpable a partir de los 6 meses de conservación en la cosecha I, y a los 8 meses en la cosecha II (Figura 3). Durante los últimos meses de conservación, la mayor producción de CO₂ se detectó en AC estándar, seguida de LO y de ULO, coincidiendo con los resultados de varios autores (Lidster et al., 1983; Gherghi et al., 1994) que observaron que los niveles muy bajos de O₂ en la cámara inhiben la respiración frente a la conservación en AC estándar.

Efecto de la fecha de cosecha y de las condiciones de conservación sobre los parámetros cualitativos. En la tabla 3 se presentan parámetros de calidad de frutos correspondientes a las cosechas I y II en el momento de la recolección. Se observa que en los frutos de la cosecha II el estado de madurez era algo más avanzado, ya que aunque la acidez era ligeramente mayor, el peso, la firmeza y el contenido de sólidos solubles eran más elevados que en la cosecha I.

El efecto beneficioso de la conservación en AC resulta de la inhibición del proceso de maduración, al inhibir la producción de etileno y de CO₂. Ello se traduce en una mejora a nivel cualitativo en el fruto. Asimismo, en manzanas *Granny Smith*, la conservación en AC provocó un notable aumento de la calidad, respecto a la conservación en atmósfera normal. En el peso no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, probablemente porque el tamaño homogéneo de los frutos influyó más que la pérdida de peso ocasionada por el tipo de atmósfera de conservación (Tabla 4). Los valores de acidez descendieron durante el almacenamiento, independientemente del tratamiento aplicado. Sin embargo, la conservación en AC retrasó la pérdida de acidez, sobre todo las condiciones ULO. Después de 4 meses de conservación, los frutos conservados en ULO presentaban un valor de acidez significativamente mayor que el del resto de las cámaras, y para estancias más prolongadas, la acidez también se retuvo mejor en estas condiciones (Tabla 4). Estos resultados se corresponden con los de la tasa de respiración, que fue menor en los frutos conservados en AC y especialmente en ULO (Figura 2). Ello indica que el ácido málico actúa de sustrato respiratorio durante el periodo de almacenamiento. Respecto a la pérdida de firmeza, ésta fue más pronunciada en la atmósfera normal que en la controlada, siendo el efecto de la reducción de O₂ evidente desde la primera salida de cámara. En frío normal, el valor de la firmeza después de 8 meses de conservación supuso un 70% del valor en el momento de la cosecha, mientras que en las atmósferas controladas se mantuvo durante 6 meses e incluso a los 8 meses se detectaron valores relativamente elevados. Los frutos conservados en LO (2% O₂) presentaron el valor de firmeza más alto al final de la conservación, perdiendo solamente un 6% de la firmeza inicial (Tablas 3 y 4). El contenido en sólidos solubles se mantuvo prácticamente constante a lo largo del almacenamiento en cada una de las cámaras. Después de 8 meses, los contenidos más elevados se obtuvieron en las manzanas conservadas en LO y ULO (Tabla 4).

En vista de los resultados obtenidos se confirma que el uso de las atmósferas controladas, y especialmente las AC con bajo O₂, alargan el periodo de conservación y por tanto de comercialización, al mantener durante más tiempo la calidad. Así, los frutos conservados en LO y en ULO presentaron las mejores características de firmeza, acidez y sólidos solubles

después de un largo periodo de almacenamiento. En el presente trabajo, las diversas atmósferas controladas estudiadas retrasaron el inicio del climaterio, al inhibir la producción de etileno, hormona que juega un papel esencial en el proceso de maduración de los frutos climatéricos (Yang y Hoffman, 1984; Yang, 1987; Theologis, 1992; Kende, 1993). Sin embargo, los parámetros cualitativos se mantuvieron considerablemente mejor en AC con bajo O_2 que en AC estándar. Por ello, la retención de la calidad no puede ser solamente atribuida a la reducción de la producción del etileno, sino que existe además una interferencia del bajo O_2 con la acción del etileno sobre el proceso de la maduración (Burg y Burg, 1967; Sfakiotakis et al., 1993). Asimismo, el CO_2 producido por la respiración del fruto puede competir con la acción del etileno, siempre que la concentración de etileno interno se mantenga baja, lo cual se consigue en las atmósferas LO o ULO (Sfakiotakis et al., 1993).

El O_2 y el CO_2 actúan de forma combinada sobre el metabolismo del fruto, por lo que la concentración de O_2 que debe mantenerse en la cámara va ligada a la concentración de CO_2 . Con un 1% de O_2 , niveles elevados de CO_2 (3-5%) no ayudan a mejorar parámetros cualitativos como la firmeza, la acidez valorable, el contenido en sólidos solubles, la incidencia de escaldado y diversos atributos sensoriales (Drake et al., 1993). Por otro lado, la ausencia de CO_2 en atmósferas con un nivel muy bajo de CO_2 provoca una caída brusca de la firmeza (Johnson et al., 1993) y niveles muy bajos de CO_2 (en torno al 0,5%) reducen este parámetro en función del cultivar (Lau, 1985). Según Lau (1983), con un 1% de O_2 , una concentración del 1-1,5% de CO_2 parece segura y efectiva para mantener la calidad. En el presente trabajo, en la cámara con condiciones LO (2% O_2 / 2% CO_2) se obtuvieron muy buenos resultados en los parámetros cualitativos. Adicionalmente, en un estudio realizado con las mismas manzanas se obtuvo un buen control del escaldado superficial en frutos de la cosecha II conservados con un 2% de O_2 (Soria et al., publicación en prensa). En otros trabajos realizados con la variedad Granny Smith en las mismas cámaras experimentales, se ha observado que la reducción del nivel de O_2 al 2-1,5% retiene durante varios meses la firmeza y la acidez (Filella, 1994; de la Serna, 1995) y que la conservación en ULO no supone un beneficio frente a la conservación en LO (de la Serna, 1995). En base a estos resultados y considerando que un aspecto negativo de las atmósferas controladas con muy bajo O_2 es el coste adicional que supone mantener los reducidos niveles de O_2 y de CO_2 en la cámara, pueden recomendarse las condiciones LO para almacenamientos largos de manzanas Granny Smith cosechadas en la zona de Lleida, en estado preclimaterio, aunque no excesivamente prematuro. Sin embargo, serían necesarios más ensayos a nivel comercial, antes de dar una recomendación definitiva.

SYNOPSIS

Storage in controlled atmosphere (CA) is a practice which is generally used with apples to prolong their period of marketing. The ideal conditions of cold storage have been and are being studied, since they considerably affect the quality of fruit. The beneficial effect of CA storage is produced as a result of the physiological changes in the fruit along with the reduction of the respiration rate.

Many papers have shown the inhibiting effect of ethylene production and respiration rate on apples produced by CA. It is also noted that the lower the oxygen concentration, the lower the metabolic activity is (Lidster et al., 1983; Stow, 1989). This is shown by an improvement in fruit quality. Two of the most characteristic effects of CA storage are the maintenance of

firmness and acidity. Goffings and Herregods (1994) observed that the lower the O_2 concentration in storage, the lower the loss of firmness and acidity. In contrast the soluble solids content are not affected. Graell et al. (1997) working with Topred apples, didn't find significant differences between fruits kept in varied concentrations of O_2 . One factor which could affect the soluble solids content is the date of harvesting, although there are contradictory results in Jonagold apples (Herregods and Goffings 1993, Girard and Lau 1995). All these studies show that storage conditions affect the final quality of the fruit. The aim of this paper is to evaluate the effect of different storage conditions on Granny Smith apples harvested in Lleida at two stages of maturity.

Granny Smith apples (*Malus domestica* Borkh.) were harvested in the Lleida area with a week's interval. The first harvest was carried out before full maturity on 10th October 1993 (harvest I), and the second, carried out within the normal harvesting period on 18th October (harvest II). After harvesting, the fruit was distributed into different storage atmospheres: air, (21% O_2 / 0,03% CO_2), CA standard (3% O_2 / 3% CO_2), Low Oxygen (LO) (2% O_2 / 2% CO_2), Ultra Low Oxygen (ULO) (1% O_2 / 1% CO_2), at a temperature of 0,5°C. The analysis were carried out both after harvesting and also after 2, 4, 6 and 8 months cold storage. After being removed from cold storage the fruit was stored for 10 days in a chamber at 20°C, with a humidity of 80%, in order to study the physiological and qualitative changes during the shelf-life period.

To determine ethylene and carbon dioxide production, 5 apples were placed in 10-litre flasks which were continuously aerated with humidified air. 1 ml gas samples were taken and injected into a gas chromatograph for ethylene determination. CO_2 concentrations were measured by connecting the effluent air from the ventilated flasks to an infra-red gas analyser. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) content, ACC oxidase activity, and quality parameters were assessed after cold storage only in second harvest fruits. To determine the levels of ACC, samples were extracted according to the method of Apelbaum and Yang (1979). ACC oxidase enzyme was determined *in vivo* by measuring the conversion from ACC to ethylene (Mansour et al. 1986). Weight was expressed in g. Firmness was measured on two opposite sides of the apples using a penetrometer fitted with an 11 mm probe. Acidity was measured by titration with 0.1 N NaOH solution and expressed as g malic acid / l juice. Soluble solids content was measured with a digital refractometer and expressed as a percentage.

During the following 10 days of both harvests, no ethylene was detected and there was no ACC oxidase activity (Figure 1a), which indicated that the fruits from both harvests were at the preclimateric stage. However, ethylene did begin to be detected several days later. It was observed that in harvest I the climateric peak was higher and took place earlier than in harvest II. The date of harvest also affected ethylene production after cold storage (Figure 2). The fruit from harvest I showed normal climateric behaviour, with a climateric peak a few days after removal from cold storage. In harvest II, the ethylene production was lower and only apples stored in air showed a climateric peak. In apples stored in controlled atmospheres the ethylene concentration increased when the apples were kept at 20°C.

The storage of Granny Smith apples in all CA conditions reduced ethylene production (Figure 2). This effect was especially evident in the second harvest. In the apples harvested at an early stage of maturity (harvest I) and kept in air or in CA, the level of C_2H_4 detected was similar, reaching a higher level in fruits kept in CA for 6 or 8 months. In fruits from harvest II, the

effect of atmospheric conditions on the fruits disappeared after 8 months' storage (Figure 2).

The level of ACC was similar in air and in CA standard, whereas in ULO higher levels were detected (Table 1). In the present study, the ULO conditions reduced the production of ethylene but not the level of ACC. The low O₂ atmospheres reduce the biosynthesis of ethylene because they slow down the expression of ACC synthetase enzyme (Gorny and Kader, 1996). But the low O₂ levels stimulate the accumulation of ACC (Levin et al., 1993). This accumulation is probably produced when the conversion from ACC to ethylene, due to the ACC-oxidase, is inhibited. This conversion is wholly dependent on the O₂ concentration. The ACC content in fruits stored in CA standard could be the result of a balance between the concentration of O₂ and CO₂ in the atmosphere of the cold room. In this room the effect of the reduction in O₂ was combined with the increase in CO₂ concentration (to 3%). These CA standard conditions produced lower levels of ACC than the ULO conditions, while the ethylene production was similar in both atmospheric conditions (Figure 2). On the other hand, the lower levels of ACC in fruits kept in air can be explained by the transformation of ACC to ethylene, due to the presence of O₂.

ACC oxidase activity increased after each removal from cold storage. However, this activity was influenced by the length of cold storage and by the atmospheric conditions of the room (Table 2). The highest levels were detected after 8 months cold storage. Gorny and Kader (1996) reported too that the ACC oxidase activity also increased during storage both in air and CA conditions, although this increase was lower in CA standard than in air (Chaves and Tomas, 1984, Cheverry et al., 1988, Gorny and Kader, 1994). This was probably due to fact that CO₂ inhibits the activity of this enzyme in apples. The ACC oxidase activity was slowed down and even stopped as a consequence of the reduction of O₂ concentration in fruits stored in LO and ULO.

At the moment of picking, the CO₂ given out by the respiration of the fruits was slightly less in harvest I than in harvest II (Figure 1b). After several days at room temperature the respiration reached a maximum level. On the other hand, a climateric increase didn't appear after cold storage because the CO₂ remained at a constant level during a period of 10 days at 20°C (Figure 3). A reduction in the respiration of the fruits from both harvests was shown after storage in CA conditions. At the beginning of cold storage the respiration was similar in all oxygen levels but, with time, variations were noticed between different atmospheric conditions (Figure 3). During the last few months of storage the highest respiration rate was noted in CA standard, followed by LO and ULO, in agreement with several authors (Lidster et al., 1983; Gherghi et al., 1994) who noted that low levels of O₂ in the room inhibit respiration more than CA standard.

In Table 3 quality parametres of fruits from harvest I and II at the moment of picking are shown. Fruits from harvest II were riper than harvest I. CA storage significantly maintained the quality of Granny Smith apples, since the levels of acidity, firmness and soluble solids were better retained (Table 4). After 4 months' storage and onwards, the fruits kept in ULO showed a significantly higher level of acidity than those kept in other atmospheres. The respiration rate was lower in CA storage, especially in ULO conditions (Figure 2). This indicates that the malic acid acts as a respiratory sustrate during storage. Firmness decreased more in air than in CA conditions. After 8 months' storage in air the reduction in firmness was 70% from the moment of harvest, but in LO the reduction was only 6% (Tables 3 and 4) The soluble solid content was

maintained throughout storage in all rooms. After 8 months, higher levels were achieved in LO and ULO (Table 4).

The results show that the use of CA conditions, especially with low O₂, allow storage periods to be lengthened. Therefore, fruits kept for long periods in LO and ULO showed improved levels of firmness, acidity and soluble solids. In other studies carried out in the same experimental rooms with 2 or 1,5 % O₂, Granny Smith apples also maintained firmness and acidity for several months (Filella, 1994; de la Serna, 1995). However, storage in ULO (1% O₂) doesn't necessarily produce beneficial results compared with storage in LO (2% O₂) (de la Serna, 1995). In addition, in one of our studies (in press), scald was well controlled with 2% O₂ conditions in fruits from harvest II.

Taking into consideration these results, and in spite of the higher cost of low-oxygen controlled atmospheres, LO conditions for long storage of Granny Smith apples, harvested at physiological maturity in Lleida area.

BIBLIOGRAFIA

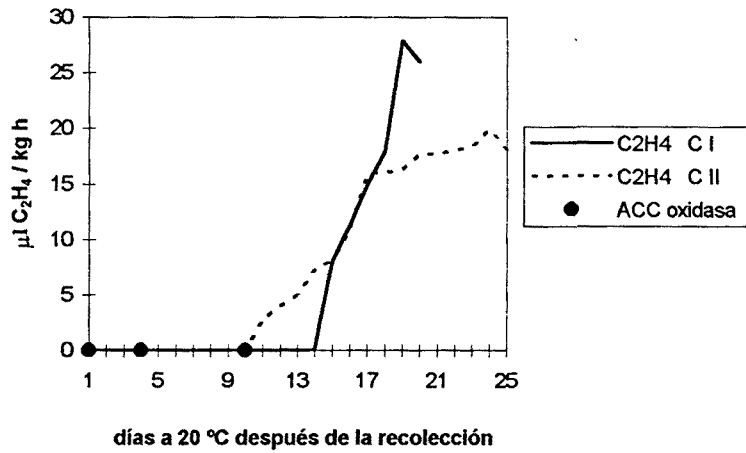
- APELBAUM, A., YANG, S.F. 1981. Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. *Plant Physiol.*, 68:74-79.
- BUFLER, G. 1984. Ethylene-enhanced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in ripening apples. *Plant Physiol.*, 75:192-195.
- BURG, S.P., BURG, E. 1967. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.*, 42:144-152.
- BURG, S.P., THIMANN, K.V. 1959. The physiology of ethylene formation in apples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45:344-355.
- CHAVES, A.R., TOMAS, J.O. 1984. Effect of a brief CO₂ exposure on ethylene production. *Plant Physiol.*, 76:88-91.
- CHAVEZ-FRANCO, S.H., KADER, A.A. 1993. Effects of CO₂ on ethylene biosynthesis in "Bartlett" pears. *Postharvest Biol. Technol.*, 3:183-190.
- CHEN, P.M., OLSEN, K.L., MEHERIUK, M. 1985. Effect of low-oxygen atmosphere on storage scald and quality preservation of "Delicious" apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110:16-20.
- CHEVERRY, J.L., SY, M.O., POULIQUEEN, J., MARCELLIN, P. 1988. Regulation by CO₂ of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conversion to ethylene in climacteric fruits. *Physiol. Plant.*, 72:535-540.
- DRAKE, S.R., EISELE, T.A., WAELTI, H. 1993. Controlled atmosphere storage of "Delicious" apples in high and variable carbon dioxide. *Journal of Processing and Preservation*, 17:177-189.
- FICA, J. 1991. The response of Cortland apples to low oxygen and low ethylene CA storage. *Fruit Science Reports*, Vol. XVIII, 2:63-76.
- FILELLA, J.M. 1994. Seguiment i estudi de l'evolució dels paràmetres de maduresa de poma Granny Smith conservada en atmosfera controlada amb baixos nivells d'oxigen i d'etilè. Trabajo Final de Carrera. E.T.S.E.A. Universidad de Lleida (España).
- GHERGHI, A., MARGINEANU, L., BIBICU, M. 1994. The influence of low oxygen concentration during storage on metabolic processes in apples. *Acta Horticulturae*, 368:608-613.

