



Trabajo Fin de Grado

La aplicación de brasinoesteroides reduce la incidencia de daños por frío en la granada 'Mollar de Elche' durante la conservación postcosecha

Biblioteca
Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Experimentales



Alejandra María Albert Bermejo

Tutor: Daniel Valero Garrido

Cotutores: María Emma García Pastor y
Vicente Agulló García

Departamento de Tecnología Agroalimentaria

Área de Tecnología de Alimentos

Curso Académico 2023 - 2024

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Producción y características de la granada 'Mollar de Elche'	4
a. Conservación postcosecha y pérdidas de calidad de la granada por daños por frío (DPF)	4
b. Mecanismo de acción de los daños por frío (DPF)	5
c. Problemática comercial de los daños por frío (DPF) en la granada 'Mollar de Elche'	7
d. Tecnologías postcosecha para inhibir o retrasar los daños por frío (DPF)	7
1.2 Aplicación de elicitores en precosecha	7
1.3 Brasinoesteroides	9
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Material vegetal y diseño experimental	12
3.2 Determinaciones analíticas	13
a. Daños por frío (DPF)	13
b. Fuga de electrolitos o 'Ion leakage'	13
c. Contenido de ácido malondialdehído (MDA)	14
d. Firmeza	15
e. Tasa de respiración	15
f. Pérdidas de peso	16
g. Colorimetría	16
h. Sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT)	17
i. Fenoles y antocianinas totales	17
j. Cuantificación de antocianinas individuales	18
k. Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos individuales	19
3.3 Análisis estadístico	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
a. Influencia del tratamiento precosecha sobre los daños por frío (DPF), la fuga de electrolitos, el contenido de ácido malondialdehído (MDA) y la firmeza	20
b. Influencia del tratamiento precosecha sobre la tasa de respiración, las pérdidas de peso y el color externo	24
c. Influencia del tratamiento precosecha sobre el color interno, el contenido de sólidos solubles (SST) y la acidez total (AT)	27
d. Influencia del tratamiento precosecha sobre la actividad antioxidante total hidrosoluble y el contenido de antocianinas y fenoles totales	28
e. Influencia del tratamiento precosecha sobre el contenido de antocianinas y azúcares y ácidos orgánicos individuales	30
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	32
6. AGRADECIMIENTOS	33
7. BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

La granada 'Mollar de Elche' es una fruta muy cultivada en la cuenca del Mediterráneo y apreciada por sus propiedades tanto organolépticas como funcionales. Sin embargo, esta fruta sufre daños por frío (DPF) durante su almacenamiento a temperaturas inferiores a 5 °C, lo que reduce significativamente su calidad. Por otro lado, los brasinoesteroides (Bras) son reguladores del crecimiento vegetal y en estudios recientes se ha observado un efecto en la reducción de los DPF en diversas frutas, incrementando su vida útil y calidad postcosecha. De este modo, el objetivo principal del presente estudio es la evaluación del efecto del tratamiento con Bras en precosecha sobre la tolerancia a los DPF en la granada 'Mollar de Elche', con el fin de hacer frente a esta problemática. Para ello, se aplicaron mediante pulverización foliar dos tratamientos: Control (árboles tratados con agua destilada) y Bras a la concentración 0,1 µM. Las granadas se conservaron a 2 °C y 85 % de humedad relativa durante 30, 60 y 90 días más 2 días a 20 °C (vida útil). Los parámetros físico-químicos que se evaluaron fueron las pérdidas de peso, tasa de respiración, incidencia de daños por frío externos e internos, firmeza, color externo e interno, contenido de sólidos solubles totales, acidez total y fuga de electrolitos. Además, se cuantificó el contenido de ácido malondialdehído (MDA), compuestos fenólicos totales, antocianinas totales e individuales, azúcares y ácidos orgánicos individuales y la actividad antioxidante total (AAT) de la fase hidrosoluble. Los resultados mostraron que el tratamiento precosecha redujo la incidencia de DPF en las granadas conservadas durante un periodo prolongado de 90 días en frío al reducir la fuga de electrolitos y el contenido de MDA. Además, el tratamiento precosecha con Bras incrementó la vida útil al retrasar las pérdidas de firmeza y de peso y reducir la tasa de respiración del fruto. Finalmente, el tratamiento mejoró la calidad nutricional y funcional de los frutos, incrementando el contenido de ácidos y azúcares, y estimulando el sistema antioxidante.

Palabras clave: *Punica granatum* L., compuestos bioactivos, elicitor, fuga de electrolitos, vida útil.

ABSTRACT

The 'Mollar de Elche' pomegranate is a fruit widely cultivated in the Mediterranean basin and appreciated for its organoleptic and functional properties. However, this fruit suffers Chilling Injury (CI) during its storage at temperatures below 5 °C, which significantly reduces its quality. On the other hand, Brassinosteroids (Bras) are plant growth regulators and recent studies have demonstrated a reduction on CI in some fruits, increasing their shelf-life and postharvest quality. Thus, the main objective of the present study is the evaluation of the effect of Bras in preharvest on the tolerance to CI in 'Mollar de Elche' pomegranate fruit, in order to address this problem. For this purpose, two treatments were applied by foliar spraying: Control (trees treated with distilled water) and Bras at concentration 0.1 µM. Pomegranate fruits were stored at 2 °C and 85 % of relative humidity for 30, 60 and 90 days plus 2 days at 20 °C (shelf-life). The physico-chemical parameters evaluated were weight losses, respiration rate, external and internal chilling injury incidence, firmness, external and internal colour, total soluble solids content, total acidity, and ion leakage. In addition, the content of malondialdehyde acid (MDA), total phenolic compounds, total and individual anthocyanins, individual sugars and organic acids and the total antioxidant activity (TAA) of the hydrophilic phase was quantified. The results showed that preharvest treatment reduced the incidence of CI in pomegranate fruits stored for a prolonged storage period of 90 days in cold conditions by reducing ion leakage and MDA content. In addition, preharvest treatment with Bras increased the shelf-life throughout a delaying on losses of weight and firmness and reducing the respiration rate of the fruit. Finally, the treatment improved the nutritional and functional quality of fruits, increasing the content of organic acids and sugars, and stimulating the antioxidant system.

Keywords: *Punica granatum* L., bioactive compounds, elicitor, ion leakage, shelf-life.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Producción y características de la granada 'Mollar de Elche'

La granada 'Mollar de Elche' es el fruto de la especie *Punica Granatum* L., que procede de la variedad Mollar, y es un producto amparado por una Denominación de Origen Protegida (DOP) desde 2016 (R (UE) 2016/83). Este sello de calidad reconoce todas sus cualidades y le otorga valor a la cultura e historia que existe detrás de su cultivo y producción. Se cultiva principalmente en la provincia de Alicante, en las comarcas de L' Alacantí, Vega Baja y Baix Vinalopó, con una producción intensiva en la región de Elche. En el año 2022 se alcanzó una producción total de 50.091 toneladas (Superficies y Producciones Anuales de Cultivos, 2023).

En comparación con otras variedades de granada, como las variedades 'Wonderful' o 'Kingdom', la granada 'Mollar de Elche' presenta ciertos atributos que definen sus propiedades y la caracterizan de forma singular. Dicha variedad destaca por el equilibrio de acidez y azúcares en boca, una coloración exterior que varía del amarillo crema al rojo y por la composición de antocianinas de los arilos que le proporcionan una tonalidad que oscila del color rosa intenso al rojo. Además de poseer un sabor dulce y ligeramente ácido, los arilos son carnosos y el piñón es pequeño y blando, facilitando su consumo ya que apenas es apreciable en boca (García-Pastor et al., 2019). El color de los frutos varía en función de su posición en el árbol y exposición al sol, dependiendo de la concentración que presenten de antocianos, definidos como compuestos fenólicos responsables de otorgar la coloración rojiza tanto externa como interna del fruto. Respecto a su composición nutricional y/o funcional, encontramos polifenoles, ácidos grasos, vitaminas (A, K, B6 y C), minerales (potasio, fósforo, magnesio y calcio) y una gran cantidad de fibra. Todos ellos influyen positivamente en nuestra salud ya que ejercen efectos antiinflamatorios, antioxidantes (Gil et al., 2000), cardioprotectores (Aviram et al., 2002) e incluso anticancerígenos (Tibullo et al., 2016). Por todas estas características, la granada se convierte en un producto de interés tanto para la investigación científica como para los consumidores.

a. Conservación postcosecha y pérdidas de calidad de la granada por daños por frío (DPF)

Al ser un fruto no climatérico, la granada carece de la capacidad de continuar su maduración tras la recolección del fruto. Por ello, este fruto solamente presenta un período de senescencia durante su almacenamiento en postcosecha, el cual implica la fase final de la vida útil de la fruta con una serie de alteraciones físico-químicas del fruto, normalmente irreversibles, que conducen a las pérdidas de calidad, al desorden y muerte celular, presentando principalmente aumentos en la actividad enzimática, sobre todo hidrolítica (Giraldo, 2002).

Por lo tanto, resulta indispensable el mantenimiento de los parámetros de calidad adquiridos en el momento de la recolección a través de técnicas en postcosecha que alarguen la vida útil del fruto como es la refrigeración con el fin de mantener la amplia variedad de beneficios que aporta este fruto y lleguen al consumidor final en un estado óptimo de calidad. Sin embargo, es preciso mencionar que la granada es susceptible a los daños por frío (DPF) durante su almacenamiento a temperaturas inferiores a 5 °C. Este desorden fisiológico afecta negativamente a su calidad en varios aspectos, incluyendo la apariencia, la firmeza, la intensidad del color y el sabor. Además, pueden provocar una pérdida significativa de compuestos bioactivos y antioxidantes, reduciendo así su valor nutricional y sus beneficios para la salud (Lorente-Mento et al., 2023a).

b. Mecanismo de acción de los daños por frío (DPF)

En los frutos sensibles al desorden fisiológico conocido como 'daños por frío' (DPF), como la granada, se desencadena una serie de cambios físico-químicos que se manifiestan de diversas formas tanto a nivel macroscópico o físico (cambio visual) como a nivel microscópico o químico (composición nutricional y/o funcional).