- GIRARD, B., LAU, O.L. 1995. Effect of maturity and storage on quality and volatile production of "Jonagold" apples. *Food Research International*, 28:465-471.
- GOFFINGS, G., HERREGODS, M. 1994. The influence of the storage conditions on some quality parameters of Jonagold apples. *Acta Horticulturae*, 368:37-42.
- GORNY, J.R., KADER, A.A. 1994. The mode of CO₂ action on ACC oxidase and its role in the inhibition of ethylene biosynthesis. *HortScience*, 29:533 (Abstr.).
- GORNY, J.R., KADER, A.A. 1996. Controlled-atmosphere suppression of ACC synthase and ACC oxidase in "Golden Delicious" apples during long-term cold storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121:751-755.
- GRAELL, J., LARRIGAUDIÈRE, C., VENDRELL, M. 1997. Effect of low-oxygen atmospheres on quality and superficial scald of Topred apples. *Food Science and Technology International*, 3:203-211.
- HERREGODS, M., GOFFINGS, G. 1993. The storage of Jonagold apples in U.L.O.-circumstances. *Acta Horticulturae*, 343:148-154.
- JOBLING, J.J., McGLASSON, W.B. 1995. A comparison of ethylene production, maturity and controlled atmosphere storage life of Gala, Fuji and Lady Williams apples (*Malus domestica*, Borkh.). *Postharvest Biol. Technol.*, 6:209-218.
- JOHNSON, D.S., DOVER, C.J., PEARSON, K. 1993. Very low oxygen storage in relation to ethanol production and control of superficial scald in Bramley's Seedling apples. *Acta Horticulturae*, 326:175-182.
- KE, D., RODRIGUEZ-SINOBAS, L., KADER, A.A. 1991. Physiology and prediction of fruit tolerance to low-oxygen atmospheres. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116:253-260.
- KENDE, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44:283-307.
- KIDD, F., WEST, C. 1930. Physiology of fruit. I. Changes in respiratory activity of apples during their senescence at different temperatures. *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, 106:93-109.
- LARRIGAUDIÈRE, C., VENDRELL, M. 1993. Cold-induced activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in rewarmed "Granny Smith" apples: Consequences on ripening. *Scientia Horticulturae*, 55:263-272.
- LAU, O.L. 1983. Effects of storage procedures and low oxygen and carbon dioxide atmospheres on storage quality of "Spartan" apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108:953-957.
- LAU, O.L. 1985. Storage procedures, low oxygen, and low carbon dioxide atmospheres on storage quality of "Golden Delicious" and "Delicious" apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110:541-547.
- LAU, O.L. 1990. Tolerance of three apple cultivars to ultra-low levels of oxygen. *HortScience*, 25:1412-1414.
- LAU, O.L., YASTREMSKI, R. 1993. The use of 0.7% storage oxygen to attenuate scald symptoms in "Delicious" apples: effect of apple strain and harvest maturity. *Acta Horticulturae*, 326:183-189.
- LEVIN, A., SONEGO, L., ZUTKHI, Y., BEN-ARIE, R. 1993. Effects of CO₂ on ethylene production by apples at low and high O₂ concentrations. In: J.C. Pech, A. Latche and C. Balague (Editors), *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylenen*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- LIDSTER, P.D., LIGHTFOOT, H.J., McRAE, K.B. 1983. Fruit quality and respiration of "McIntosh" apples in response to ethylene, very low oxygen and carbon dioxide storage atmospheres. *Scientia Horticulturae*, 20:71-83.
- LIDSTER, P.D., McRAE, K.B., SANDFORD, K.A. 1981. Responses of McIntosh apples to low oxygen storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:159-162.

- LIZADA, M.C.C., YANG, S.F. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.*, 100:140-145.
- MANSOUR, R., LATCHE, A., VAILLANT, V., PECH, J.C., REID, M.S. 1986. Metabolism of ACC in ripening apple fruits. *Physiol. Plant.*, 66:495-502.
- MATHOOKO, F.M. 1996. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biol. Technol.*, 7:1-26.
- MATHOOKO, F.M., KUBO, Y., INABA, A., NAKAMURA, R. 1995. Characterization of the regulation of ethylene biosynthesis in tomato fruit by carbon dioxide and diazocyclopentadiene. *Postharvest Biol. Technol.*, 5:221-233.
- MIRET, F. 1992. Estudio de la fisiología del crecimiento, maduración y conservación frigorífica de las variedades de manzana "Red Winesap y Granny Smith". Tesis Doctoral. E.T.S.E.A. Universidad de Lleida (España).
- de la SERNA, A. 1995. Estudio de la conservación de la variedad de manzana Granny Smith en atmósfera controlada con bajos niveles de oxígeno. Trabajo Final de Carrera. E.T.S.E.A. Universidad de Lleida (España).
- SFAKIOTAKIS, E., NIKLIS, N., STAVROULAKIS, G., VASSILIADIS, T. 1993. Efficacy of controlled atmosphere and ultra low oxygen - low ethylene storage on keeping quality and scald control on "Starking Delicious" apples. *Acta Horticulturae*, 326:191-202.
- SKRZYNSKI, J. 1994. The effect of low oxygen storage on Jonagold and Golden Delicious apples. *Acta Horticulturae*, 368:558-565.
- SMITH, N.J.S. 1995. Recognizing and achieving commercial quality in fresh produce. *Postharvest News and Information*, Vol. 6, 3:28N-30N.
- SORIA, Y., HERRERO, A., RECASENS, I. Relationship between α -farnesene, conjugated trienes and scald development on Granny Smith apples stored in air or controlled atmosphere conditions. (Publicación en prensa).
- STOW, J. 1987. Storage of "Jonagold" apples. *Scientia Horticulturae*, 31:245-251.
- STOW, J. 1989. The response of apples cv. Cox's Orange Pippin to different concentrations of oxygen in the storage atmosphere. *Ann. appl. Biol.*, 114:149-156.
- THEOLOGIS, A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell*, 70:181-184.
- YANG, S.F. 1987. Regulation of biosynthesis and action of ethylene. *Acta Horticulturae*, 201:53-59.
- YANG, S.F., HOFFMAN, N.E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35:155-189.
- YU, Y.B., YANG, S.F. 1980. Biosynthesis of wound ethylene. *Plant Physiol.*, 66:281-285.

PRODUCCION DE ETILENO

(a)

PRODUCCION DE CO₂

(b)

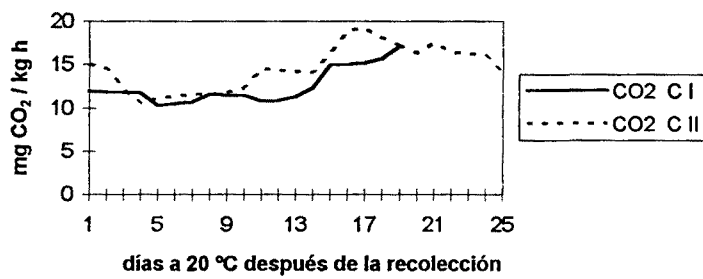


Figura 1. Producción de etileno y actividad de la enzima ACC oxidasa (Fig. a) y producción de dióxido de carbono (Fig. b) después de la recolección de manzanas Granny Smith cosechadas el 10/10/93 (C I) o el 18/10/93 (C II)

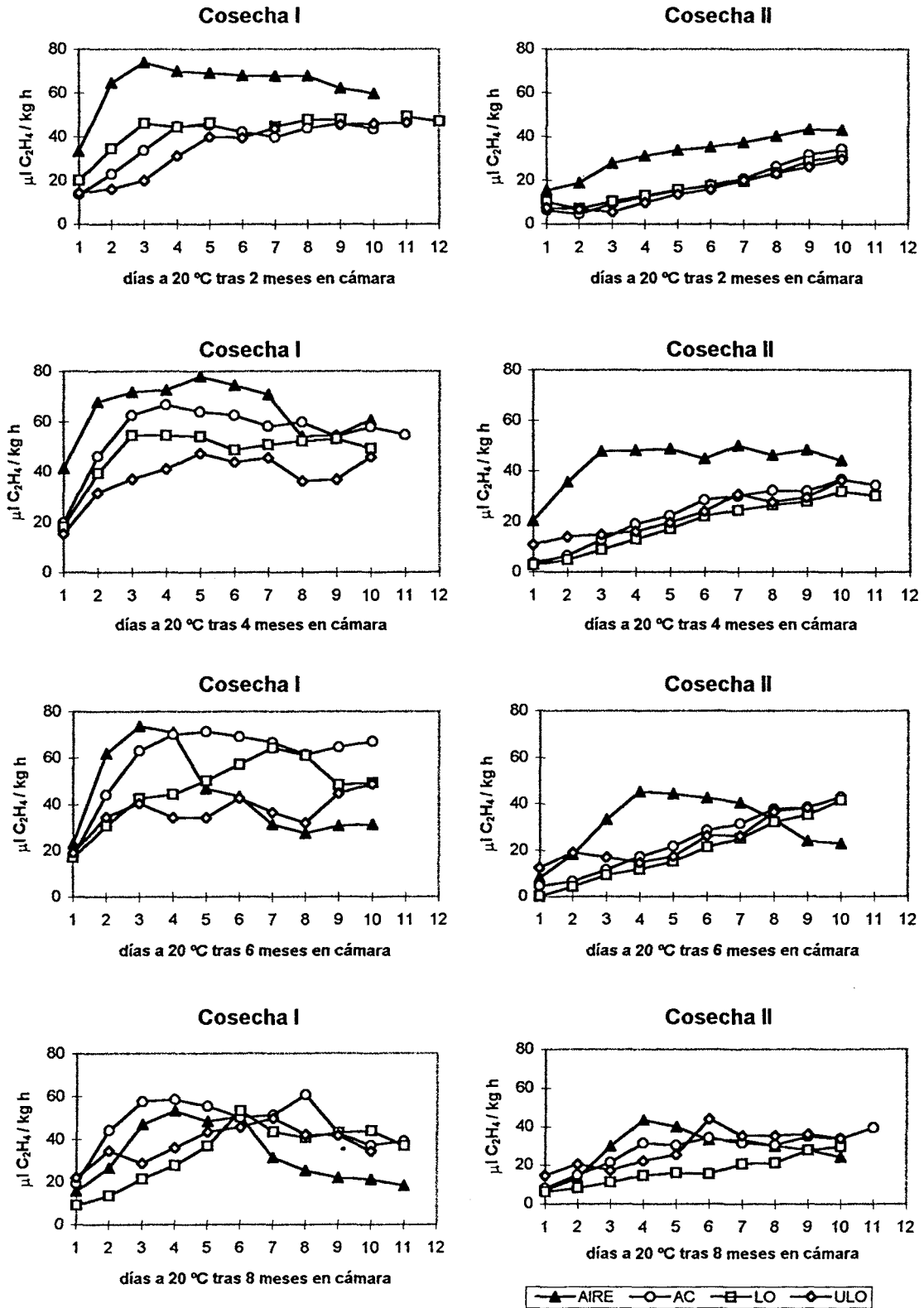


Figura 2. Producción de etileno ($\mu\text{l C}_2\text{H}_4 / \text{kg h}$) en manzanas Granny Smith cosechadas el 10/10/93 (cosecha I) o el 18/10/93 (cosecha II) y conservadas a 0,5 °C durante 2, 4, 6 u 8 meses en atmósfera normal (aire) o en distintas condiciones de atmósfera controlada: AC (3% O_2 / 3% CO_2); LO (2% O_2 / 2% CO_2); ULO (1% O_2 / 1% CO_2). La producción se determinó diariamente en frutos mantenidos a 20 °C en aire, después de cada salida de cámara.

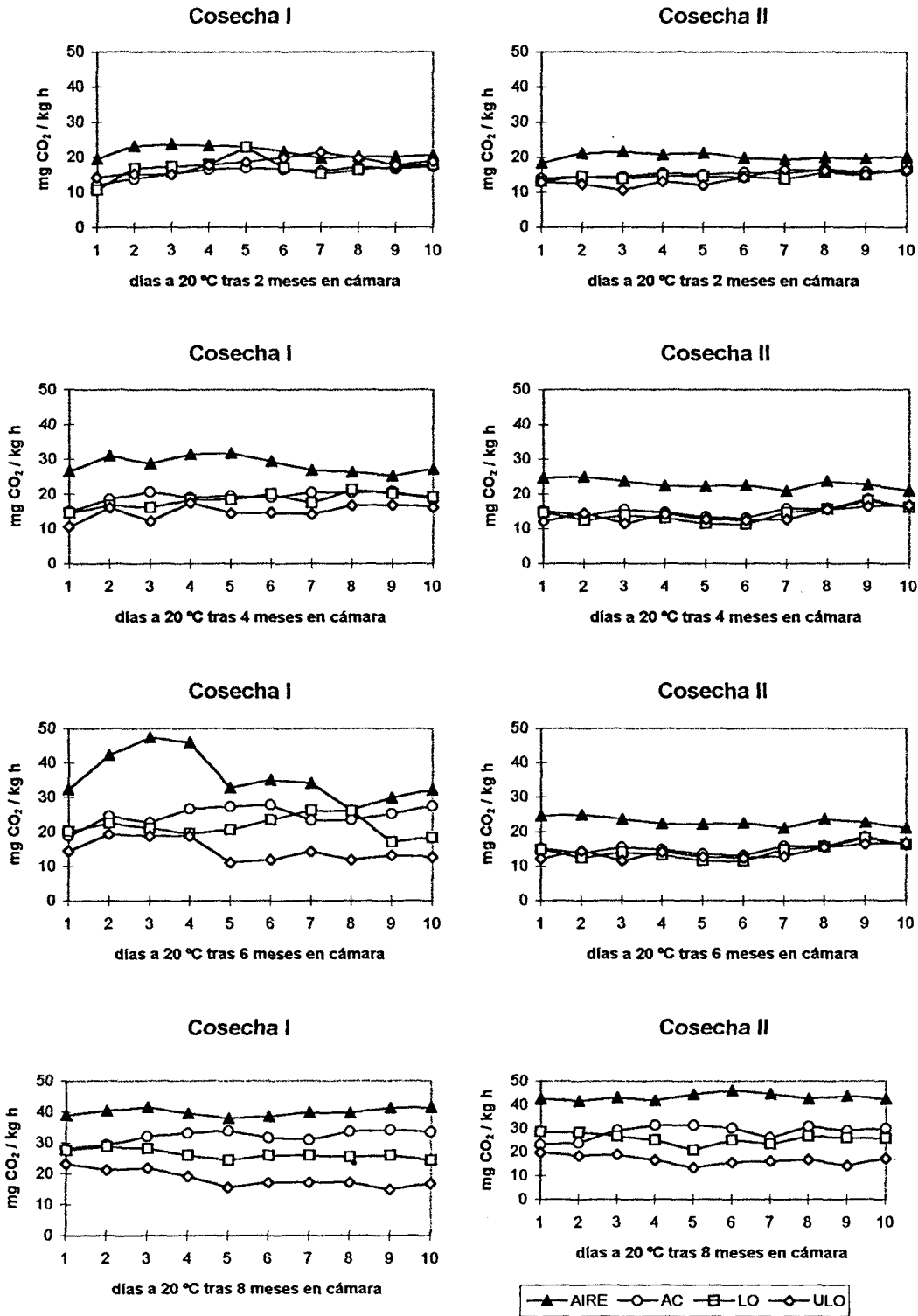


Figura 3. Producción de dióxido de carbono (mg CO₂ / kg h) en manzanas Granny Smith cosechadas el 10/10/93 (cosecha I) o el 18/10/93 (cosecha II) y conservadas a 0,5 °C durante 2, 4, 6 u 8 meses en atmósfera normal (aire) o en distintas condiciones de atmósfera controlada: AC (3% O₂ / 3% CO₂); LO (2% O₂ / 2% CO₂); ULO (1% O₂ / 1% CO₂). La producción se determinó diariamente en frutos mantenidos a 20 °C en aire, después de cada salida de cámara.

Tabla 1. Contenido de ACC (nmol ACC / g peso seco) en la pulpa de manzanas Granny Smith cosechadas el 18/10/93 (cosecha II) y conservadas a 0,5 °C durante 4 meses en atmósfera normal (aire) o en distintas condiciones de atmósfera controlada. Determinaciones realizadas con pulpa congelada y liofilizada de frutos mantenidos a 20 °C en aire después de cada salida de cámara.

Condiciones de conservación	Tiempo a 0 °C (meses)	Días a 20 °C después de la frigoconservación		
		1	4	10
Aire	4	20,18	33,75	36,61
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		24,29	33,39	46,61
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		88,57	48,04	-

Tabla 2. Actividad de la enzima ACC oxidasa (nmol C₂H₄ / g peso fresco y h) en la pulpa de manzanas Granny Smith cosechadas el 18/10/93 (cosecha II) y conservadas a 0,5 °C durante 2, 4, 6 u 8 meses en atmósfera normal (aire) o en distintas condiciones de atmósfera controlada. Determinaciones realizadas en frutos mantenidos a 20 °C en aire después de cada salida de cámara.

Condiciones de conservación	Tiempo a 0 °C (meses)	Días a 20 °C después de la frigoconservación		
		1	4	10
Aire	2	0,61	1,14	2,40
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		0,14	1,30	2,32
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)		0,19	0,87	1,78
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		0,37	0,48	1,42
Aire	4	1,67	3,19	1,05
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		1,44	1,87	1,53
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)		1,35	1,46	1,99
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		0,77	1,45	2,71
Aire	6	4,60	3,06	0,94
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		2,96	2,46	2,35
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)		2,65	2,88	1,47
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		1,91	2,13	1,20
Aire	8	5,51	3,10	0,45
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		5,78	4,22	1,93
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)		4,37	4,30	3,61
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		4,03	2,77	2,39

Tabla 3. Parámetros de calidad en manzanas Granny Smith cosechadas el 10/10/93 (cosecha I) o el 18/10/93 (cosecha II) . Determinaciones realizadas un día después de cada cosecha en frutos mantenidos a 20 °C en aire.