Los primeros cambios mediados a nivel transcriptómico ocurren en la piel del fruto. El frío induce procesos celulares como la peroxidación de los lípidos que conforman la membrana del fruto. El ratio UFA/SFA [Unsaturated Fatty Acids (UFA) / Saturated Fatty Acids (SFA)] indica la relación entre la cantidad de ácidos grasos insaturados y saturados, determinándose que a mayor ratio UFA/SFA, los daños por frío son menores. En este aspecto, se ha observado que el almacenamiento en frío (por debajo del límite fijado de 5 °C) produce un incremento en el índice de ácidos grasos saturados (Maghoumi et al., 2023). Todo ello contribuye a una disminución en la fluidez y, por ende, en la funcionalidad de la membrana (Marangoni et al., 1996; Sevillano et al., 2009). Consecuentemente, se dan respuestas fisiológicas secundarias como la pérdida de firmeza y la fuga de electrolitos. En estas condiciones de estrés abiótico, se inducen niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan en los cloroplastos, mitocondrias y por acción de la actividad de la enzima NADPH-oxidasa (**Figura 1**). La NADPH-oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O₂ con la formación de radical superóxido (O₂⁻). El O₂⁻ es rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Aun cuando la granada posee compuestos bioactivos con actividad antioxidante, como las antocianinas y otros polifenoles, se conoce que los daños por frío (DPF) inducen la actividad de ciertas enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la polifenol oxidasa (PPO) que llevan a cabo la oxidación de compuestos antioxidantes como los taninos que producen otros compuestos de color marrón (**Figura 1**).

c. Problemática comercial de los daños por frío (DPF) en la granada ‘Mollar de Elche’

La mayor parte de la producción de la variedad ‘Mollar de Elche’ se destina principalmente a la exportación, tanto a nivel nacional como internacional. Por ello, la conservación a bajas temperaturas (< 5 °C) resulta indispensable con el objetivo de retrasar las pérdidas de calidad y preservar el fruto, evitando su desvalorización comercial. Si bien la refrigeración aporta numerosos beneficios para conservar la granada en postcosecha, los daños por frío (DPF) son inevitables, ocasionando grandes pérdidas a nivel económico. Diversos factores influyen en la sensibilidad de la granada a la conservación en frío a bajas temperaturas, como el estado de madurez del fruto en el momento de su recolección y el tiempo de exposición a la refrigeración (Lorente-Mento et al., 2023a).

d. Tecnologías postcosecha para inhibir o retrasar los daños por frío (DPF)

Minimizar los daños por frío (DPF) que sufren los frutos durante su conservación a temperaturas inferiores a los 5 °C supone un reto tecnológico de relevante importancia. Algunas de las tecnologías desarrolladas en postcosecha se recogen en **Tabla 1**.

Tabla 1. Efectos de distintas tecnologías desarrolladas en postcosecha para incrementar la tolerancia a los daños por frío (DPF) en diversas frutas, hortalizas y hongos.

TECNOLOGÍAS	FRUTAS, HORTALIZAS, HONGOS	RESULTADOS	REFERENCIAS
Recubrimientos o ‘Coating’	Granada, variedad ‘Ganesh’	Mantenimiento del espesor de la piel y su firmeza. Reducción de la pérdida de peso.	Nanda et al. (2001)
Atmósferas Controladas (AC)	Apio verde, variedad ‘Trinova’	Reducción de la tasa de respiración en un 30%. Mantenimiento del color verde y disminución del pardeamiento en los extremos del apio.	Gómez y Artés (2004)
Atmósferas Modificadas (AM)	Seta Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	Disminución del incremento en la tasa de respiración. Retraso de la disminución de los azúcares solubles y actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO).	Ye et al. (2012)
Calentamientos Intermittentes	Granada, variedad ‘Mollar’	Mantenimiento del color rojo de la piel además del contenido de antocianinas totales del zumo durante su almacenamiento a 0 °C.	Artés et al. (1998)

1.2. Aplicación de elicitores en precosecha

Los elicitores son moléculas o agentes señalizadores que, a bajas concentraciones, activan los mecanismos de respuesta defensiva de las plantas frente a diversas amenazas que provocan daños. Estas amenazas se pueden clasificar en dos tipos de estrés: biótico o abiótico, según provengan de agentes biológicos o no,

respectivamente. Los elicitores de origen abiótico se clasifican en químicos o físicos, mientras que los de origen biológico se clasifican dependiendo de su procedencia: exógenos (si proceden del exterior de la planta) o endógenos (si son generados por la propia planta). El mecanismo general de los elicitores se basa en el reconocimiento de la molécula por receptores específicos que se encuentran ubicados en la superficie de la célula vegetal (**Figura 3**). Estos receptores inducen la activación de genes que se encargan de la producción de compuestos bioactivos involucrados en la defensa celular, así como enzimas antioxidantes y proteínas relacionadas con la patogénesis. Es importante destacar que la interacción elicitador-receptor es altamente específica y que las rutas de señalización varían según la especie vegetal (Eder y Cosio, 1994).

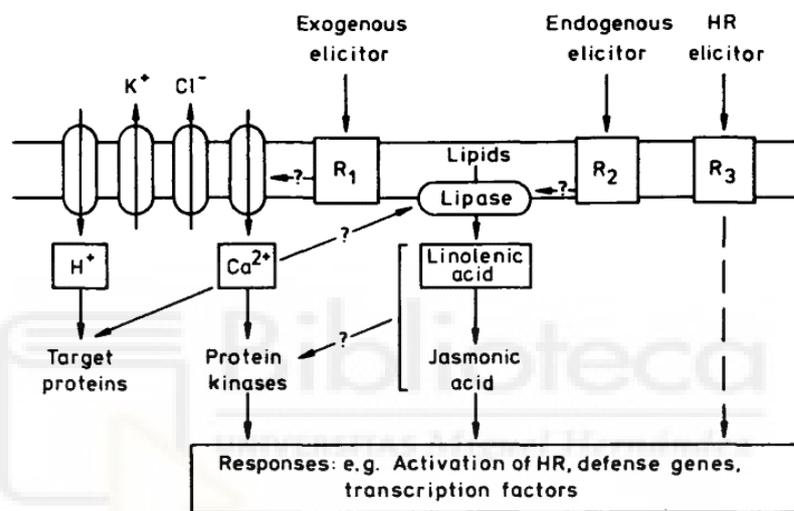


Figura 3. Modelo hipotético para la señalización mediada por elicitores que conduce a la activación de la respuesta de defensa de las plantas. Fuente: Eder y Cosio (1994).

Conociendo el mecanismo de acción, se pueden inferir los motivos por los cuales los elicitores están siendo una opción muy interesante de investigar dentro del ámbito de la tecnología agroalimentaria. Además de suponer una opción respetuosa con el medioambiente ya que son reguladores del crecimiento vegetal y se encuentran endógenamente en las plantas, existe una extensa bibliografía de estudios que ponen en práctica el empleo de dichas sustancias en precosecha con el fin de encontrar la combinación óptima entre el elicitador (concentración) + especie vegetal (variedad) que sea capaz de incrementar la calidad del fruto en el momento de la recolección, sin afectar negativamente a la producción del cultivo, y mantener su calidad en postcosecha (extendiendo la vida útil). Entre los elicitores más empleados, se encuentran los derivados del ácido jasmónico y del ácido salicílico aplicados en especies vegetales como el limón (*Citrus limon*) (Siboza et al., 2014; Serna-Escolano et al., 2019; 2021) y la granada (*Punica granatum* L.) (García-Pastor et al., 2019; 2020a; Lorente-Mento et al., 2023b), entre otras.

En un estudio previo a este trabajo (García-Pastor et al., 2020a), se evaluó el efecto del tratamiento pre- y postcosecha con jasmonato de metilo (JaMe) sobre la variedad 'Mollar de Elche' con el objetivo de asegurar el mantenimiento de la calidad del fruto durante su almacenamiento a bajas temperaturas e inducir tolerancia a la incidencia de daños por frío (DPF). Se observó que con una concentración de 5 mmol L⁻¹ aplicado mediante pulverización foliar se retrasaban de forma significativa las pérdidas de peso y de firmeza del fruto durante un almacenamiento prolongado. También se observó una mejora en la coloración rojiza de los arilos e incrementó significativamente el contenido total de fenoles, antocianinas y ácido ascórbico por parte del tratamiento. Sin embargo, dentro de la amplia gama de elicitores que se usan actualmente con el objetivo de paliar los efectos de las distintas amenazas o estreses que reciben las plantas, destacamos una nueva línea de investigación reciente sobre el uso de los brasinoesteroides como una nueva opción prometedora de elicitor aplicado en precosecha como solución a la problemática expuesta en el presente trabajo acerca de la granada 'Mollar de Elche'.

1.3. Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (Bras) son fitohormonas implicadas en la regulación del crecimiento o desarrollo de las plantas. Se consideran, por tanto, elicitores endógenos al ser sintetizados por la propia planta. El papel de los brasinoesteroides varía en función de la fase de desarrollo en la que se encuentre la planta (Fang et al., 2023). En un inicio participan en la germinación, la elongación del tallo y el enraizamiento; y posteriormente, están implicados tanto en la floración como en la fructificación. En general, ayudan en los procesos de diferenciación tisular y de resistencia a condiciones ambientales adversas (Manghwar et al., 2022), como se expone esquemáticamente en la **Figura 4**.