Parámetros de calidad	Cosecha I 10/10/93	Cosecha II 18/10/93
Peso (g)	209,5	224,1
Firmeza (lb)	17,42	17,13
Acidez (g ác. málico/l)	9,73	10,15
Sólidos solubles (%)	10,47	11,54

Tabla 4. Parámetros de calidad en manzanas Granny Smith cosechadas el 18/10/93 (cosecha II) y conservadas a 0,5 °C durante 2, 4, 6 u 8 meses en atmósfera normal (aire) o en distintas condiciones de atmósfera controlada. Los datos corresponden a la media de 30 frutos mantenidos a 20 °C en aire después de cada salida de cámara.

Condiciones de conservación	Tiempo a 0 °C (meses)	Peso (g)	Firmeza (lb)	Acidez (g ác. málico/l)	Sólidos Solubles (%)
Aire	2	211,0 ab	16,43 a	8,42 a	11,91 b
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		202,3 a	17,58 c	8,84 b	11,33 a
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)		212,9 ab	17,08 b	8,62 ab	11,74 b
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		221,9 b	17,21 b	8,38 a	12,21 c
Aire	4	225,7 b	14,78 a	7,19 a	11,35 a
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		205,3 a	16,41 b	7,49 ab	11,22 a
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)		204,7 a	17,01 c	7,79 b	11,20 a
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		213,3 ab	17,24 c	8,49 c	12,16 b
Aire	6	203,5 a	13,10 a	5,84 a	11,06 a
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		203,5 a	16,65 b	6,70 b	11,21 a
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)		211,4 ab	16,99 b	6,85 b	12,72 c
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		215,5 b	16,87 b	6,52 b	11,53 b
Aire	8	203,9 a	12,22 a	5,07 a	10,72 a
AC (3% O ₂ / 3% CO ₂)		209,9 a	14,44 b	5,50 b	11,16 b
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)		206,0 a	16,03 d	5,76 b	11,43 c
ULO (1% O ₂ / 1% CO ₂)		205,9 a	15,20 c	6,55 c	11,41 c

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, para cada salida de cámara. Separación de medias según el Test de Duncan ($\alpha = 0,05$).

**RELATIONSHIP BETWEEN α -FARNESENE, CONJUGATED TRIENES AND
SCALD DEVELOPMENT ON GRANNY SMITH APPLES STORED IN AIR OR
CONTROLLED ATMOSPHERE CONDITIONS**

Y. SORIA, , I. RECASENS

Area de Postcollita. CeRTA. Centro UdL-IRTA. Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure,
177, 25198 Lleida, España.

Enviado a:

Journal of the American Society for Horticultural Science

RELATIONSHIP BETWEEN α -FARNESENE, CONJUGATED TRIENES AND SCALD DEVELOPMENT ON GRANNY SMITH APPLES STORED IN AIR OR CONTROLLED ATMOSPHERE CONDITIONS

Y. Soria, I. Recasens

Area de Postcollita. CERTA. Centro UdL-IRTA. Universitat de Lleida
Av. Rovira Roure 177, 25198 L rida, Spain. e.mail: recasens@lleida.irta.es

ABSTRACT. Granny Smith apples were harvested during two seasons at two different dates before or during commercial harvest to vary the scald susceptibility. Fruits were stored at 0,5  C for 0 to 8 months, in air or in the following controlled atmospheres (CA): standard CA defined as 3%O₂/3%CO₂; low oxygen CA (LO) defined as 2%O₂/2%CO₂; and ultra low oxygen CA (ULO) defined as 1%O₂/1%CO₂. Half of the fruits of second season were dipped with diphenilamine (DPA). Scald development, α -farnesene and conjugated trienes (CTH) were measured at harvest and after various storage intervals. Fruits were examined after 1, 4 and 10 days at 20  C for the first season and after 5 days at 20  C for the second season. Hexane extracts of whole fruit were used to estimate α -farnesene and CTH; these values were correlated with scald development. CTH concentrations were calculated using each of the two CTH absorption maxima (281-290 nm and 258-290 nm) and expressed accordingly as CT281 and CT258. The level of α -farnesene was affected by storage conditions and was not related to harvest date. The effect of harvest date on the level of CTH was greater than the effect of storage conditions. The correlation between scald index and α -farnesene was significant after long storage periods. The correlations obtained with CT281 extracts at 2 months of storage and scald development after 4 or 6 months were stronger than the levels of CT281 at the time of scald assessment. The CT258/CT281 ratio was negatively correlated with scald index.

Keywords: Apple, superficial scald; α -farnesene, conjugated trienes, low-oxygen storage, diphenylamine.

INTRODUCTION

Superficial scald of apples is one of the most extensively studied postharvest disorders of fruit (Ingle and D'Souza, 1989). The disorder manifests as browning of the skin resulting from damage to hypodermal cells (Bain and Mercer, 1963).

Although the process of scald development is still unclear, the presence in the peel of α -farnesene (Murray et al., 1964; Huelin and Murray, 1966) and more exactly the conjugated triene hydroperoxides (CTH) resulting from the oxidation α -farnesene (Huelin and Coggiola, 1968), seems to be the origin of the cellular disruption and scald symptom development. Since

the report of Huelin and Coggiola (1968), most studies of the physiology of scald development have included absorbance measurements of hexane extracts of fruit surfaces (Du and Bramlage, 1993). The value of absorbance at 281 nm minus the absorbance at 290 nm ($OD_{281-290nm}$) proposed by Anet (1972) has been routinely used to calculate CTH concentrations. However, other absorption maxima have been observed at 258 and 269 nm (Huelin and Coggiola, 1970; Meir and Bramlage, 1988).

The association of CTH species with scald is based entirely on correlative data. Inconsistencies among correlation coefficients between $OD_{281-290nm}$, $OD_{269-290nm}$, and $OD_{258-290nm}$ and scald occurrences have been observed (Meir and Bramlage, 1988) which led researchers to reconsider the role of CTH in scald development.

The object of the present work is to study the relationship between the concentration of α -farnesene and CTH in the peel, and the development of superficial scald in "Granny Smith" apples stored in several atmospheric conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. Granny Smith apples (*Malus domestica* Borkh.) were picked before and during commercial harvest during the 1993/94 and 1994/95 seasons in L rida, Spain. In the first season apples were harvested on Oct. 10 and 18, 1993 and in the second season on Sept. 26 and Oct. 10, 1994. In each season, the first harvest is referred to as Harvest 1 and the second as Harvest 2.

Apple treatments. The following treatments were applied during the 1993/94 season: standard controlled atmosphere storage (CA) defined as 3%O₂ / 3%CO₂; low oxygen controlled atmosphere (LO) defined as 2%O₂ / 2%CO₂; and ultra low oxygen controlled atmosphere (ULO) defined as 1%O₂ / 1%CO₂. Control fruits were stored in air at 0,5  C. Diphenylamine (DPA) treatments were not applied to any apples. Four storage periods were tested: 2, 4, 6 and 8 months. Following storage, the apples were kept at room temperature, and fruits were examined after 1, 4 and 10 days at 20 C.

The atmospheric conditions applied during the 1994/95 season were: controlled atmosphere storage (CA), and low oxygen controlled atmosphere (LO). Fruits were stored in air at 0 C as control. In each storage condition, half of the fruits were dipped with diphenylamine (DPA, 1500 ppm). The storage periods were 3, 4, 5 and 6 months for conventional cold-stored fruits and 7 months for controlled atmosphere fruits. Examinations were made after 5 days at 20 C.

Evaluation of scald development. Superficial scald was determined on 30-fruit samples from each treatment combination. Each fruit was visually evaluated and the incidence of superficial scald was expressed as the percentage of affected fruits. Severity of scald was scored for each apple as none, light (< 25% of the surface area affected), medium (25%-50%), and severe (> 50%) (Bauchot et al., 1995) and expressed as an index according to Lurie et al. (1991) in which

the severity index = [(1 x % lightly affected fruits) + (2 x % medium affected fruits) + (4 x % severely affected fruits)] / 4.

Extraction of α -farnesene and CTH. Hexane extracts were obtained by dipping 10 apples individually and sequentially in 250 ml of HPLC-grade hexane for 2 minutes. The volume of the extract was adjusted to 250 ml and the UV absorption was recorded at 232 nm, 258 nm, 281 nm and 290 nm. Concentrations of α -farnesene and CTH species were calculated according to Anet (1972). Concentrations of α -farnesene were calculated from absorbance at 232 nm (OD_{232 nm}) using the extinction coefficient $E_{232 \text{ nm}} = 29,000$. Concentrations of all CTH species were assumed to have an extinction coefficient of 25,000 and were calculated from OD_{258-290 nm} and OD_{281-290 nm}. These are referred to as CT258 and CT281, respectively. The apple surface was calculated from the fruit diameter. Surface area (S) was estimated using the equation of Anet (1972) as $S = 1.028 A$, where A is the area of a sphere of equal volume to that of the apple. CT258 was only determined in the second season.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of treatments on the development of superficial scald. 93/94 Harvest Season

Effect of harvest date. Maturity at harvest influenced the development of superficial scald during cold storage. In the present study, an 8-day delay of the second harvest reduced markedly the scald incidence (Fig. 1). Various authors have similarly demonstrated that the incidence of scald is greater in fruits of early harvest (Little et al., 1982; Chen et al., 1985; Lidster et al., 1987; Dilley, 1993; Patterson, 1993; Truter and Combrink 1993; Lau and Yastremski, 1993; Manseka and Vasilakakis, 1993; Sfakiotakis et al., 1993).

Effect of storage time. Scald development was aggravated by an extension of the storage period. Following a 2-month period of cold storage, fruits placed in room temperatures (20°C) did not display symptoms of scald. After 8 months of cold storage and 10 days at 20°C, nearly all the fruit from Harvest 1 displayed scalding (Fig. 1e), and from Harvest 2, low oxygen storage was the only means of slowing the development of scald (Fig. 1f). However, the severity of affected fruit, defined by a scald index, did not increase at the same proportion as the incidence (Table 1).

Effect of the number of days at ambient temperature. After a 4 month storage period at 0°C plus 1 day at 20°C there were no symptoms of scald (Figs. 1a and 1b). If the period of cold storage was increased to 6 or 8 months, scald symptoms were detected the first day following removal. In general, the percentage of scald displayed after 4 days at 20°C was similar to the percentage of scald after 10 days.

Effect of storage conditions. The incidence of superficial scald was greater in air storage than in all CA conditions. Figures 1a and 1b show that after 4 months in air storage the percentage of superficial scald was elevated while in CA the incidence was very low. At 4 and 6 months the severity of superficial scald was notably higher in air than in the CA too (Table 1).

The incidence of scald can be reduced with low O₂ only when the other factors affecting this disorder are favorable (Nardin and Casera, 1988). Given the strong influence of harvest date on the development of scald, if the fruits are collected excessively premature, scalding cannot be controlled even with the utilization of extremely low O₂ levels of 0.5% and then, the application of DPA is necessary (Chen et al., 1985). In fruits from Harvest 1, CA conditions were not able to prevent the development of scalding, particularly in fruit stored for longer periods (Fig. 1e). However, when fruit is harvested in the state of commercial maturity, the incidence of scalding in atmospheres of low O₂ is very low, and cannot significantly be reduced with DPA application (Lau, 1990). The present study confirms Lau's findings in that the response to CA is much better when the fruit has been harvested at adequate maturity. The percentage of scalding in Harvest 2 was maintained at very low levels until the third removal from the storage chamber (Fig. 1d), and from thence good results were obtained with LO (2% O₂) (Fig. 1f).

The adequate level of O₂ for controlling superficial scald is difficult to determine because it depends upon numerous factors such as the fruit variety, the weather conditions prior to harvest and the harvest date itself. Comparing different storage conditions, the best results for controlling scald in Granny Smith apples were achieved with 1.5% O₂ (Simcic et al., 1994; Truter et al., 1994); or with 1% O₂ (Francile and Battaglia, 1992; Nardin, 1994) or with 0.5% O₂ (Curry, 1989; Pratella et al., 1989a). In Harvest 1, fruits stored in ULO (1% O) demonstrated the least incidence of scald and the severity of the scald reached a maximum of 32.5 (Table 1). In Harvest 2, unexpectedly, it was observed that the severity of scalded apples was greater in ULO than in LO, where the maximum incidence was only 20% (Fig. 1f). Meheriuk (1993), in his study of worldwide storage conditions for apples, reported storage at 2.5% O₂ with 4-5% CO₂ at 1 °C for the conservation of Granny Smith apples in Spain.

Effect of treatments on the concentrations of α -farnesene and CTH. 93/94 Harvest Season

Effect of harvest date. In each of the atmospheric conditions, the concentration of α -farnesene was lower in fruits from Harvest 1 than from Harvest 2 for the 3 final removals from cold storage. In contrast, the concentration of CT281 (measured at 281 nm) was greater in fruits from Harvest 1 than from Harvest 2 (Table 2). Anet (1972) has shown that early-harvest fruits do not produce more α -farnesene than late-harvest fruit, but that the former accumulate oxidation products more rapidly. The author concluded that fruits of later harvests have a more efficient antioxidant system.

Effect of storage time. According to Lurie et al. (1989b and 1991) α -farnesene is accumulated in the apple peel until it reaches a maximum at about 3 months of storage and afterwards begins to decline, while the CTH levels continue to increase. This response was observed in results of fruits of conventional cold storage, where the maximum levels of α -farnesene were observed after 2 months of storage, reaching values of 72 nmoles/cm² in fruits from both harvests (Table 2). In all three of the controlled atmospheres, fruits from Harvest 1 developed similarly, with

maximum values of α -farnesene at 2 months, declining progressively until the end of the storage period. In fruits from Harvest 2, the highest concentration was observed at 4 months, thereafter declining continually.

The CT281 level in fruits from Harvest 1, stored in air and in controlled atmospheres, continued to increase through the 4th month, and then decreased slightly at the time of final removal. In fruit stored in controlled atmospheres from Harvest 2, higher levels of CT281 were detected at 4 months than at 2 months, but contrary to the results of Harvest 1, the values did not decrease but stabilized in ULO, and even increased in CA and in LO (Table 2).

Effect of the number of days at ambient temperature. In general, the concentration of α -farnesene had a tendency to decrease when held at room temperatures, although it varied with different storage conditions. The concentration of CT281 was similar at days 1, 4 and 10 at 20°C (Table 2).

Effect of storage conditions. The level of α -farnesene was influenced by the storage conditions. In the air-stored fruits (control), a higher content of α -farnesene was detected than in fruits stored in CA (Table 2). It is possible that the low O₂ concentration in the CA chamber suppressed the biosynthesis of certain enzymes which are required in the pathway of α -farnesene synthesis (Chen et al., 1993). Blanpied and Creasy (1993) suggest that oxygen, directly or indirectly, stimulates the conversion of precursor to α -farnesene. According to these latter authors, the concentration of α -farnesene was significantly higher with 4% O₂ than with 2% O₂, decreasing the effects of low oxygen over prolonged periods of storage.

The concentration of CT281 in apples from Harvest 1 was more elevated in air-storage than in CA. Similar results were obtained by Gallerani et al. (1992). However, apples from Harvest 2 stored in ULO showed a higher level of CT281 than all other apples from either the CA or air-stored conditions. According to Chen et al. (1993), the low level of CTH in controlled atmospheres of low oxygen could be due to the reduction of oxidative reactions and/or to insufficient concentration of the substrate (α -farnesene). But, the results obtained from Harvest 2 (Table 2) where the concentration of α -farnesene in ULO was lowest, and where the O₂ concentration (1%) in the storage chamber was also the lowest of the three storage conditions, contradict this hypothesis.

The effect of the harvest date on the level of CTH may be greater than the effect of storage conditions. Higher levels of CTH have been observed in fruits from early harvests stored at 1.5% O₂ than in fruits from later harvests stored at 3% O₂ (Simcic et al., 1994). In the present work, the effect of the harvest date on the concentrations of CTH was critical for fruits in air-storage, in standard CA (3% O₂) or in LO (2% O₂). But, for fruits stored in ULO (1% O₂) similar values of CTH were obtained from both Harvests 1 and 2 (Table 2).

Relationship between α -farnesene, CTH and development of superficial scald. 93/94 Harvest Season

It is generally believed that superficial scald is produced as a result of the oxidation of α -farnesene to CTH which perturbs the surface layers of cells and causes their disorganization, death and discoloration (Du and Bramlage, 1993).

In general, treatments which inhibit the development of superficial scald also inhibit the production of CTH, possibly because they decrease the synthesis of α -farnesene, or possibly because they slow the auto-oxidation of α -farnesene to CTH. Postharvest applications of DPA (Lurie et al., 1991; Bauchot and John, 1996) or of ethoxyquin (Chen et al., 1990) control scald by inhibiting the oxidation of α -farnesene without affecting the accumulation of this compound. CA, however, acts as much in reducing the level of α -farnesene as in reducing the levels of CTH. High concentrations of CO₂ (Ben-Arie et al., 1993; Blanpied and Creasy, 1993; Chen et al., 1993) or low concentrations of O₂ (Gallerani et al., 1992; Blanpied and Creasy, 1993; Simcic et al., 1994) have been shown to act in this manner. In the present work the concentrations of α -farnesene and of CTH were both lower in fruits from CA than in air-storage. After the third removal these differences were no longer evident, which demonstrates that the effect low oxygen treatments is progressively lost with prolonged storage periods (Blanpied and Creasy, 1993).

Although the results obtained here clearly show an effect of storage conditions on the concentration of CTH, it is difficult to find a direct relationship between the detected values of CTH and the development of scald. Various authors have suggested the possibility that there exists a CTH threshold at which the disorder is induced (Pratella et al., 1989b; Chen et al., 1993). As early as 1972, in his conclusion that the products of auto-oxidation of α -farnesene induced superficial scald, Anet indicated that the severity of scald would depend upon the quantity and timing of the appearance of these products. It is clear that only minor development of scald is observed when the values of CTH are maintained below 2 nmoles/cm² during the entire storage period (standard CA and LO of Harvest 2). But two inconsistencies were observed: a) after 2 months in cold storage there were no symptoms of scald and yet the fruits of the first removal had considerable concentrations of CTH; b) for very different values of CTH similar incidences of superficial scald were observed.