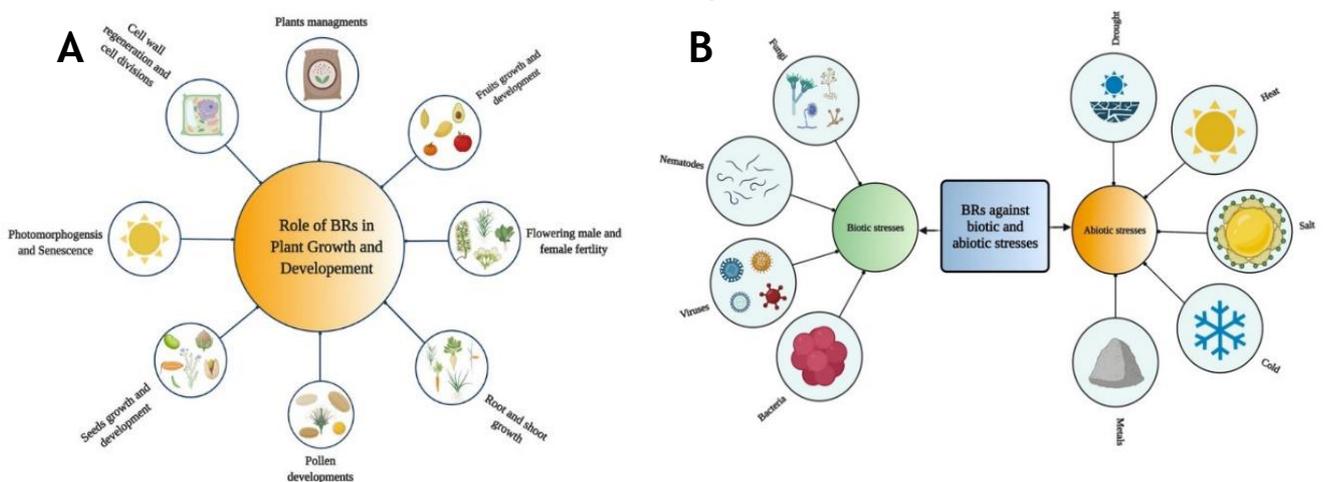


Figura 4. Papel que desempeñan los brasinoesteroides (Bras) en: (A) El crecimiento y desarrollo vegetal, y (B) Frente a diversos tipos de estrés biótico y/o abiótico en las plantas. Fuente: Manghwar et al. (2022).

Si bien existen otras fitohormonas con efectos similares a los de los brasinoesteroides, cabe destacar que estos presentan ciertas particularidades que marcan una gran diferencia. Se tratan de las únicas hormonas vegetales que poseen una estructura química de tipo esteroidal. Normalmente, están compuestas por 27-29 átomos de carbono que se configuran en cuatro anillos fusionados, además de una cadena lateral de longitud variable que puede albergar diversos grupos funcionales.

Los brasinoesteroides más comunes en plantas superiores son la brasinólida (**Figura 5A**) y su precursor cetónico, la castasterona (**Figura 5B**) (Srivastava, 2002). La brasinólida es la forma natural más activa de las dos. A pesar de ello, se emplea la 24-epibrasinólida (**Figura 5C**), que tiene una menor potencia y la misma formulación que la brasinólida, pero presenta el grupo hidroxilo en el carbono 24 en posición alfa, mientras que en la brasinólida este grupo hidroxilo está en posición beta. Es posible que su uso se haya visto impulsado debido a que la 24-epibrasinólida presenta una mayor solubilidad en agua. De ahí que exista una gran cantidad de investigaciones que la empleen para evaluar sus efectos positivos sobre la conservación y el mantenimiento de diversas especies vegetales como el maíz (*Zea mays* L.) (Fang et al., 2023) y la berenjena (*Solanum melongena*) (Gao et al., 2014).

Por ello, en el grupo de investigación de Post-recolección de Frutas y Hortalizas de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), se llevó a cabo un estudio previo en granada 'Mollar de Elche' sobre la aplicación precosecha de brasinoesteroides a la concentración de 0,1 μM para evaluar su efecto sobre diferentes parámetros de calidad, como la firmeza, el color externo e interno o el contenido en sólidos solubles totales y acidez, durante la conservación a temperaturas óptimas de almacenamiento de la granada ($> 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), en concreto, a $8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 85 % HR (Esteban Alcaraz, 2023).

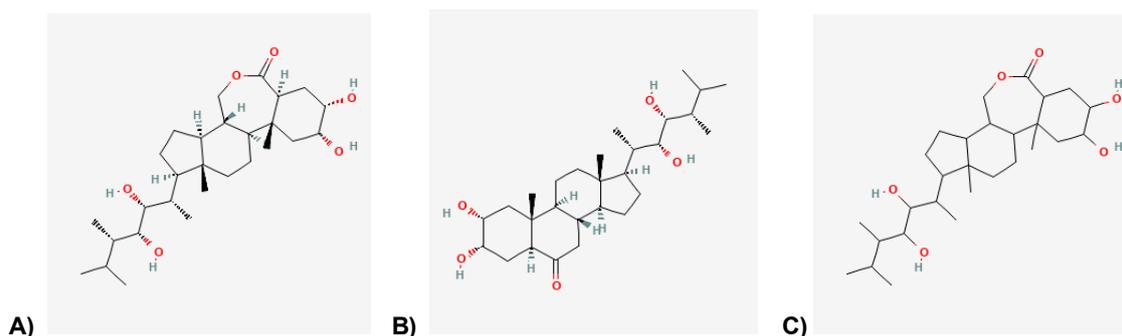


Figura 5. Principales brasinoesteroides en plantas: **A)** Brasinólida, **B)** Castasterona, y **C)** 24-epibrasinólida. Fuente: (PubChem Structure Search, 2024).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Uno de los grandes retos a los que se enfrenta la tecnología agroalimentaria es el mantenimiento de las propiedades físico-químicas de los alimentos durante su conservación postcosecha. La posibilidad de comercializar los frutos cultivados recae directamente en la calidad que presentan los mismos en el momento de la recolección y durante su comercialización. Por tanto, existen diversas líneas de investigación, entre las que encontramos el proyecto 'PROMETEO 2021/089 - *Innovative and eco-friendly pre- and postharvest strategies with natural compounds to improve quality of fruits*' financiado por la Generalitat Valenciana (GVA) al grupo de Post-recolección de Frutas y Hortalizas de la UMH. El propósito de dicho proyecto es encontrar nuevas estrategias en pre- y postcosecha que sean innovadoras y respetuosas con el medioambiente para conseguir mejorar la calidad de la fruta con el fin de satisfacer las demandas del mercado.

Recientemente, mucha de la bibliografía relacionada con el uso de los brasinoesteroides tiene como temática la reducción de los daños por frío (DPF) en diversas frutas, incrementando su vida útil y su calidad postcosecha. Sin embargo, la mayoría de estos estudios evalúan el efecto del tratamiento en postcosecha, existiendo una escasez respecto a su evaluación como estrategia precosecha. Además, no hay estudios que describan los efectos de los brasinoesteroides en la reducción de daños por frío en la granada y, en concreto, en la variedad 'Mollar de Elche'. De este modo, el objetivo principal del presente estudio es evaluar los efectos del tratamiento precosecha con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 μM sobre la incidencia de daños por frío en la granada 'Mollar de Elche' durante un almacenamiento prolongado. Para ello, se definirán los siguientes objetivos específicos:

- ◆ Evaluar la tolerancia a la aparición de los síntomas de daños por frío (DPF) externos e internos en la granada 'Mollar de Elche'.
- ◆ Analizar la fuga de electrolitos y cuantificar el contenido de ácido malondialdehído (MDA) a lo largo del periodo de almacenamiento en frío.
- ◆ Estudiar la evolución de la firmeza, tasa de respiración, color externo e interno y de las pérdidas de peso y de firmeza durante el almacenamiento prolongado.
- ◆ Evaluar el contenido de sólidos solubles totales (SST) y de acidez total (AT) durante la conservación postcosecha, así como cuantificar los niveles de azúcares y ácidos orgánicos individuales en el momento de la recolección.
- ◆ Cuantificar el contenido de compuestos bioactivos presentes los arilos: fenoles y antocianinas totales a lo largo del almacenamiento, así como la actividad antioxidante total (AAT) de la fase hidrosoluble y el contenido de antocianinas individuales en el momento de la recolección.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y diseño experimental

El estudio se llevó a cabo en una parcela comercial ubicada en Albuera (Alicante, España) con árboles de granada (*Punica granatum* L., cv. Mollar de Elche) y perteneciente a la empresa Hebegu S.L. La producción se recolectó el 3 de octubre de 2023 atendiendo a las características de la adquisición del estado de madurez comercial de esta variedad. El diseño experimental consistió en la pulverización foliar mediante un pulverizador manual de nebulización usando unos 2 L por árbol de dos tratamientos: 1) Control (árboles tratados con una solución de agua destilada que contenía 1 mL L⁻¹ de Tween-20®) y 2) Brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 µM, obtenidos de Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se utilizó un diseño de bloques al azar para cada tratamiento con un total de 9 árboles por tratamiento (3 árboles por réplica o bloque, n = 3). Los tratamientos se aplicaron en cuatro momentos clave a lo largo del ciclo de desarrollo y maduración del fruto en el árbol, siendo estos previamente publicados en granada 'Mollar de Elche' dentro del grupo de investigación de Post-recolección de Frutas y Hortalizas (García-Pastor et al., 2019; 2020a; 2020b), y adaptándose dichos momentos clave a la campaña de 2023, como se puede observar en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Fechas de aplicación de los tratamientos en precosecha y momentos clave.

TRATAMIENTOS PRECOSECHA	DÍAS TRAS LA FLORACIÓN PLENA (DAFB) ^Y	FECHA	MOMENTOS CLAVE
T1	80	20-06-23	Antes de alcanzar el 30% del tamaño final del fruto y se den cambios en el color de la corteza (síntesis de antocianinas).
T2	110	24-07-23	El fruto alcanza el 50% de su tamaño final.
T3	140	28-08-23	1 mes antes de la recolección.
T4	170	28-09-23	4 días antes de la recolección.

^Y Abreviación de siglas en inglés: DAFB; Days after full blossom (días tras la floración plena).

De cada árbol se seleccionaron aquellos frutos homogéneos en tamaño y color, y que no presentaron daños o defectos visuales. Se recolectaron un total de 60 frutos por cada tratamiento. Tras ello, se reagruparon aleatoriamente los frutos seleccionados en 4 lotes (0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento) con 3 réplicas (n = 3) de 5 frutos por réplica y tratamiento (15 frutos en total por tratamiento y lote). Posteriormente, los lotes se conservaron a 2 °C ± 1 °C y con 85 % de humedad relativa (HR) durante 30, 60 y 90 días y, previo a las determinaciones analíticas, se expusieron durante 2 días a 20 °C (vida útil).

3.2 Determinaciones analíticas

a. Daños por frío (DPF)

La determinación de los daños por frío se evaluó de forma individual interna y externamente en cada granada basándose en el porcentaje de superficie de la corteza afectada por los síntomas de estos daños (deshidratación, aparición de punteado y manchas marrones). Para ello, se utilizó una escala hedónica de referencia de seis valores (del 0 al 5). Atendiendo al porcentaje de la superficie de corteza (externa e interna) afectada, se asignaron los valores de 0 (si no presentaba ningún síntoma de daños por frío), 1 (1-20%), 2 (21-40%), 3 (41-60%), 4 (61-80%), y 5 (>81%). Se tomó como referencia la escala hedónica elaborada en estudios preliminares y adaptada a la incidencia de daños por frío en la variedad 'Mollar de Elche' (García-Pastor et al., 2020a), la cual se muestra en la **Figura 6**.