According to Bramlage and Meir (1990) superficial scald consists of a phase of induction and a phase of expression of symptoms. As stated earlier, it appears that the concentration of CTH as measured at a given time is not directly related to the development of scald at that time. What appears more likely is that the value of CTH that can be attained at a given time during cold storage, may trigger a series of processes of oxidation (for example, peroxidation of membrane lipids) which produce the cellular disorganization and ultimate expression of the symptoms of superficial scald.

Effect of treatments on the development of superficial scald. 94/95 Harvest Season

Effect of harvest date. In the 94/95 apple season all fruits were harvested in an immature state including fruits collected at Harvest 1 (Sept. 26, 1994) as well as those from Harvest 2 (Oct. 10, 1994). This early harvest date compared to the commercial harvest date (approximately 1 month or 15 days later, respectively) provoked an elevated development of scald, particularly in fruits from Harvest 1.

The picking date for Harvest 2 in the 94/95 season corresponds with the collection date of Harvest 1 from the 93/94 season (Oct. 10, 1993), at which time the apples were more mature. Consequently, the potential for scald was higher in the 94/95 season as observed in the scald index from both seasons (Tables 1 and 3).

Effect of DPA treatment. The postharvest treatment with DPA considerably reduced the percentage of scald (Table 3), confirming that this antioxidant is extremely effective in controlling scald as demonstrated by others (Smock, 1956; Johnson et al., 1980; Chapon et al., 1987; Dodd et al., 1993; Nardin, 1993). However, the effectiveness of DPA treatment depends on several factors which influence scald development including, importantly, harvest date. DPA treatment was actually very effective in providing a resistance to scald when fruit was collected in a more mature state. Fruit from Harvest 2 presented an intensity of scald between 0 and 1, whereas fruits from Harvest 1 showed scald intensities between 17 and 36 (Table 3). Other authors have observed the lowered efficacy of antioxidant treatments on premature fruit, including the use of DPA (Combrink et al., 1987) and ethoxyquin (Moras et al., 1980). The elevated difference in the scald index obtained from the two harvests indicates that even an interval of a few days in harvest date may considerably influence the vulnerability to scald.

Effect of storage conditions. Similarly as occurred with DPA, CA conditions were capable of reducing scald given that the other factors which affect the disorder were favorable. Following 7 months storage, fruits from Harvest 1 showed a scald intensity of 50 when maintained in standard CA (3%O₂) and of 39 when maintained in LO (2%O₂), while fruit from Harvest 2 presented scald intensities of 33 and 26 for standard CA and LO, respectively (Table 3). We observed that the intensity of scald in standard CA and LO were similar for apples from Harvest 1 treated with DPA and those of Harvest 2 without DPA (scald index near 30), pointing out, once again, the importance of harvest date. These values of a magnitude of 30 are non-acceptable from a commercial point of view, but are not exceptionally high when compared with values obtained from conventional cold storage. Nonetheless, although the development of scald was lower in CA, during extended periods in storage and including fruits from Harvest 2, DPA treatment was necessary to ultimately maintain the disorder within acceptable values (scald index of 4) (Table 3). Nardin (1994) also demonstrated that superficial scald may be managed with storage in CA, given that storage time is not more than 5 months.

Utilization of CA as the only management method to prevent scald is problematic as these fruits, once removed from storage, have a higher probability of developing scald during their shelf life (Johnson et al., 1989). Consequently, many authors recommend the use of anti-scald agents prior to CA storage (Sive and Resnizky, 1989). Other authors have observed that it is more effective to store fruits in very low oxygen (0.7%O₂) without DPA treatment, than to treat with

DPA and store in 1.5%O₂ (Lau, 1990). In conclusion, the indications for DPA application and CA storage depend on various factors and their interactions including storage time, O₂ concentration, the sensitivity of a particular fruit variety and the harvest date.

Effect of treatments on the concentrations of α -farnesene and CTH. 94/95 Harvest Season

Effect of the harvest date. Little differences were observed in levels of α -farnesene and CTH with respect to fruit from different harvest dates. However, we did observe concentration differences with respect to the treatments.

Effect of DPA treatment. The antioxidant treatment with DPA did not influence the concentrations of α -farnesene present in the fruit after 5 days from storage removal. In general we observed an α -farnesene level slightly higher in fruits treated with DPA than those not treated (Table 4). Similar results were obtained by Lurie et al. (1989a) and by Bauchot and John (1996).

DPA treatment considerably reduced the concentration of CTH in fruits from Harvest 2, with reductions in CTH determined at 281 nm (CT281) as well as with those at 258 nm (CT258). In conventional cold storage, the control fruit CTH levels reached values of 8.28 nmoles/cm² at CT281, while fruits treated with DPA did not reach levels greater than 2.56 nmoles/cm². At CT258, maximum values were 12.24 and 5.88 nmoles/cm², in the control and DPA treatments respectively. According to Lurie et al. (1989a) the presence of high levels of α -farnesene and low levels CTH in fruits treated with DPA can be attributed to the strong inhibition of the oxidation of α -farnesene by the antioxidant DPA. However, fruits from Harvest 1 treated with DPA showed CTH levels nearly as great and even greater than control fruit. This may be due to the early harvest date and consequent high vulnerability to scald, such that the DPA rate utilized was insufficient to inhibit the oxidation of α -farnesene. Is possible that fruits are not sensitive to an antioxidant treatment due their immature state.

For Harvest 2 fruits stored in conventional cold conditions the value of the CT258/CT281 ratio was different between control and DPA treatments. For control fruits this ratio ≤ 1.5 , while DPA-treated fruits had ratios close to or greater than 2.0. DPA more greatly reduces CT281 than CT258, so the value of the ratio will increase in treated fruits. Du and Bramlage (1993) also have observed that concentrations measured at each wavelength are not reduced proportionately. In Harvest 1 DPA treatment reduced CTH levels in some cases, so the ratio was more variable, although in general it never increased above 1.5 (Table 4).

Effect of storage conditions. The effects of storage conditions on α -farnesene and CTH concentrations are decreased with longer storage time. This probably explains why the α -farnesene level observed in fruits stored for 7 months in CA conditions was nearly the same as observed in fruits stored for 6 months in air. However, fruit stored in CA conditions had lower CTH levels than in air. Unlike results observed with DPA treatments, CA storage reduced in the same proportion the CT281 and the CT258, so that the CT258/CT281 ratios were similar

as those observed in fruits stored in air. If in addition to controlled atmosphere storage the fruits were also treated with DPA, CTH levels still were reduced in equal proportions, such that the CT258/CT281 ratios did not vary from the value obtained without DPA treatment. This ratio remained ≤ 1.5 .

Relationship between α -farnesene, CTH and the development of superficial scald. 94/95 Harvest Season

As observed in the 93/94 fruit harvests, several contradictory results occurred which challenge the explanations of the relationships between α -farnesene, CTH and the development of superficial scald in apples which have been in cold storage. The levels of α -farnesene and CTH reached their highest values at 3 months of storage and then decreased. (Table 4), while the percentage of scald continued to increase (Table 3). If the products of oxidation of α -farnesene, specifically the CT281, were directly related to the appearance of scald, their content would be greatest at the time of symptom manifestation. However, with the results obtained which confirm those observed by Du and Bramlage (1993) and Anet (1972), it seems evident that there is a gap between the maximum CTH content and the highest incidence of scald.

Another result which appears inconsistent, is that the levels of α -farnesene and CTH are similar or greater in fruits from Harvest 2 than Harvest 1 (Table 4), while the development of scald was much greater in fruits from Harvest 1 (Table 3). Similar inconsistencies led Du and Bramlage (1993) to rethink the role of CTH in the development of scald. According to these authors, the CT258/CT281 ratio is a better indicator of scald than the CT281 values alone, observing that ratios of ≥ 2 were associated with very low incidence or absence of scald. In the present harvest season, the lowest incidences of scald were also associated with ratios of about 2 (Tables 3 and 4). Nevertheless, we observed fruit with CT258/CT281 ratios near 1.5 with very different levels of scald severity. Herrero (1995) also observed that when the difference in the severity of scald is very high, the CT258/CT281 ratio does not vary greatly as a function of variety, harvest date, or storage conditions. Consequently, this ratio cannot be used as an indicator of scald sensitivity in all cases.

In order to explain the relationship between α -farnesene and its oxidation products with superficial scald, different correlations have been calculated between these compounds and the intensity of scald (Table 5). Scald index were negatively correlated with α -farnesene concentrations in apples stored both in air or in controlled atmospheres. Similar results have been obtained by Bauchot and John (1996) in Granny Smith apples treated with different antioxidant products. The correlations between scald index and α -farnesene were significant after long storage periods and the correlation was strongest for extracts from apples stored for 6 months. In order to compare different storage conditions, correlations were higher in air ($r = -0.75$, $P=0.001$) than in controlled atmospheres ($r = -0.47$, $P=0.05$), probably because the concentration of α -farnesene detected in CA was lower than in air. (Data not shown in table 5).

The CT281 were better correlated with scald index than α -farnesene, but in this case the

correlation was positive. Although the scald assessment and the extracts of CT281 made at the same time showed high correlations, the correlations were greater as storage time lengthened before scald assessment. The strongest correlation was obtained between CT281 at 2 month and scald index at 6 months (Table 5). The CT258 at 2 months were also positively correlated with scald index at 4 or 6 months of storage, but determinations at 4 or 6 months were not correlated with scald.

The scald score at 4 or 6 month of storage were correlated with the ratio α -farnesene/CT281 at 2 months while α -farnesene did not. This finding is consistent with that of Bauchot and John (1996). These authors suggested that the proportion of oxidised α -farnesene rather than the α -farnesene itself indicates the sensitivity of the apples to scald.

The ratio between CT258/CT281 were negatively correlated with scald index. This agree with the hypothesis of Du and Bramlage (1993) who suggest the CT281 can be metabolized to CT258, which are inactive in scald development, and to some toxic unkonw compound. If the CT281 diverts to CT258, a high CT258/CT281 ratio should occur and little scald develop.

Although scald development increases with high CT281 levels at the begining of the storage (Table 5), low CT281 levels can also develop scald at the end of the storage (Tables 1 and 2). We interpret that the oxidant activity at the initial period of cold storage is the key to scald susceptibility and the inhibition of α -farnesene oxidation should be reduced at that time to avoid scald development.

It is widely recognized that scald susceptibility decreases with later harvest. However concentrations of α -farnesene present after intervals of storage were not related to harvest date, although CTH concentrations decrease for later harvest. Fruit on the tree might produce a defense mechanism to protect against farresene oxidation, while already harvested fruits keep in cold storage could initiate the oxidation process. Consequently the control practices to avoid scald development must be apply as soon as possible after harvest to increase their effieience.

REFERENCES

- ANET E.F.L.J. 1972. Superficial scald, a fuctional disorder of stored apples. IX. Effect of maturity and ventilation. *J. Sci. Food Agric.*, 23:763-769.
- BAIN, J.M., MERCER, F.J. 1963. The submicroscopic cytology of superficial scald, a physiological disease of apples. *Austral. J. Biol. Sci.*, 16:442-449.
- BAUCHOT, A.D., JOHN, P. 1996. Scald development and the levels of α -farnesene and conjugated triene hydroperoxides in apple peel after treatment with sucrose ester-based coatings in combination with food-approved antioxidants. *Postharvest Biology and Technology.*, 7:41-49.
- BAUCHOT, A.D., JOHN, P., SORIA, Y., RECASENS, I. 1995. Sucrose ester-based coatings formulated with food-compatible antioxidants in the prevention of superficial scald in stored apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120: 491-496.
- BEN ARIE, R., LEVIN, A., ZUTKHI, Y. 1993. Elevated CO₂ for control of superficial scald on CA-stored apples. *Washington State University Tree Fruit Postharvest Journal*, Vol.4. N° 2. 42-43.

- BLANPIED, G.D., CREASY, L.L. 1993. Concentrations of farnesene and conjugated trienes in the skin of Cortland apples stored in 2% and 4% oxygen with 1%, 3%, and 5% carbon dioxide at 2.2°C. Proceedings of the Sixth International Controlled Atmosphere Research Conference, Ithaca, New York. Vol.2. 481-486.
- BRAMLAGE, W.J., MEIR, S. 1990. Chilling injury of crops of temperate origin, p. 37-49. En: *C.Y. Wang (ed.)*. Chilling injury of horticultural crops. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- CHAPON, J.F., NGUYEN-THE, C., BOMPEIX, G. 1987. L'échaudure des pommes. Traitement à l'aide de diphenylamine appliquée par thermonébulisation. *Arb. Fruitière*, n° 398.
- CHEN, P.M., OLSEN, K.L., MEHERIUK, M. 1985. Effect of low-oxygen atmosphere on storage scald and quality preservation of Delicious apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110:16-20.
- CHEN, P.M., VARGA, D.M., MIELKE, E.A., FACTEAU, T.J., DRAKE, S.R. 1990. Control of superficial scald on d'Anjou pears by ethoxyquin: Oxidation of α -farnesene and its inhibition. *J. Food Sci.*, 55:171-175, 180.
- CHEN, P.M., VARGA, R.J., XIAO, Y.Q. 1993. Inhibition of α -farnesene biosynthesis and its oxidation in the peel tissue of d'Anjou pears by low-O₂ / elevated CO₂ atmospheres. *Postharvest Biology and Technology.*, 3:215-223.
- COMBRINK, J.C., STEENKAMP, J., CALITZ, J.F. 1987. Post-harvest application of diphenylamine wettable powder and emulsifiable concentrate on Starking apples. *J. Hort. Sci.*, 62:141-146.
- CURRY, E.A. 1989. Effect of harvest date and oxygen level on storability of late season apple cultivars. Proceedings of the Fifth International Controlled Atmosphere Research Conference, Wenatchee, Washington. Vol.1. 103-109.
- DILLEY, D.R. 1993. Air separator to control superficial scald of apples not chemically treated. *Washington State University Tree Fruit Postharvest Journal*, Vol.4. N° 2. 39-41.
- DODD, M.C., HURNDALL, R.F., LOTZ, E., COMBRINK, J.C. 1993. Thermofogging apples with DPA. *Washington State University Tree Fruit Postharvest Journal*, Vol.4. N° 2. 21-23.
- DU, Z., BRAMLAGE, W. J. 1993. A modified hypothesis on the role of conjugated trienes in superficial scald development on stored apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:807-813.
- FRANCILE, A.S., BATTAGLIA, M. 1992. Control de escaldadura superficial en peras Beurré d'Anjou y en manzanas Granny Smith. *Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale*, 86: 397-410.
- GALLERANI, G., FOLCHI, A., PRATELLA, G.C., CAZZOLA, P. 1992. Superficial scald and change in concentration of hydroperoxides in apples stored under ultra-low oxygen at varying CO₂ rates. *Ital. J. Food Sci.*, 1:39-45.
- HERRERO, A. 1995. Nivells d' α -farnasè i hidroxiperòxids en pomes i peres tractades amb productes antioxidants per evitar l'escaldat superficial. Trabajo final de carrera. E.T.S.E.A. Lleida. 121pp.
- HUELIN, F.E., COGGIOLA, I.M. 1968. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. IV. Effect of variety, maturity, oiled wraps and diphenylamine on the concentration of α -farnesene in the fruit. *J. Sci. Food Agric.*, 19:297-301.
- HUELIN, F.E., COGGIOLA, I.M. 1970. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. V. Oxidation of α -farnesene and its inhibition by diphenylamine. *J. Sci. Food Agric.*, 21:44-48.
- HUELIN, F.E., MURRAY, K.E. 1966. α -Farnesene in the natural coating of apples. *Nature (London)*. 210:1260-1261.

- INGLE, M., D'SOUZA, M.C. 1989. Physiology and control of superficial scald of apples: A review. *HortScience*, 24:28-31.
- JOHNSON, D.S., ALLEN, J.G., WARMAN, T.M. 1980. Post-harvest application of diphenylamine and ethoxyquin for the control of superficial scald on Bramley's Seedling apples. *J. Sci. Food Agric.*, 31:1189-1194.
- JOHNSON, D.S., PRINJA, J., SMITH, S.M. 1989. The use of controlled atmosphere (CA) conditions for the control of bitter pit and superficial scald in Bramley's Seedling apples. *Proceedings of the Fifth International Controlled Atmosphere Research Conference, Wenatchee, Washington. Vol.1.* 157-168.
- LAU, O.L., 1990. Efficacy of diphenylamine, ultra-low oxygen, and ethylene scrubbing on scald control in Delicious apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115:959-961.
- LAU, O.L., YASTREMSKI, R. 1993. The use of 0,7% storage oxygen to attenuate scald symptoms in Delicious apples: effect of apple strain and harvest maturity. *Acta Horticulturae*, 326:183-189.
- LIDSTER, P.D., LOUGHEED, E.C., McRAE, K.B. 1987. Effects of sequential low-oxygen and standard controlled atmosphere storage regimens on apple quality. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112:787-793.
- LITTLE, C.R., FARAGHER, J.D., TAYLOR, H.J. 1982. Effects of initial oxygen stress treatments in low oxygen modified atmosphere storage of Granny Smith apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 107:320-323.
- LURIE, S., KLEIN, J., BEN ARIE, R. 1989a. Physiological changes in diphenylamine-treated Granny Smith apples. *Isr. J. Bot.*, 38:199-207.
- LURIE, S., MEIR, S., BEN ARIE, R. 1989b. Preharvest ethephon sprays reduce superficial scald of Granny Smith apples. *HortScience*, 24:104-106.
- LURIE, S., KLEIN, J.D., BEN ARIE, R. 1991. Prestorage heat treatment delays development of superficial scald on Granny Smith apples. *HortScience*, 26:166-167.
- MANSEKA, V.S., VASILAKAKIS, M. 1993. Effect of stage of maturity, postharvest treatments and storage conditions on superficial scald and quality of apples. *Acta Horticulturae*, 326:213-224.
- MEHERIUK, M. 1993. CA Storage conditions for apples, pears and nashi. *Proceedings from the Sixth International Controlled Atmosphere Research Conference, Ithaca, New York. Vol.2.* 819-854.
- MEIR, S., BRAMLAGE, W.J. 1988. Antioxidant activity in Cortland apple peel and susceptibility to superficial scald after storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113:412-418.
- MORAS, P., CHAPON, J.F., FERRE, G. 1980. L'échaudure de la pomme Granny Smith. Influence d'une prématuration avant l'entreposage et d'un traitement à l'éthoxyquine. *Arb. Fruitière*, 314:49-51.
- MURRAY, K.E., HUELIN, F.E., DAVENPORT, J.B. 1964. Occurrence of α -farnesene in the natural coating of apples. *Nature (London)*. 204:80.
- NARDIN, C. 1993. Chemical control of scald on apples. *Washington State University Tree Fruit Postharvest Journal*, Vol.4. N° 2. 24-26.
- NARDIN, C. 1994. Scald control on apples without use of chemicals. *Acta Horticulturae*, 368: 417-428.
- NARDIN, C., CASERA, C. 1988. Influenza di atmosfere con bassi tenori di O₂ (LO) sul "riscaldamento" e "imbrunimento del cuore" e sul mantenimento dell'acidità di alcune varietà di mele. *Coltura del melo verso gli anni '90. Conference, Cordeons, Italy, 18-20 Dec. 1986 (coordinator J. Youssef).* 1988, 121-133. Florence, Italy; Società Orticola Italiana.