La fórmula empleada para el cálculo de la incidencia de daños por frío fue la siguiente:

$$DPF = \frac{\sum(\text{valor de la escala hedónica}) \cdot (\text{número de frutas con el valor correspondiente})}{\text{número total de frutas en la muestra}}$$

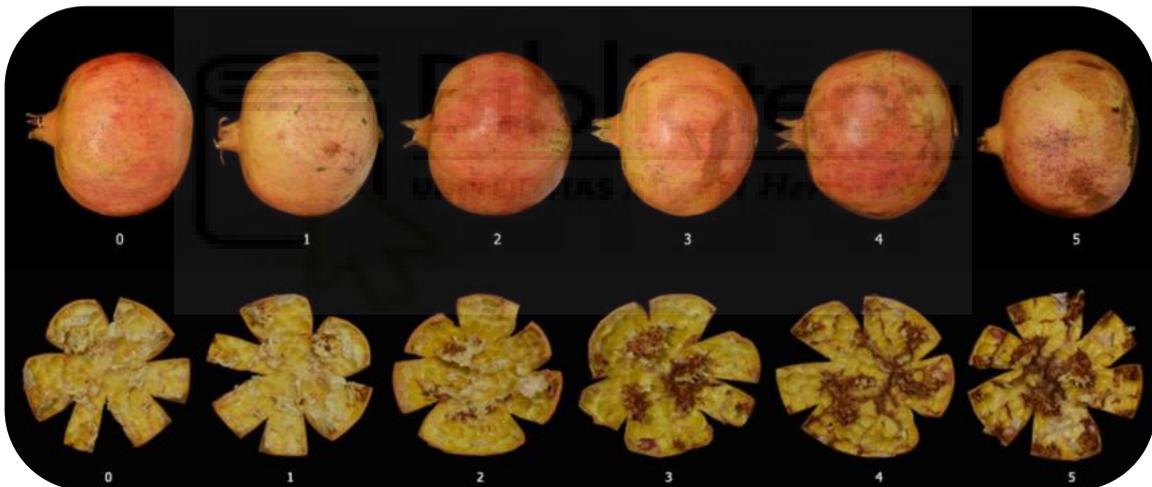


Figura 6. Escala hedónica de referencia para evaluar la incidencia de daños por frío (DPF) externos e internos en la granada 'Mollar de Elche'. Fuente: García-Pastor et al. (2020a).

b. Fuga de electrolitos o 'Ion leakage'

La fuga de electrolitos se determinó en la piel en fresco de la granada en la que se tomaron 24 discos en total por réplica ($n = 3$) de unos 10 mm de diámetro con un sacabocados. Los discos fueron incubados durante 2,5 horas en un bote de vidrio con 25 mL de agua Milli-Q (ultrapura-grado I) y se dejaron en constante agitación (**Figura 7A**). Este método supone una ligera modificación respecto al descrito por García-Pastor et al. (2020a).

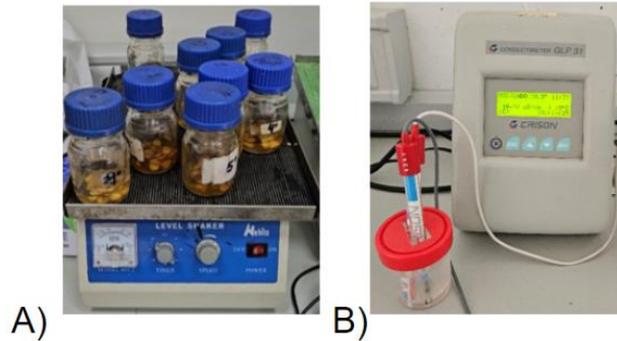


Figura 7. A) Botes de vidrio con los discos de la muestra de piel de las granadas en agitación constante en un agitador (Nahita). **B)** Conductímetro de sobremesa GLP 31 (CRISON).

Transcurrido este tiempo, se midió la conductividad inicial mediante un conductímetro (**Figura 7B**) y se congelaron los botes de las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, una vez descongelados, se autoclavaron durante 15 minutos a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se midió la conductividad final. De esta forma, se determinó el porcentaje de fuga de electrolitos (%) mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de Fuga de electrolitos} = \frac{\text{valor de conductividad inicial } (\mu\text{S cm}^{-1}) \cdot 100}{\text{valor de conductividad final } (\mu\text{S cm}^{-1})}$$

c. Contenido de ácido malondialdehído (MDA)

El contenido de ácido malondialdehído (MDA) se midió adaptando el método propuesto en el artículo de Wang et al. (2012). Para ello, la corteza de la granada en fresco fue congelada con N_2 líquido, liofilizada y pulverizada mediante un molinillo eléctrico y se conservaron en bolsas de termosellado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Figura 8A**), a las cuales se les realizó el vacío con una termoselladora automática de vacío para evitar posibles oxidaciones (**Figura 8B**) hasta su posterior análisis.



Figura 8. A) Bolsa termosellada con una muestra homogénea en polvo de la piel de la granada 'mollar de Elche'. **B)** Termoselladora automática de vacío.