PATTERSON, M.E., 1959. The relationship of factors affecting apple scald to the fundamental nature of the disorder. Ph. D. Thesis. Purdue University.

PATTERSON, M.E., 1993. Harvest and CA storage regime for arresting scald in Granny Smith apples. *Washington State University Tree Fruit Postharvest Journal*, Vol.4. N° 2. 58-68.

PRATELLA, G.C., FOLCHI, A., BRIGATI, S. 1989a. Low oxygen atmosphere and CA storage effects on senescence and diseases of two apple varieties grown in Italy. *Proceedings of the Fifth International Controlled Atmosphere Research Conference, Wenatchee, Washington*. Vol.1. 207-214.

PRATELLA, G.C., GALLERANI, G., BUDINI, R.A. 1989b. The etiology of apple common scald. *Proceedings of the International Conference on Technical Innovation in Freezing and Refrigeration of Fruit and Vegetables, Davis, California*, p. 62.

SFAKIOTAKIS, E., NIKLIS, N., STAVROULAKIS, G., VASSILIADIS, T. 1993. Efficacy of controlled atmosphere and ultra low oxygen - low ethylene storage on keeping quality and scald control on Starking Delicious apples. *Acta Horticulturae*, 326:191-202.

SIMCIC, M., VIDRIH, R., HRIBAR, J., PLESTENJAK, A. 1994. Prediction and prevention of apple superficial scald. *Acta Horticulturae*, 368: 646-651.

SIVE, A., RESNIZKY, D. 1989. Thermal fogging with DPA and ethoxyquin. *Proceedings of the Fifth International Controlled Atmosphere Research Conference, Wenatchee, Washington*. Vol.1. 457-464.

SMOCK, R.M. 1956. A promising new method of scald control. *Proc. N. Y. State Hortic. Soc.*, 101:102-104.

SORIA, Y., RECASENS, I. 1997. El escaldado superficial de la manzana. *ITEA*, Vol. 93 V N° 1: 49-64.

TRUTER, A.B., COMBRINK, J.C., CALITZ, F.J. 1993. Control of superficial scald of apples by ultra-low and stress levels of oxygen as an alternative to diphenylamine. *Proceedings of the Sixth International Controlled Atmosphere Research Conference, Ithaca, New York*. Vol.2. 470-480.

TRUTER, A.B., COMBRINK, J.C., BURGER, A.S. 1994. Control of superficial scald in Granny Smith apples by ultra-low and stress levels of oxygen as an alternative to diphenylamine. *J. Hortic. Sci.*, 69:581-587.

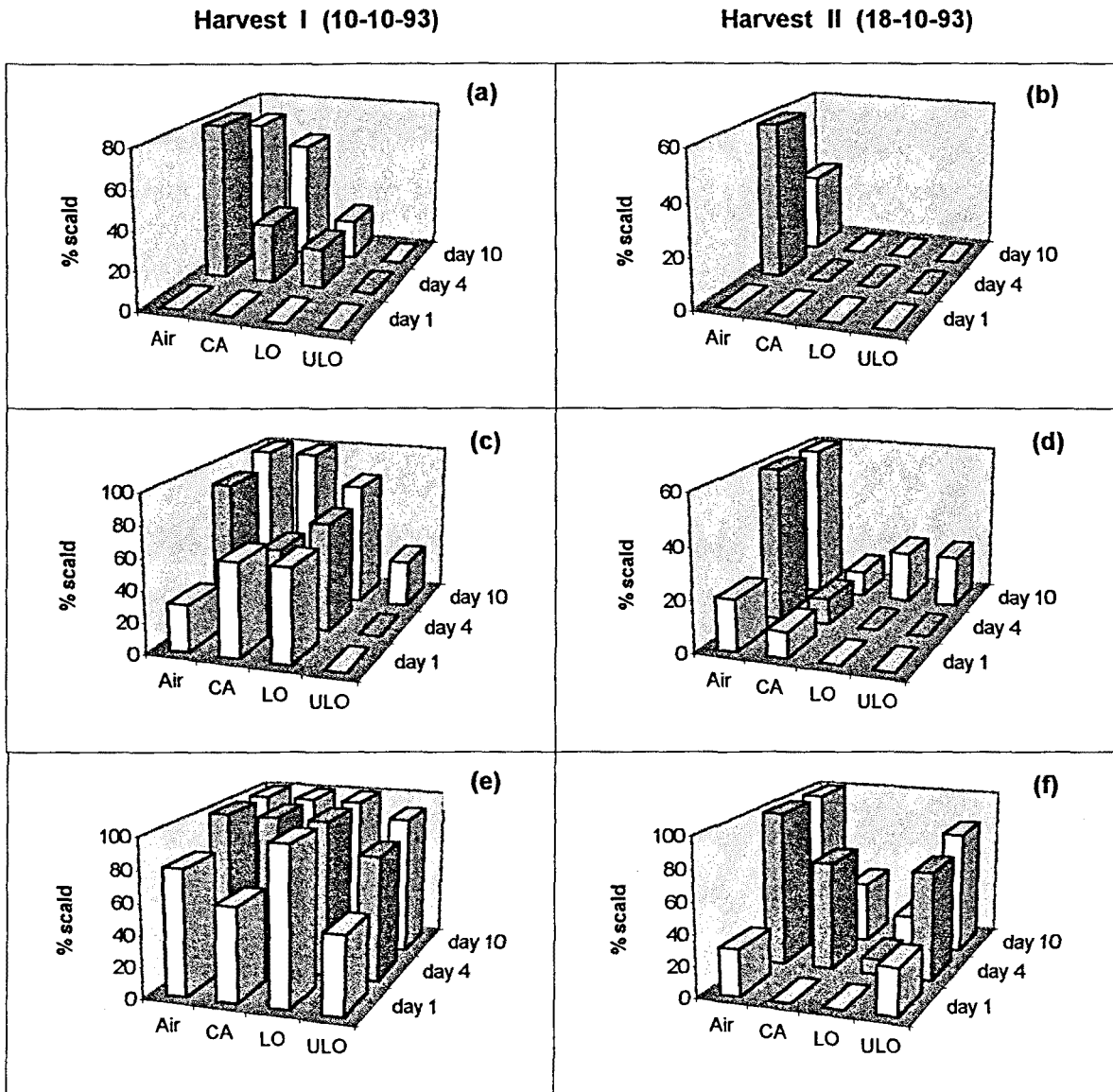


Figure 1. Effect of storage conditions and harvest date in superficial scald incidence (% fruit affected) on "Granny Smith" apples removed from 0 °C after 4 months (figs. a and b), 6 months (figs. c and d) or 8 months (figs. e and f) and kept at ambient temperature (20 °C) for 1, 4 and 10 days. Controlled atmosphere storage conditions: CA (3% O₂/ 3% CO₂); LO (2% O₂ / 2% CO₂); ULO (1% O₂/ 1% CO₂).

Table 1. Effect of storage conditions and harvest date in superficial scald severity on "Granny Smith" apples removed at different intervals from 0 °C storage and kept at ambient temperature (20 °C) for 1, 4 and 10 days. Scald index = [(1 x % lightly affected fruit) + (2 x % medium affected fruit) + (4 x severely affected fruit)] / 4.

Storage conditions	Storage time at 0 °C (months)	Scald Index					
		Days at ambient temperature (20 °C) after cold storage					
		1	4	10	1	4	10
		<i>Harvest 1 (10-10-93)</i>			<i>Harvest 2 (18-10-93)</i>		
air (control)	2	0	0	0	0	0	0
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		0	0	0	0	0	0
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		0	0	0	0	0	0
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		0	0	0	0	0	0
air (control)	4	0	40	22.5	0	17.5	10
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		0	7.5	22.5	0	0	0
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		0	5	5	0	0	0
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		0	0	0	0	0	2.5
air (control)	6	7.5	45	40	5	17.5	17.5
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		15	17.5	37.5	2.5	2.5	2.5
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		15	20	27.5	0	0	5
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		0	0	7.5	0	0	5
air (control)	8	22.5	52.5	30	7.5	25	37.5
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		22.5	60	55	0	17.5	15
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		32.5	30	50	0	2.5	5
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		12.5	30	32.5	7.5	17.5	30

Table 2. Effect of storage conditions and harvest date in α -farnesene and triene conjugated hydroperoxides (CT281) concentrations on "Granny Smith" apples removed at different intervals from 0 °C storage and kept at ambient temperature (20 °C) for 1, 4 and 10 days.

Storage conditions	Storage time at 0 °C (months)	α -farnesene (nmol / cm ²)			Conjugated trienes (CT281) (nmol / cm ²)		
		Days at ambient temperature (20 °C) after storage					
		1	4	10	1	4	10
<i>Harvest 1 (10-10-93)</i>							
air (control)	2	72.24	71.64	38.09	7.19	4.6	7.03
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		36.36	39.93	25.93	2.74	3.34	2.85
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		43.85	48.35	27.44	3.32	2.71	2.71
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		26.39	39.19	26.52	1.18	1.8	1.58
air (control)	4	42.25	35.47	34.35	8.67	10.79	7.27
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		31.33	39.82	38.58	4.8	4.5	5.68
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		37.3	40.37	29.27	5.35	5.79	6.07
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		31.84	43.23	-	2.85	3.71	6.04
air (control)	6	25.18	18.27	24.32	8.02	8.09	5.78
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		26.79	29.82	22.63	4.5	4.71	5.4
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		38.63	28.97	22	6.65	4.38	4.73
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		26.2	27.18	25.88	2.89	3.68	3.93
air (control)	8	18.67	17.06	19.39	6.43	6.62	3.83
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		12.77	9.94	9.77	3.89	2.98	2.73
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		23.77	18.94	13.31	4.53	3.98	2.8
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		31.73	25.65	14.96	3.09	3.19	2.88
<i>Harvest 2 (18-10-93)</i>							
air (control)	2	72.2	72.24	77.68	0.83	0.9	1.13
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		29.71	43.26	44.53	0.38	0.51	0.67
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		27.71	34.59	37.3	0.36	0.2	0.81
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		26.42	32	32.49	0.74	1.27	1.27
air (control)	4	58.67	59.85	27.97	2.78	2.4	2.19
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		51.99	45.05	26.87	0.77	0.44	0
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		47.2	42.08	38.5	0.26	0.66	0
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		34.38	43.73	31.66	3.92	3.78	3.82
air (control)	6	37.25	30.22	26.58	1.74	2.19	2.14
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		48.69	34.18	36.41	0.83	0.68	1.61
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		43.85	43.61	42.08	0.77	1.33	1.79
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		31.12	31.77	27.41	3.55	3.36	4.72
air (control)	8	25.24	22.08	20.58	1.9	1.49	1.68
CA (3%O ₂ /3%CO ₂)		39.2	27.53	19.98	1.83	1.62	1.84
LO (2%O ₂ /2%CO ₂)		44.85	24.48	19.38	0.77	1.08	1.18
ULO (1%O ₂ /1%CO ₂)		26.07	31.02	24.56	3.76	4.12	1.18

Table 3. Effect of storage conditions, harvest date and diphenylamine treatment (DPA, 1500 ppm) in superficial scald severity on "Granny Smith" apples removed at different intervals from 0 °C storage and kept 5 additional days at ambient temperature (20 °C). Scald index = [(1 x lightly affected fruit) + (2 x % medium affected fruit) + (4 x severely affected fruit)] / 4.

Storage conditions	Storage time at 0 °C (months)	Scald Index			
		no DPA	DPA	no DPA	DPA
		<i>Harvest 1 (26-09-94)</i>		<i>Harvest 2 (10-10-94)</i>	
air	3	83	17	26	0
	4	86	29	59	0
	5	90	30	54	0
	6	96	36	55	1
CA (3% O ₂ / 3% CO ₂)	7	50	31	33	4
LO (2% O ₂ / 2% CO ₂)	7	39	34	26	4

Table 4. Effect of storage conditions, harvest date and diphenylamine treatment (DPA, 1500 ppm) in α farnesene and triene conjugated hydroperoxides (CT281 and CT258) concentrations on "Granny Smith" apples removed at different intervals from 0 °C storage and kept 5 additional days at ambient temperature (20 °C).

Storage conditions	Storage time at 0 °C (months)	α -farnesene (nmol/cm ²)		Conjugated trienes (nmol/cm ²)				Ratio CT258/CT281	
				CT281		CT258			
		no DPA	DPA	no DPA	DPA	no DPA	DPA	no DPA	DPA
<i>Harvest 1 (26-09-94)</i>									
air	3	36.01	53.45	8.52	5.87	10.95	9.29	1.285	1.582
	4	26.2	23.78	7.86	4.19	10.78	6.2	1.371	1.479
	5	19.83	33.28	5.96	9.14	9.83	10.82	1.649	1.183
	6	14.7	31.25	4.73	8.05	5.52	11.38	1.167	1.413
CA (3% O ₂ /3% CO ₂)	7	13.84	17.47	2.73	2.03	3.87	2.97	1.417	1.463
LO (2% O ₂ /2% CO ₂)	7	23.19	28.58	3.25	4.72	4.38	5.9	1.347	1.25
<i>Harvest 2 (10-10-94)</i>									
air	3	45.92	34.62	8.28	1.48	12.24	2.8	1.478	1.891
	4	19.59	20.99	6.3	1.41	8.14	3.02	1.292	2.141
	5	15.84	31.65	6.33	2.56	9.66	5.88	1.526	2.296
	6	24.5	27.5	6.85	1.98	9.14	5.44	1.334	2.747
CA (3% O ₂ /3% CO ₂)	7	20.69	26.45	4.15	2.5	6.06	3.6	1.46	1.44
LO (2% O ₂ /2% CO ₂)	7	23.01	27.93	3.96	2.08	5.81	3.11	1.467	1.495

Table 5. Correlations (r) of chemical parameters with superficial scald severity of "Granny Smith" apples removed at different intervals from 0 °C storage in air or in controlled atmosphere. Scald index = [(1 x lightly affected fruit) + (2 x % medium affected fruit) + (4 x severely affected fruit)] /

Chemical parameters	Storage time at 0 °C (months)	Scald Index		
		Months in storage		
		2	4	6
α -farnesene ⁽¹⁾	2	NS	NS	NS
	4		-0.39 *	-0.41 **
	6			-0.59 ***
CT 281 ⁽¹⁾	2	0.58 ***	0.76 ***	0.81 ***
	4		0.56 ***	0.67 ***
	6			0.58 ***
CT 258 ⁽²⁾	2		0.66 **	0.65 **
	4		NS	NS
	6			NS
α -farnesene / CT 281 ⁽¹⁾	2	NS	-0.36 *	-0.47 **
	4		NS	-0.35 *
	6			-0.42 **
CT 281 / CT 258 ⁽²⁾	2		-0.62 **	-0.66 **
	4		-0.48 *	-0.55 *
	6			-0.66 **

NS, *, **, *** Not significant or significant at P = 0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

(1) n = 40 (from 400 apples)

(2) n = 16 (from 160 apples)

III CONCLUSIONES

DISCUSION GENERAL PREVIA A LAS CONCLUSIONES

Manifestación del escaldado superficial en manzanas Granny Smith. Efecto de los tratamientos poscosecha y de la conservación en atmósferas controladas sobre el desarrollo de la alteración

En manzanas Granny Smith el escaldado superficial se manifestó después de un periodo de frigoconservación de al menos 2 meses de duración. En las cuatro campañas frutícolas de las que se presentan resultados, la alteración nunca se puso de manifiesto mientras los frutos estaban en la cámara, sino que aparecía una vez que se sacaban a temperatura ambiente. Una pauta también habitual de la alteración es que cuanto más prolongada fuera la frigoconservación, más pronto se manifestaban los síntomas a la salida de la cámara. Asimismo, la incidencia de la alteración aumentaba conforme se alargaba en periodo de conservación, siendo menor a los 4 que a los 6 meses, y en esta salida menor que a los 8 meses.

Este comportamiento en la manifestación del escaldado indica que existe una clara relación tiempo-temperatura en la expresión de los síntomas, lo cual es típico de la denominada enfermedad del frío (Saltveit y Morris, 1990), también conocida como "chilling injury". La mayoría de estudios acerca del escaldado reflejan que aparece a temperaturas por debajo de 15 °C (Watkins et al., 1995). Adicionalmente, en el presente trabajo se comprobó que los síntomas son más severos a 0 °C que a 4 °C (Bauchot et al., 1995a). También se ha visto que la incidencia es mucho mayor cuando los frutos son recolectados en un estado de madurez prematuro, coincidiendo por tanto con el momento en que los tejidos son más sensibles al frío (Paull, 1990). El efecto principal del frío en los cultivos sensibles es la alteración de la estructura de los lípidos de membrana (Raison, 1974), lo cual lleva indudablemente a una pérdida de compartimentación y una alteración de la permeabilidad celular. La interrupción de la frigoservación a las 4 semanas de su inicio, para la aplicación de baños poscosecha, provocó un cierto control del escaldado (Bauchot et al., 1995a). Es posible que la exposición durante unas horas a temperatura ambiente reorganizara en parte la estructura celular y permitiera la eliminación de metabolitos tóxicos acumulados durante la estancia en frío, que de otro modo hubiesen llevado a la manifestación de los síntomas. Sin embargo, para evitar la enfermedad del frío es importante iniciar el calentamiento antes de que los daños sean irreversibles (Wang, 1989). Quizás esta sea la causa de que el calentamiento aplicado a las 6 semanas no presentara la misma eficacia (Bauchot et al., 1995a).

La aplicación sobre el fruto de un recubrimiento a base de sucroésteres, como los compuestos "Semperfresh" y "Nu Coat Flo", provocó un efecto variable sobre el control del escaldado superficial. Los mejores resultados con Semperfresh se obtuvieron en la primera campaña frutícola, en los frutos bañados a las 6 semanas de la recolección, después de haber permanecido ese periodo de tiempo en la cámara frigorífica. En esos frutos el escaldado se controló totalmente después de 4 meses de frigoconservación, tanto a la salida de la cámara, como durante el periodo de vida útil. El resto de tratamientos con este compuesto no fue muy efectivo. Con la aplicación de un antioxidante de uso alimentario (palmitato de ascorbilo, butilhidroxitolueno, galato de propilo o α -tocoferol) se obtuvo un control similar o incluso

inferior al del recubrimiento solo. Comparando los antioxidantes ensayados entre sí, el más efectivo fue el tratamiento con palmitato de ascorbilo más Semperfresh y también palmitato de acorbilo con galato de propilo más Semperfresh. Asimismo, otros autores habían señalado un control limitado del escaldado superficial con la utilización de antioxidantes de uso alimentario, naturales o sintéticos (Anet y Coggiola, 1974; Blanpied, 1993; Kallay, 1994).

El tratamiento con CaCl_2 mejoró los resultados respecto a los obtenidos con el recubrimiento Semperfresh, con o sin antioxidantes, siendo el más efectivo de los baños poscosecha, exceptuando la difenilamina (DPA). El calcio fue especialmente efectivo en la primera campaña, con la aplicación efectuada a las 6 semanas de la recolección. En cambio, en la segunda campaña, donde no se ensayó la aplicación de forma retrasada en calcio, el grado de afección de escaldado alcanzado después de 6 meses de frigoconservación fue muy elevado.

En la segunda campaña ya se observó que la conservación en atmósfera controlada (AC) estándar evitaba satisfactoriamente la alteración, alcanzando resultados equiparables a los del tratamiento con DPA. Por ello en las dos siguientes campañas se ensayó la conservación en AC, tanto estándar como con niveles reducidos de O_2 , como sistema de control del escaldado. En la tercera campaña la conservación en AC ratificó los resultados de la anterior. Se observó además que con la atmósfera LO ("Low Oxygen"), con un 2% de O_2 en la cámara, y con ULO ("Ultra Low Oxygen") con un 1%, el control era mayor aunque dependiente del estado de madurez del fruto en el momento de la recolección. Pese a ejercer un buen control, la conservación en AC con bajo O_2 no fue capaz de frenar la aparición de síntomas típicos de escaldado después de 8 meses de conservación, estimándose pues que probablemente fuese necesaria además la adición de DPA para un control total en almacenamientos prolongados. Este tratamiento (DPA + AC estándar o LO) fue ensayado en la cuarta campaña, donde se obtuvieron resultados variables también en función de la fecha de recolección.

Hasta la fecha, el tratamiento con DPA en manzanas se considera el más efectivo para el control del escaldado superficial. Este antioxidante ha sido ensayado en numerosas ocasiones y en diversas variedades, dando generalmente resultados positivos (Smock, 1956; Johnson et al., 1980; Chapon et al., 1987; Nardin, 1993). Asimismo, en el presente estudio se mostró el más favorable, comparado con los diversos baños poscosecha ensayados (primera y segunda campaña). Asimismo, redujo considerablemente la incidencia en frutos tratados con DPA y conservados en las cámaras de AC estándar o LO, respecto a los conservados en dichas atmósferas sin tratar (cuarta campaña). Sin embargo, al igual que ocurrió en los demás tratamientos, la eficacia del DPA estuvo totalmente ligada a la fecha de recolección de los frutos, mostrándose mucho más efectivo en las recolecciones más tardías.

Efecto de los tratamientos poscosecha y de la conservación en atmósferas controladas sobre diversos procesos fisiológicos en la manzana Granny Smith

La producción de etileno obtenida después de la recolección y después de la conservación frigorífica en manzanas Granny Smith lleva a pensar que esta variedad tiene un comportamiento poco climatérico. En los frutos climatéricos el proceso de maduración se caracteriza por un aumento brusco seguido de un descenso en esta hormona, que va acompañado además de una subida en la tasa respiratoria. Estas subidas bruscas se conocen

generalmente como pico climatérico. En nuestro estudio se observó que después de la recolección no se iniciaba inmediatamente la producción de etileno ni la respiración, sino que debían transcurrir varios días para poder detectar niveles muy bajos de etileno y CO_2 . Además, cuanto más temprana era la recolección, más se retrasaba la producción. En otros estudios realizados en manzana Granny Smith se ha comprobado que madura antes el fruto que permanece más tiempo en el árbol (Recasens et al., 1987), mientras que las manzanas procedentes de recolecciones tempranas presentan dificultades para madurar correctamente, adquiriendo una calidad inferior cuando maduran (Kanyas y Karaçali, 1990). Este comportamiento es propio de la variedad Granny Smith y no se observa en otras variedades como por ejemplo Red Winesap (Miret, 1992)

El comportamiento poco climatérico de la variedad Granny Smith también quedó de manifiesto en su pauta respiratoria después de la frigoconservación. En las tres campañas en que se evaluó la respiración, la curva de producción de CO_2 , representativa de la respiración del fruto, no presentó prácticamente en ningún caso el pico climatérico.

Adicionalmente a este comportamiento poco climatérico, es probable que la variedad Granny Smith presente sensibilidad al frío, especialmente en estados prematuros de madurez. La mayoría de las plantas sensibles al frío no producen normalmente cantidades significativas de etileno, excepto durante el proceso de maduración (Wang, 1989). En la variedad Granny Smith las producciones suelen ser bajas, comparada con otras variedades de manzana. Sin embargo, la producción de etileno en las plantas sensibles al frío se ve enormemente estimulada por la exposición a temperaturas críticas (Wang, 1989). Asimismo, la variedad Granny Smith tiene una clara respuesta a las bajas temperaturas, de manera que el frío induce la activación del metabolismo del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), de la enzima ACC oxidasa y del etileno (Larrigaudière y Vendrell, 1993). En el presente trabajo se comprobó además que el efecto de la frigoconservación está muy relacionado con la fecha de cosecha. En una recolección precoz, la estancia en frío provocó un aumento rápido de la producción de etileno justo a la salida de la cámara, mientras que en una recolección más tardía este aumento se vio retrasado. En otras variedades de manzana ocurre justamente lo contrario, es decir, la estimulación de la producción de etileno es más rápida en las recolecciones tardías. La respuesta del fruto almacenado en AC también estuvo estrechamente ligada a la fecha de recolección. La inhibición de la producción de etileno obtenida como consecuencia de la AC no fue tan evidente en los frutos de la cosecha temprana, en los que se detectó el pico de etileno a los pocos días de la salida de la cámara, al igual que en frío normal. En cambio, en los frutos de la recolección tardía conservados en AC la producción de etileno se vio fuertemente inhibida y no se detectó pico climatérico.

Es probable que en manzanas Granny Smith en estado prematuro (y presumiblemente más sensibles al frío) la producción de etileno después de la frigoconservación se dé como respuesta a la baja temperatura. En un estado más avanzado de madurez y por tanto menos sensible, la respuesta al frío no es tan evidente, produciéndose niveles bajos de etileno dado el carácter poco climatérico de la variedad. Esto también explicaría el diferente efecto de la AC sobre la producción de etileno según el estado de madurez del fruto. La AC es capaz de inhibir la producción de etileno cuando el fruto se recolecta suficientemente maduro como para evitar la sensibilidad al frío, pero mientras esté prematuro es mayor el efecto de la baja temperatura, que el de la AC, incluso con muy baja concentración de O_2 en la cámara.

La aplicación poscosecha de un recubrimiento semipermeable a los gases (como los compuestos Semperfresh y Nu Coat Flo) también redujo la producción de etileno. Esta inhibición se producía tanto al aplicar Semperfresh solo, como al aplicarlo juntamente con un antioxidante. El recubrimiento alteró asimismo la composición interna de O_2 y CO_2 (Bauchot et al., 1995b). La evolución de estos dos gases durante el periodo de vida útil del fruto fue distinto: mientras que el primero se mantuvo relativamente constante, el segundo aumentó considerablemente. Por ello se consideró que en Granny Smith, el recubrimiento Semperfresh es más permeable al O_2 que al CO_2 , a diferencia de lo que ocurre en otras variedades. La modificación de estos dos gases pudo ser la causa de la alteración en el metabolismo del etileno, al disminuir el contenido de ACC en el fruto y al inhibir la actividad de la enzima ACC oxidasa. En los frutos recubiertos solamente con Semperfresh el contenido de ACC pudo disminuir por la elevada concentración interna de CO_2 , que inhibe la actividad de la enzima ACC sintetasa (Bufler, 1984; Chavez-Franco y Kader, 1993; Mathooko et al., 1995). En los frutos recubiertos con Semperfresh más un antioxidante, la actividad de la ACC oxidasa pudo bajar por la limitación del nivel de O_2 en el fruto, especialmente como respuesta al antioxidante. A pesar de la menor producción de etileno, en los frutos recubiertos se detectó un contenido interno significativamente mayor que en los no recubiertos, debido a la acumulación de este gas en el interior del fruto por el efecto barrera del recubrimiento (Bauchot et al., 1995b).

El tratamiento con $CaCl_2$ también disminuyó la producción de etileno, pero apenas afectó al contenido de ACC y a la actividad de la ACC oxidasa. Por ello, la menor producción de etileno se atribuyó a una mejora de la estabilidad de las membranas por parte del calcio (Ben-Arie et al., 1982; Poovaiah, 1986).

A diferencia de todos los tratamientos anteriores, la aplicación de DPA apenas afectó a la producción de etileno, después de 4 y 6 meses de frigoconservación, presentado unos niveles de etileno equiparables a los obtenidos en los frutos control.

Estos resultados demuestran que el mecanismo de acción de los diversos tratamientos ensayados (baños poscosecha con DPA, con un antioxidante de uso alimentario y/o un recubrimiento sucroéster o con $CaCl_2$, o bien, conservación en AC) sobre la producción de etileno es claramente distinto.

Efecto de los tratamientos poscosecha y de la conservación en atmósfera controlada sobre los parámetros cualitativos en manzana Granny Smith

La aplicación de un recubrimiento con o sin antioxidante, el tratamiento con $CaCl_2$ o la conservación en AC mejoraron, respecto al control, la calidad en manzanas de la variedad Granny Smith.

El recubrimiento con Semperfresh o con Nu Coat Flo mejoró la retención de parámetros cualitativos como el peso, la firmeza, la acidez, y el contenido en sólidos solubles, dependiendo de la campaña frutícola, del producto aplicado y del momento de aplicación. De los diversos estudios realizados en distintas variedades de manzana con recubrimientos sucroésteres se desprende que la eficacia de este tipo de productos es variable, en función de factores como la especie y la variedad (Van Zyl et al., 1987), el estado de madurez del fruto (Kerbel et al., 1989) y el momento de aplicación del producto (Smith y Stow, 1984), de manera semejante



a lo ocurrido en el presente trabajo. La adición al recubrimiento Semperfresh de un antioxidante en general disminuyó la calidad de los frutos, aunque la respuesta no fue la misma para todos los antioxidantes. El momento de aplicación de los tratamientos también afectó a la calidad. Los frutos tratados después de permanecer en la cámara frigorífica un periodo de 6 semanas en general presentaron niveles más bajos de firmeza, acidez, y sólidos solubles, respecto a los tratados inmediatamente después de la recolección. Sin embargo, el tratamiento con CaCl_2 fue más efectivo a las 6 semanas, ya que aplicado de forma retrasada fue capaz de retener la firmeza y la acidez, no presentando este efecto aplicado justo después de la cosecha.

La conservación en AC, especialmente con concentraciones bajas en O_2 (LO y ULO) mantuvo la calidad de los frutos al retener la pérdida de firmeza, acidez y sólidos solubles. Diversos autores ya habían apuntado una mejora de la firmeza (Lidster et al., 1981; Lau, 1990; Lau y Yastremski, 1993) y de la acidez (Goffings y Herregods, 1994) en otras variedades de manzana conservadas asimismo en AC con bajo O_2 . Respecto al contenido de sólidos solubles, el efecto de la reducción del O_2 en la cámara no siempre es tan claro y aunque en el presente trabajo los valores más elevados se obtuvieron en las atmósferas LO y ULO, otros autores no encontraron diferencias significativas por el nivel de O_2 mantenido en la cámara (Graell et al., 1997).

A diferencia de los tratamientos anteriores, el tratamiento con DPA no varió los parámetros de calidad respecto al control, como tampoco había alterado el metabolismo del etileno, después de 4 y 6 meses de frigoconservación.

Mecanismo de acción de los tratamientos poscosecha y de la conservación en atmósferas controladas en el desarrollo del escaldado superficial. Origen de la alteración

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede establecer que no existe una clara relación entre el etileno y el desarrollo de escaldado. La diferente producción de etileno obtenida como consecuencia de la aplicación de los diversos tratamientos poscosecha en las dos primeras campañas no representó una variable importante para explicar la varianza debida al escaldado, según el análisis multivariante realizado. Los tratamientos más efectivos para evitar la aparición del escaldado fueron la aplicación de DPA y la conservación en AC. En el primero tanto la producción de etileno como el contenido de etileno interno fue muy semejante al de los frutos control (Bauchot et al., 1995b). En el segundo en cambio, la producción de etileno fue inhibida. Adicionalmente, otros tratamientos que redujeron la producción de etileno y aumentaron su contenido interno, como el recubrimiento con Semperfresh, no frenaron la alteración.

Pese a que el **contenido interno de O_2 y CO_2** después de 4 meses de frigoconservación presentó una elevada correlación con la incidencia de escaldado superficial (Bauchot et al., 1995b), es difícil establecer una relación causal entre ambos parámetros. En los frutos recubiertos se modificó la atmósfera interna, pero no así en los frutos control, presentándose incidencias de escaldado elevadas en ambos casos. En los frutos tratados con DPA, con una atmósfera interna semejante al control, la incidencia de escaldado fue notablemente menor.

Respecto a los parámetros de calidad, el análisis multivariante mostró que existe una elevada correlación negativa entre **la firmeza y la acidez** de los frutos a la salida de la cámara y la

incidencia de escaldado en ese mismo momento. Según esta correlación, los frutos que se mantienen más firmes y más ácidos serían también los menos escaldados. Esta hipótesis no deja de ser controvertida teniendo en cuenta que los frutos más inmaduros en el momento de la recolección, y por tanto más firmes y más ácidos, son los más susceptibles. Sin embargo, podría explicarse si se tiene en cuenta que algunos parámetros que habitualmente se utilizan para determinar el estado de madurez del fruto en la cosecha, como la firmeza, la acidez, el contenido en sólidos solubles, el color o la concentración de etileno interno, no son indicativos de la susceptibilidad al escaldado. Así, Meir y Bramlage (1988) compararon la incidencia de escaldado en frutos recolectados en la misma fecha, pero de la parte interna y externa del árbol, los cuales presentaban valores muy distintos de etileno interno, color y sólidos solubles en la cosecha, pero después de un periodo de frigoconservación todos se escaldaban por igual.

Por tanto el “factor cámara”, entendiendo como tal la relación tiempo-temperatura, afectaría a los parámetros de madurez en un sentido contrario a como lo hace el fruto todavía unido al árbol, en cuanto a la resistencia a la alteración, y en un sentido contrario también al avance del escaldado en la cámara. Por ello, cabe pensar que la retención de la calidad en cámara podría utilizarse como mecanismo de acción para evitar el escaldado. Además, las manzanas Granny Smith recolectadas en estado inmaduro tienen una aptitud peor para la conservación, sufriendo mayores pérdidas de acidez en cámara respecto a cosechas más tardías (Kanyas y Karaçali, 1990), lo cual podría explicar en parte su mayor susceptibilidad a escaldarse. Sin embargo, hay que considerar que el DPA, siendo un tratamiento muy efectivo para el escaldado, no mantuvo la calidad después de 4 y 6 meses de conservación, mientras que otros tratamientos, como Semperfresh más α -tocoferol, con buenos índices de calidad, no fueron capaces de evitar la alteración. Por ello es difícil establecer una relación de causa-efecto entre la retención de la calidad y el control del escaldado, sino más bien se puede decir que hay simplemente una correlación entre el escaldado y estos parámetros, cuya retención puede ayudar a disminuir la incidencia, pero no puede controlarla. Por tanto es probable que los procesos bioquímicos que conducen a la maduración del fruto no estén relacionados con los procesos bioquímicos implicados en el escaldado.

Para explicar el origen bioquímico del escaldado superficial, durante las dos últimas campañas se determinaron los compuestos tradicionalmente implicados en dicho origen, es decir, el α -farnaseno y sus compuestos de oxidación, conocidos como **compuestos trieno conjugados (CTH)**. Estos compuestos se han relacionado con el origen de la alteración desde los años 60 (Huelin y Coggiola, 1968), basándose por completo en la elevada correlación estadística entre el contenido de CTH y la incidencia de escaldado. Sin embargo, a partir de los años 90 su papel en el escaldado se puso de nuevo en juicio, debido a algunas incongruencias en los coeficientes de correlación entre distintas especies de CTH y la incidencia de escaldado (Du y Bramlage, 1993).

En la tercera campaña los frutos se recolectaron en dos fechas distintas, antes y durante la época de recolección comercial, pero la concentración de α -farnaseno obtenida en las dos cosechas fue muy similar. En cambio, el contenido de compuestos CTH, medidos a una longitud de onda igual a 281 nm (denominados CT281), fue muy inferior en la segunda cosecha. El efecto de la cámara, tanto AC estándar, como LO y ULO, se hizo notar disminuyendo los contenidos de α -farnaseno y de CT281. En la campaña siguiente, los frutos también se recolectaron en dos fechas distintas, siendo ambas anteriores a la fecha de recolección comercial. Quizás por ello, los contenidos de α -farnaseno y CTH fueron

semejantes en ambos casos, no detectándose el efecto de la fecha de cosecha. Los frutos si respondieron en cambio al tratamiento con DPA, aunque sólo los de la segunda cosecha, disminuyendo tanto los CT281, como los compuestos determinados a 258 nm (CT258). En esta campaña el potencial de escaldado *a priori* era muy alto, por las fechas de recolección tempranas, de manera que el desarrollo de escaldado fue muy elevado, según lo previsto. La menor incidencia, que se presentó en los frutos de la segunda cosecha conservados en atmósfera normal o controlada, pero tratados con DPA, coincidió con los valores más bajos de CT281 y CT258, pero con distintos valores del ratio CT258/CT281. Según Du y Bramalge (1993), este ratio está más correlacionado con la alteración que el nivel de CT281. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo están en desacuerdo con esa afirmación.

Es evidente que los tratamientos antiescaldantes tienen un efecto sobre los contenidos de α -farnaseno y de CTH en el fruto. En general estos tratamientos al ser antioxidantes, inhiben la producción de CTH, bien porque disminuyen la síntesis de α -farnaseno que es O_2 -dependiente (Blanpied y Creasy, 1993), bien porque frenan su oxidación. Tratamientos poscosecha con DPA inhiben la oxidación del α -farnaseno sin afectar la concentración de este compuesto (Bauchot y John, 1996). Las atmósferas controladas, en cambio, actúan reduciendo el nivel de α -farnaseno y en consecuencia el de los compuestos CTH (Gallerani et al., 1992; Simcic et al., 1994). Este efecto de las cámaras se observó también en el presente estudio, en las distintas condiciones de AC ensayadas. Si la inhibición del α -farnaseno y/o de los CTH se diera solamente como consecuencia del tratamiento antiescaldante, la relación entre los CT281 y el escaldado sería más dudosa. Sin embargo, la concentración de CT281 en el fruto es también completamente dependiente de la fecha de recolección. En las cosechas tempranas su contenido después de 2 meses de frigoconservación se fijó en torno a 8 nmol / cm², mientras que en los frutos cosechados en fecha comercial se situó por debajo de 1 nmol / cm², para esa misma salida de cámara. También es un hecho remarcable que frutos conservados en aire y frutos conservados en ULO, presentaran a los 2 meses niveles muy semejantes de CT281 (alrededor de 0,8 nmol / cm²) y alcanzarán a los 8 meses índices de escaldado también muy iguales. Estos resultados implican una relación entre los CT281 detectados al principio de la conservación y la incidencia final de escaldado, que se confirmó mediante el elevado coeficiente de correlación obtenido ($r = 0,81$, significativo para $P = 0,001$). Por tanto, la correlación en principio existe, pero queda por determinar si entre ambos parámetros hay una relación causa-efecto, o no, como en el caso de los parámetros de calidad. Sigue también por aclarar porqué incluso con niveles muy bajos de CT281 (0,4 nmol / cm² en AC estándar y en LO a los 2 meses de conservación) las manzanas acaban manifestando la alteración. Se ha especulado que estos compuestos no son los responsables directos de la alteración, sino que podrían ser los que inician una reacción en cadena que llevaría a la manifestación de los síntomas. Por eso cabe preguntarse si es necesario inhibir totalmente la formación de estos compuestos para evitar el escaldado o si es posible que existan además otros factores implicados en la alteración.

En base a los parámetros bioquímicos arriba comentados, a continuación se tratará de razonar la diversa eficacia en el control del escaldado obtenida con los tratamientos ensayados. La aplicación de **Semperfresh** que resultó más eficaz para controlar el escaldado (aplicación a las 6 semanas, primera campaña) retuvo también elevados valores de firmeza y acidez. No es anómalo que el tratamiento con recubrimientos sucroésteres tenga un efecto más positivo si se aplica de forma retrasada o incluso después de la conservación (Smith y Stow, 1984), consiguiendo de esta forma alargar el periodo de vida útil del fruto. Sin embargo, la eficacia

del recubrimiento depende de la madurez del fruto en el momento de su aplicación, pudiendo perder su efecto beneficioso en función de la misma. Así, Kerbel et al. (1989) observaron que en manzanas Granny Smith de cosechas tempranas la incidencia de escaldado se acentuó por la aplicación de Semperfresh. En el presente trabajo la respuesta al tratamiento también se vio supeditada a la edad del fruto. En la primera campaña, los frutos habían sido recogidos en un estado de madurez algo más avanzado que en la siguiente, de manera que el desarrollo de escaldado alcanzado fue menor (tanto en el control como en los tratamientos). Siguiendo con lo discutido en el apartado sobre los efectos fisiológicos de los tratamientos, los frutos más maduros serían también menos sensibles al frío y por tanto más resistentes a la alteración. En estos frutos, una estancia de 6 semanas en la cámara sin tratamiento probablemente no provocó daños a nivel de membrana irreperables, de manera que, el efecto del calentamiento originado por la salida de la cámara para realizar el tratamiento, más el del producto en sí, que crea una atmósfera interna con un alto nivel de CO₂ capaz de inhibir diversos procesos fisiológicos, y más la mejor retención de la calidad gracias a la aplicación retrasada, se sumaron para conseguir frenar totalmente la alteración. Sin embargo, en la segunda campaña, con frutos más jóvenes y más sensibles, no se obtuvieron buenos resultados, ni en el tratamiento inmediato, ni aún menos en el de las 6 semanas, cuando quizás, los daños eran ya irreversibles. Además, en algunos estudios se ha comprobado que la aplicación de recubrimientos sucroésteres puede dificultar el proceso natural de maduración en los frutos tratados (Meheriuk y Lau, 1985; Van Zyl y Wagner, 1986), limitando con ello aún más el control.

El control del escaldado obtenido por los **antioxidantes de uso alimentario** aplicados junto el recubrimiento Semperfresh pudo estar en función de su actividad antioxidante. El antioxidante α -tocoferol mantuvo su actividad, después de 4 y 6 meses de frigoconservación, a juzgar por la inhibición de la producción de etileno y de CO₂ que provocó. Quizás por este retraso en el proceso de la maduración, con este antioxidante se obtuvieron buenos resultados a nivel cualitativo, pero a la vez presentó un grado de afección muy elevado de escaldado. La actividad antioxidante del galato de propilo, que también es notable en manzanas (Ko y Song, 1994), tampoco fue capaz de evitar el escaldado, al igual que el butilhidroxitolueno. El palmitato de ascorbilo fue algo más efectivo que los anteriores y su eficacia mejoró aplicándolo juntamente con galato de propilo. El palmitato de ascorbilo también retuvo su actividad antioxidante después de 4 y 6 meses de conservación, disminuyendo el contenido interno de O₂ respecto al control y al DPA (Bauchot et al., 1995b).

Estos antioxidantes de uso alimentario, pese a mantener su actividad durante toda la frigoconservación, no fueron capaces de detener la aparición del escaldado. En este trabajo no se estudió la aplicación de antioxidantes alimentarios sin recubrimiento, de manera que no puede conocerse como hubieran actuado en ese caso. La bibliografía existente en este tema indica que este tipo de antioxidantes ejerce un control limitado sobre el escaldado superficial (Wills y Scott, 1977; Dodd et al., 1993). La adición de un recubrimiento tipo sucroéster puede mejorar su eficacia, según se desprende de algunos autores (Little y Barrand, 1989). Este fue asimismo nuestro planteamiento inicial al diseñar los ensayos, bajo la hipótesis de que una acción conjunta de un recubrimiento que modifica la atmósfera interna del fruto, junto un antioxidante, podría evitar las reacciones de oxidación presuntamente implicadas en el origen bioquímico del escaldado. Por los datos obtenidos se ve que los resultados no fueron los esperados, y que el DPA, cuya actividad antioxidante no se prolongó más allá de los 4 meses de conservación, tuvo una eficacia mucho mayor. La aplicación conjunta del antioxidante más el recubrimiento, provocó una atmósfera interna en el fruto diferente a la obtenida con la

aplicación de DPA. Cabe pensar que la actividad del antioxidante se viese modificada por el efecto del recubrimiento, manteniéndola durante más tiempo gracias a la atmósfera interna creada, que en último término sería la responsable de los procesos fisiológicos que tuvieron lugar en los frutos. Sin embargo, por los datos presentados, no puede deducirse si la actividad antioxidante se iniciaba nada más realizar el tratamiento o si empezaba más tarde, después de haber permanecido unos días el fruto en la cámara. En este último caso, es posible que en el momento en que empezara su actividad antioxidante fuese ya demasiado tarde para frenar los procesos fisiológicos implicados en el desarrollo del escaldado. Este mecanismo de acción más lento de los antioxidantes de uso alimentario, tanto aplicados solos como con un recubrimiento, podría explicar la falta de eficacia del tratamiento. La eficacia también está en función de la solubilidad del antioxidante, siendo más efectivos para controlar el escaldado los antioxidantes liposolubles que los hidrosolubles (Barden y Bramlage, 1994). Por ello los antioxidantes ensayados tenían un carácter liposoluble y su adición junto con el recubrimiento pretendía también facilitar su disolución en el agua y asegurar así su correcta aplicación. Pese a ello, su actividad antioxidante no inhibió los procesos implicados en el escaldado, y quizás se hubiesen obtenido mejores resultados utilizando como portador de los antioxidantes otro tipo de compuestos, como aceites (Dodd et al., 1993) o como etanol (Chellew y Little, 1995), con los que se han obtenido resultados más satisfactorios.

Comparando la actividad antioxidante del DPA con la de los antioxidantes de uso alimentario ensayados, parece ser que el primero actúa mucho más rápidamente inhibiendo la formación de CT281 (Bauchot y John., 1996), posiblemente al principio de la conservación, lo cual favorece un efectivo control del escaldado superficial. Sin embargo, al no perdurar su efecto antioxidante, no mejora otros parámetros cualitativos como la firmeza, acidez y sólidos solubles después de un periodo largo de conservación, como tampoco afecta a la actividad fisiológica del fruto, en concreto la producción de etileno y la respiración. En cambio, los antioxidantes alimentarios parecen tener una acción más lenta, lo que impide que haya un buen control del escaldado, pero son capaces de mejorar los parámetros cualitativos al retardar el proceso de maduración.

Dentro de los tratamientos químicos que se muestran efectivos para reducir los daños por frío, está la aplicación poscosecha de CaCl_2 (Wang, 1989). Los tratamientos poscosecha con calcio reducen significativamente los daños por frío en distintas especies, incluidas las manzanas (Scott y Wills, 1975). Si como se dijo al principio, el escaldado superficial es una manifestación de daños por frío. El control obtenido con el calcio podría explicarse en ese sentido. Así, la eficacia del tratamiento con CaCl_2 se puede relacionar con la mejora de la senescencia de las membranas celulares, de la misma manera que se relacionó con la inhibición de la producción de etileno. El calcio también ayudó a mejorar la calidad, en concreto la firmeza y la acidez, cuando se aplicó a las 6 semanas de la conservación. La retención de los parámetros de calidad obtenida con ese tratamiento coincidió con la máxima eficacia sobre el desarrollo de escaldado, siendo este otro posible mecanismo de acción del calcio para evitar la alteración

Si el escaldado superficial es o se expresa como una enfermedad del frío (Watkins et al., 1995) y considerando que la conservación en AC constituye otro método para disminuir los daños por frío (Wang, 1989), el mecanismo de la AC para controlar el escaldado superficial puede ir en el sentido de retrasar la senescencia y mantener la calidad, al evitar en general reacciones de oxidación por el mantenimiento del bajo nivel de O_2 en la cámara. Sin embargo, según Wang (1989), la efectividad de la AC depende de la especie vegetal en que se aplica, de la

concentración de O_2 y CO_2 , de la duración del tratamiento y de la temperatura de almacenamiento. Esto explicaría: (a) el mejor mantenimiento de la calidad y la menor incidencia de escaldado en los frutos conservados en atmósferas con bajo nivel de O_2 , (b) la manifestación de los síntomas después de 6 y 8 meses de conservación, pero no antes, y (c) el peor control del escaldado en manzanas Granny Smith prematuras conservados en AC, respecto a las no prematuras. Ya se razonó al principio de esta discusión, que los frutos prematuros son más sensibles al frío, haciendo disminuir la eficacia de un tratamiento antiescaldante. Si el efecto de la reducción del O_2 es menor que el de la baja temperatura, puede que no se frenen reacciones de oxidación implicadas en el escaldado, manifestándose más severamente los síntomas. Por otro lado, no se puede olvidar el papel de los CT281 en la incidencia de la alteración. Frutos recolectados en fecha comercial y conservados en ULO, y por tanto en principio poco propensos a escaldarse, alcanzaron niveles de escaldado comparables a los obtenidos en los frutos conservados en atmósfera normal. Ya se destacó en párrafos anteriores que ambos frutos presentaron niveles semejantes de CT281 a los 2 meses de conservación. No se conoce la causa del elevado contenido de CT281 de los frutos mantenidos en ULO, por encima de los detectados en los frutos conservados en LO y AC estándar, pero lo que es evidente es que esos frutos se escaldaron mucho más que estos últimos. Por tanto, la capacidad de la AC para reducir los niveles de CT281 al principio de la conservación, también se considera un factor importante para evitar la alteración.

Es indiscutible que el tratamiento con DPA es muy efectivo para controlar el escaldado, siendo el producto más utilizado a nivel comercial para combatir esta alteración. La eficacia del tratamiento ha sido asignada a su poder antioxidante para evitar las reacciones de oxidación implicadas en el origen bioquímico. En concreto, parece inhibir la formación de CTH. En el presente estudio se ha obtenido que los parámetros de calidad, la producción de etileno, la tasa de respiración y los contenidos internos de etileno, O_2 y CO_2 , después de 4 y 6 meses de frigoconservación, fueron muy semejantes entre los frutos tratados con DPA y los frutos control. Por ello, estos parámetros quizás implicados en el mecanismo de acción de los otros tratamientos ensayados, no son aplicables al mecanismo de acción del DPA para controlar el escaldado. Anteriormente se ha comentado que la concentración de CT281 a los 2 meses de frigoconservación está altamente correlacionada con la incidencia de escaldado superficial. Por ello pensamos que este antioxidante evita la oxidación al principio de la conservación, cuando puede considerarse que es el momento crítico para la posterior aparición de los síntomas. Después baja su actividad antioxidante, o bien se degrada el producto, y sin embargo continúa siendo efectivo. Es curioso que solamente los antioxidantes de tipo amino sean capaces de inhibir eficazmente el escaldado. Según Anet y Coggiola (1974), un amplio rango de antioxidantes (tipo amino, fenólicos, o con grupos sulfuro) pueden inhibir la oxidación del α -farnaseno *in vitro*, pero únicamente los antioxidantes tipo amino pueden inhibirla *in vivo*. Por tanto ¿este antioxidante químico es más potente y capaz de actuar en condiciones de baja temperatura y oscuridad, frente a otros antioxidantes naturales, propios de los productos vegetales, que actuarían mejor a elevadas temperaturas y con luz, por ser estas condiciones favorables para la oxidación? ¿es realmente su acción antioxidante la que frena la alteración, o podría ser la unión de la acción antioxidante más la protección de la amina frente a la senescencia?. Se ha comprobado que el tratamiento con DPA más la conservación en AC suman sus efectos en el control de escaldado, siguiendo o no la misma pauta para ello. El DPA junto con la AC pueden inhibir eficazmente al principio de la conservación reacciones de oxidación que inevitablemente llevan a la aparición de escaldado; adicionalmente pueden retrasar la senescencia y ralentizar la degeneración de las membranas celulares por efecto del

frío, aunque todo ello no dejan de ser hipótesis, y se requerirían más estudios para poder confirmarlo.

Después de esta discusión, tenemos que decir que seguimos sin saber cuál es el origen o el factor implicado en el desarrollo del escaldado superficial. Pensamos que esta relacionado con más de un factor, ya que los daños por frío se manifiestan en los frutos por la alteración de numerables procesos (Wang, 1989). No cabe duda de que inhibiendo la formación de CTH, se reduce la incidencia de la alteración, pero tampoco con ello se puede asegurar el éxito total de un tratamiento y el control total del escaldado, exigido para la comercialización de los frutos para su consumo en fresco. Los factores más importantes que predisponen a la alteración son una fecha de recolección temprana y la estancia en frío, unido a que la variedad sea sensible. El frío puede actuar modificando las membranas celulares, que serían más sensibles a la toxicidad ocasionada quizás por los CTH o por sus metabolitos. Pero en variedades de manzana resistentes, o en frutos recolectados tardíamente, la alteración no se manifiesta o se manifiesta menos severamente. Por ello, las temperaturas de conservación no afectan por igual a todas las variedades de manzana, existiendo unas más sensibles que otras, como por ejemplo la variedad Granny Smith. La sensibilidad al frío en las manzanas Granny Smith está más relacionada con su estado de madurez, que con la variedad en sí. Es decir, la variedad de manzanas Granny Smith es sensible al frío dependiendo de la edad fisiológica del fruto, como ocurre con otras especies como el tomate. En manzanas Granny Smith, las cosechas tempranas son mucho más sensibles, de manera que al entrar en la cámara rápidamente se induce la alteración, quizás por la congregación de diversos procesos oxidativos que es necesario frenar a tiempo. Por ello es conveniente en la variedad Granny Smith, y en otras que presenten su misma sensibilidad al frío, una recolección más tardía, cuando el fruto es capaz de soportar las temperaturas críticas. Asimismo se puede evitar la degradación de las membranas mediante calentamientos previos o durante la conservación, o simplemente conservando el fruto a temperaturas algo más elevadas, por encima de las críticas, lo cual es factible en las cámaras de AC.

El factor que determina la sensibilidad al frío en función de la edad fisiológica del fruto resta por conocer. Por lo discutido anteriormente, no es el contenido de α -farnaseno en el fruto, que es igual o más elevado en cosechas tardías. Tampoco parámetros de madurez, como la firmeza, la acidez, y el contenido en sólidos solubles, indican la susceptibilidad a la alteración. El contenido en antioxidantes naturales en el momento de la recolección se ha correlacionado con la incidencia de escaldado (Barden y Bramlage, 1994), pero como se ha comprobado en nuestros resultados, este tipo de antioxidantes no actúan de igual manera cuando son aplicados superficialmente, antes de la entrada en cámara. Actualmente, la línea de investigación del origen bioquímico del escaldado se está dirigiendo hacia los componentes de la cutícula del fruto, donde se manifiestan los síntomas, y en concreto se estudian compuestos lipídicos y fenólicos (Abdallah et al., 1997), ésteres de ácidos grasos (Whitaker, 1998), y especies de oxígeno activo (Rao et al., 1998), como posibles implicados en la alteración.

Respecto a pautas futuras para seguir estudiando el origen bioquímico de la alteración y así evitar su desarrollo se podrían considerar las siguientes líneas generales:

- estudiar la evolución del fruto en el árbol y ver como cambia su sensibilidad al frío en función de su edad fisiológica.

- estudiar los procesos fisiológicos y bioquímicos que llevan a ofrecer resistencia al frío en los frutos maduros, especialmente a nivel de membrana celular.
- estudiar la actividad antioxidante del DPA para conocer sobre qué procesos actúa concretamente.
- estudiar los cambios fisiológicos que tienen lugar en el fruto durante el primer mes de almacenamiento en frío, comparándolos con otros frutos conservados a temperatura ambiente.

Referencias bibliográficas

- ABDALLAH, A.Y., GIL, M.I., BIASI, W., MITCHAM, E.J. 1997. Inhibition of superficial scald in apples by wounding: changes in lipids and phenolics. *Postharvest Biol. Technol.*, 12:203-212.
- ANET E.F.L.J., COGGIOLA, I.M. 1974. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. X. Control of α -farnesene autoxidation. *J. Sci. Food Agric.*, 25:293-298.
- BARDEN, C.L., BRAMLAGE, W.J. 1994. Relationships of antioxidants in apple peel to changes in α -farnesene and conjugated trienes during storage, and to superficial scald development after storage. *Postharvest Biol. and Technol.*, 4:23-33.
- BAUCHOT, A.D., JOHN, P. 1996. Scald development and the levels of α -farnesene and conjugated triene hydroperoxides in apple peel after treatment with sucrose ester-based coatings in combination with food-approved antioxidants. *Postharvest Biol. Technol.*, 7:41-49.
- BAUCHOT, A.D., JOHN, P., SORIA, Y., RECASENS, I. 1995a. Sucrose ester-based coatings formulated with food-compatible antioxidants in the prevention of superficial scald in stored apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120:491-496.
- BAUCHOT, A.D., JOHN, P., SORIA, Y., RECASENS, I. 1995b. Carbon dioxide, oxygen, and ethylene changes in relation to the development of scald in Granny Smith apples after cold storage. *J. Agric. Food Chem.*, 43:3007-3011.
- BEN-ARIE, R., LURIE, S., MATOO, A.K. 1982. Temperature-dependent inhibitory effects of calcium and spermine on ethylene biosynthesis in apple discs correlate with changes in microsomal membrane microviscosity. *Plant Sci. Lett.*, 24:239-247.
- BLANPIED, G.D. 1993. Effect of repeated postharvest applications of butylated hydroxytoluene (BHT) on storage scald of apples. *Proceedings of the Sixth International Controlled Atmosphere Research Conference, Ithaca, New York. Vol.2.* 466-469.
- BLANPIED, G.D., CREASY, L.L. 1993. Concentrations of farnesene and conjugated trienes in the skin of Cortland apples stored in 2% and 4% oxygen with 1%, 3%, and 5% carbon dioxide at 2.2C. *Proceedings of the Sixth International Controlled Atmosphere Research Conference, Ithaca, New York. Vol.2.* 481-486.
- BUFLER, G. 1984. Ethylene-enhanced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in ripening apples. *Plant Physiol.*, 75:192-195.
- CHAPON, J.F., NGUYEN-THE, C., BOMPEIX, G. 1987. L'échaudure des pommes. Traitement à l'aide de diphenylamine appliquée par thermonébulisation. *Arb. fruitière*, N° 398.
- CHAVEZ-FRANCO, S.H., KADER, A.A. 1993. Effects of CO₂ on ethylene biosynthesis in "Bartlett" pears. *Postharvest Biol. Technol.*, 3:183-190.

- CHELLEW, J.P., LITTLE, C.R. 1995. Alternative methods of scald control in Granny Smith apples. *Journal of Horticultural Science*, 70:109-115.
- DODD, M.C., BESTER, R., LOTZ, E., COMBRINK, J.C. 1993. Alternative antioxidants for control of superficial scald. *Washington State University Tree Fruit Postharvest Journal*, Vol.4. N° 2. 33-34.
- DU, Z., BRAMLAGE, W. J. 1993. A modified hypothesis on the role of conjugated trienes in superficial scald development on stored apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118(6): 807-813.
- GALLERANI, G., FOLCHI, A., PRATELLA, G.C., CAZZOLA, P. 1992. Superficial scald and change in concentration of hydroperoxides in apples stored under ultra-low oxygen at varying CO₂ rates. *Ital. J. Food Sci.*, 1:39-45.
- GOFFINGS, G., HERREGODS, M. 1994. The influence of the storage conditions on some quality parameters of Jonagold apples. *Acta Horticulturae*, 368:37-42.
- GRAELL, J., LARRIGAUDIÈRE, C., VENDRELL, M. 1997. Effect of low-oxygen atmospheres on quality and superficial scald of Topred apples. *Food Science and Technology International*, 3:203-211.
- HUELIN, F.E., COGGIOLA, I.M. 1968. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. IV. Effect of variety, maturity, oiled wraps and diphenylamine on the concentration of α -farnesene in the fruit. *J. Sci. Food Agric.*, 19:297-301.
- JOHNSON, D.S., ALLEN, J.G., WARMAN, T.M. 1980. Post-harvest application of diphenylamine and ethoxyquin for the control of superficial scald on Bramley's Seedling apples. *J. Sci. Food Agric.*, 31:1189-1194.
- KALLAY, T. 1994. New measures against superficial scald of apples. *Acta Horticulturae*, 368:220-224.
- KAYNAS, K., KARAÇALI, I. 1990. A study on maturity standards and storage potential of Granny Smith variety of apples grown in Yalova. *Doga Tr. J.of Agriculture and Forestry*, 14:465-474.
- KERBEL, E.L., MITCHELL, F.G., KADER, A.A., MAYER, G. 1989. Effects of Semperfresh coating on postharvest life, internal atmosphere modification and quality maintenance of Granny Smith apples. *Proceedings of the Fifth International Controlled Atmosphere Research Conference, Wenatchee, Washington*. Vol.1. 247-252.
- KO, J.Y., SONG, K.-C., 1994. Ethylene forming enzyme (EFE) activity and antioxidant effect of some chemicals and plant extracts. *Journal of the Korean Society for Horticultural Sciences*, 35:48-56.
- LARRIGAUDIÈRE, C., VENDRELL, M. 1993. Cold-induced activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in rewarmed "Granny Smith" apples: Consequences on ripening. *Scientia Horticulturae*, 55:263-272.
- LAU, O.L. 1990. Tolerance of three apple cultivars to ultra-low levels of oxygen. *HortScience*, 25:1412-1414.
- LAU, O.L., YASTREMSKI, R. 1993. The use of 0.7% storage oxygen to attenuate scald symptoms in "Delicious" apples: effect of apple strain and harvest maturity. *Acta Horticulturae*, 326:183-189.
- LIDSTER, P.D., McRAE, K.B., SANDFORD, K.A. 1981. Responses of McIntosh apples to low oxygen storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:159-162.
- LITTLE, C.R., BARRAND, L. 1989. Seasonal orchard and storage conditions affecting storage scald in pome fruit. *Proceedings of the Fifth International Controlled Atmosphere Research Conference, Wenatchee, Washington*. Vol.1. 177-184.
- MATHOOKO, F.M., KUBO, Y., INABA, A., NAKAMURA, R. 1995. Characterization of the regulation of ethylene biosynthesis in tomato fruit by carbon dioxide and diazocyclopentadiene. *Postharvest Biol. Technol.*, 5:221-233.

- MEHERIUK, M., LAU, O.L. 1985. Effect of two polymeric coatings on fruit quality in "d'Anjou" and "Bartlett" pears. Proceedings of the Fourth National Controlled Atmosphere Research Conference. Dept. of Hort., North Carolina State Univ., Raleigh.
- MEIR, S., BRAMLAGE, W.J. 1988. Antioxidant activity in Cortland apple peel and susceptibility to superficial scald after storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113:412-418.
- MIRET, F. 1992. Estudio de la fisiología del crecimiento, maduración y conservación frigorífica de las variedades de manzana "Red Winesap y Granny Smith". Tesis Doctoral. E.T.S.E.A. Universidad de Lleida (España).
- NARDIN, C. 1993. Chemical control of scald on apples. *Washington State University Tree Fruit Postharvest Journal*, Vol.4. N° 2. 24-26.
- PAULL, R.E. 1990. En : C. Y. Wang (ed.) *Chilling injury of horticultural crops*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- POOVAIAH, B.W. 1986. Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. *Food Technology*, 40:86-89.
- RAISON, J.K. 1974. En: *Mechanisms of Regulation of Plant Growth* (R.L. Bielski, A.R. Ferguson, and M.M. Cresswell, eds.), *Bulletin 12, Roy. Soc. New Zealand, Wellington, N.Z.*
- RAO, M.V., WATKINS, C.B., BROWN, S.K., WEEDEN, N.F. 1998. Active oxygen species metabolism in "White Angel" x "Rome Beauty" apple selections resistant and susceptible to superficial scald. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123:299-304.
- RECASENS, D.I., MIRET, F., SALAS, J., VENDRELL, M. 1987. Crecimiento y maduración de la manzana Granny Smith. VII Reunión de la S.E.F.V., Oviedo. Ref. IV-12, p. 112.
- SALTVEIT, M.E., MORRIS, L.L. 1990. Overview of chilling injury of horticultural crops. p. 3-15. En : C. Y. Wang (ed.) *Chilling injury of horticultural crops*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- SCOTT, J.K., WILLS, R.B.H. 1975. *HortScience*, 10:75
- SIMCIC, M., VIDRIH, R., HRIBAR, J., PLESTENJAK, A. 1994. Prediction and prevention of apple superficial scald. *Acta Horticulturae*, 368: 646-651.
- SMITH, S.M., STOW, J.R. 1984. The potential of a sucrose ester coating material for improving the storage and shelf-life qualities of "Cox's Orange Pippin" apples. *Ann. Appl. Biol.*, 104:383-391.
- SMOCK, R.M. 1956. A promising new method of scald control. *Proc. N. Y. State Hortic. Soc.*, 101:102-104.
- VAN ZYL, H.J., TORMANN, H., VON MOLLENDORFF, L.J. 1987. Effect of wax treatment on fruit quality of pears, apples, plums and nectarines after cold storage. *Deciduous Fruit Grower*, May, 169-172.
- VAN ZYL, H.J., WAGNER, J.W. 1986. Keeping quality and shelf life of Bon Chretien pears as affected by calcium, Alar and Semperfresh. *Acta Horticulturae*, 194:223-228.
- WANG, CH. Y. 1989. Chilling injury of fruits and vegetables. *Food Reviews International*, 5:209-236
- WATKINS, C.B., BRAMLAGE, W.J., CREGOE, B.A. 1995. Superficial scald of Granny Smith apples is expressed as a typical chilling injury. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120:88-94.
- WHITAKER, B.D. 1998. Phenolic fatty-acid esters from the peel of "Gala" apples and their possible roles in the resistance to superficial scald. *Postharvest Biol. Technol.*, 13:1-10.
- WILLS, R.B.H., SCOTT, J.K. 1977. Evaluation of the use of butylated hydroxytoluene to reduce superficial scald of apples. *Scientia Hort.*, 6:125-127.

CONCLUSIONES FINALES

① Los tratamientos con antioxidantes de uso alimentario y/o el recubrimiento sucroéster "Semperfresh", disueltos en agua y aplicados mediante baños poscosecha, ejercen un escaso control y en ocasiones pueden llegar a agravar la incidencia de escaldado superficial. El tratamiento con CaCl_2 es más efectivo que la aplicación de los recubrimientos sucroésteres para reducir el desarrollo de la alteración, en las condiciones ensayadas. La conservación en atmósfera controlada (AC), especialmente con baja concentración de oxígeno, evita la aparición de escaldado hasta los 4 meses de frigoconservación y reduce considerablemente la incidencia en almacenamientos más prolongados. Las condiciones de conservación más adecuadas han resultado ser 2% de oxígeno y 2% de dióxido de carbono. Se corrobora la eficacia del tratamiento con difenilamina (DPA) para controlar el desarrollo del escaldado en manzanas Granny Smith.

② En general, es son más efectivos los baños poscosecha aplicados inmediatamente después de la recolección. La aplicación a las 6 semanas, después de permanecer los frutos en la cámara frigorífica durante ese periodo de tiempo, son ineficaces para combatir el desarrollo de escaldado. Adicionalmente, la interrupción de la frigoconservación para aplicar el tratamiento, modifica los parámetros de calidad en los frutos, reduciendo la firmeza, la acidez y el contenido en sólidos solubles.

③ El mecanismo de acción de los diversos tratamientos ensayados para reducir la incidencia de escaldado probablemente es distinto. Los tratamientos actúan de diferente manera sobre el metabolismo del fruto. La conservación en AC reduce la producción de etileno respecto a la atmósfera normal. El recubrimiento "Semperfresh" aplicado solo o junto con un antioxidante modifica la permeabilidad a los gases, y también inhibe la producción de etileno. Ambos tratamientos actúan sobre el metabolismo del etileno modificando los niveles de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y/o la actividad de la enzima ACC oxidasa. El CaCl_2 inhibe la producción de etileno pero no altera el contenido de ACC ni la actividad de la ACC oxidasa. El tratamiento con DPA no afecta a la producción de etileno ni a los compuestos citados.

④ Los tratamientos que retrasan el proceso de maduración, al inhibir la producción de etileno, retrasan también el descenso de los parámetros de calidad durante la conservación en frío. Concretamente, la aplicación del recubrimiento con o sin antioxidante, o la conservación en AC, mejoran la firmeza y la acidez. Las condiciones AC permiten además retener el contenido en sólidos solubles, especialmente en las cámaras con un 2% o con un 1% de O_2 . El tratamiento con DPA no afecta a estos parámetros de calidad.

- ⑤ La incidencia de escaldado superficial se ha correlacionado con los parámetros de calidad. Los valores de firmeza y acidez en los frutos, al final de la frigoconservación presentan una correlación negativa con el desarrollo de escaldado en esos frutos. La relación entre la producción de etileno y el escaldado no es tan clara.
- ⑥ La incidencia de escaldado superficial después de 6 meses de frigoconservación presenta una elevada correlación positiva con la concentración en la piel del fruto de compuestos trieno conjugados CT281 determinados a los 2 meses. La correlación entre el escaldado y el contenido de α -farnaseno sólo es significativa cuando ambos parámetros se determinan después de 4 o 6 meses de frigoconservación. La conservación en las distintas condiciones AC ensayadas reduce los contenidos de α -farnaseno y de CT281; la aplicación de DPA reduce asimismo el contenido de CT281, pero no modifica el nivel de α -farnaseno. En todos los casos, el efecto de los tratamientos sobre estos compuestos depende de la fecha de recolección.
- ⑦ La susceptibilidad al escaldado en manzanas de la variedad Granny Smith está estrechamente ligada al estado de madurez del fruto en el momento de su recolección. Cualquier tratamiento antiescaldante pierde eficacia aplicado en frutos de cosechas tempranas, en cuyo caso es prácticamente imposible evitar el desarrollo de la alteración.
- ⑧ Por el comportamiento de la alteración y por la manifestación de sus síntomas, se confirma que el escaldado superficial se expresa como un daño por frío ("chilling injury"). Se considera que la variedad Granny Smith presenta sensibilidad al frío en función de su edad fisiológica, siendo más sensibles los frutos en estado prematuro.

EXCLÒS DE PRÉSTEC