Se emplearon 0,25 gramos de la piel del fruto y 1 gramo de arena estéril (autoclavada) mediante una balanza analítica (Mettler Toledo AG204). Seguidamente, se molieron de

manera conjunta en un mortero al que se le adicionaron 10 mL de TCA (ácido tricloroacético al 10%), y se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000 rpm y 4°C. Posteriormente, se le añadió a 2 mL del sobrenadante otros 2 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico al 0,67%) en tubos de ensayo. Tras ello, se llevaron a un baño caliente durante 20 minutos a 95 °C. Finalmente, se depositó el contenido en cubetas para medir su absorbancia en un espectrofotómetro a las longitudes de onda de 450, 532 y 600 nm. La ecuación empleada para determinar el contenido de MDA en peso fresco (PF) es la siguiente:

$$MDA^g / kg_{PF} = \frac{[6,45 \cdot (Abs\ 532 - Abs\ 600) - 0,56 \cdot Abs\ 450] \cdot V_T \cdot V_R}{V_S \cdot Masa}$$

d. Firmeza

La firmeza de las granadas seleccionadas se evaluó causándole una deformación del 5% al diámetro del fruto con ayuda de un texturómetro dispuesto con una placa base de acero inoxidable (**Figura 9**), como se describe en trabajos previos en granada (García-Pastor et al., 2019; 2020a; 2020b). Los resultados se expresaron mediante las unidades de N mm⁻¹ (fuerza necesaria para alcanzar la deformación del fruto / distancia de deformación).



Figura 9. Texturómetro TA-XT21[®] empleado en el análisis de la firmeza del fruto.

e. Tasa de respiración

Se pesaron los frutos en lotes de 5 unidades y 3 réplicas (n = 3) por tratamiento y se encerraron durante 1 h en un recipiente hermético de vidrio de 3 L (15 recipientes en total por tratamiento y día de análisis). En la tapa del bote se colocó un septum por el cual se pudo determinar con una jeringuilla la atmósfera de gases que era generada por los frutos al permanecer almacenados en su interior. Por último, se integraron las áreas de CO₂ mediante un cromatógrafo de gases Shimadzu TM 14A para calcular la tasa de respiración del fruto de acuerdo con el protocolo previamente descrito por García-Pastor et al. (2020b). Los resultados se expresaron en mg de CO₂ kg⁻¹ h⁻¹.

f. Pérdidas de peso

Para evaluar las pérdidas de peso durante el almacenamiento en postcosecha, en primer lugar, se pesó cada una de las granadas de forma individual tanto en el momento de la recolección (día 0) como en cada uno de los días de análisis tras el almacenamiento en frío (30, 60 y 90 días). Para ello, se utilizó una balanza digital Mettler PC-4400 con una precisión de dos cifras decimales $\pm 0,01$ y obteniendo el peso en gramos (g). Para la determinación de este parámetro se comparó el peso de los frutos en los diferentes días de análisis con los pesos del día 0 (momento de la recolección), expresando los valores de pérdidas de peso en porcentaje (%).

g. Colorimetría

La evaluación del color de las granadas fue tanto externa como interna. En cuanto a la primera, empleándose el colorímetro, se realizaron 6 mediciones alrededor del fruto a lo largo de todo su diámetro ecuatorial para obtener los datos del color externo de la corteza. Respecto al color interno, fue necesario partir la granada por la mitad y repetir otras 6 mediciones sobre los arilos del fruto para determinar su color interno (**Figura 10**). El colorímetro registró los valores del color mediante las tres coordenadas del Sistema Hunter Lab: L^* , a^* y b^* . La coordenada L^* indica la luminosidad de la muestra, representando valores entre 0 (color negro) y 100 (color blanco). El parámetro a^* indica la posición del color dentro del eje rojo-verde. Los valores positivos representan el color rojo, mientras que los negativos el color verde. La coordenada b^* muestra la posición del color dentro del eje amarillo-azul, siendo el color amarillo los valores positivos y el color azul los valores negativos. Tanto en la coordenada a^* como b^* , el valor de 0 representa un color neutro (ni rojo ni verde, ni amarillo ni azul, respectivamente). El color, tanto interno como externo, de la granada se expresa en el presente estudio con el parámetro del ángulo hue ($^\circ h$) que es el ángulo de matiz y viene calculado por la siguiente fórmula:

$$\text{ángulo hue } (^\circ h) = \arctg \frac{b^*}{a^*}$$



Figura 10. Colorímetro (KONICA MINOLTA, CR-400).

h. Sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT)

Para determinar los sólidos solubles totales (SST), se obtuvo un zumo a partir de los arilos exprimidos y se depositó una muestra sobre un refractómetro digital (*WINEline HI 96811*; **Figura 11A**) el cual mide, en grados Brix (% o g 100 g⁻¹) y a una temperatura de 20 °C, dicho parámetro. Cabe destacar que este tipo de análisis siempre se realiza por duplicado. En cuanto a la acidez total (AT) de cada una de las muestras existentes, se tomó 1 mL del zumo previamente elaborado y filtrado y se diluyó en 25 mL de agua destilada para que se analizara dicho parámetro mediante un valorador automático (*OMNIS SAMPLE ROBOT*) usando NaOH 0,1 N hasta neutralizar los ácidos de la muestra al alcanzar un pH de 8,10 (**Figura 11B**).



A)



B)

Figura 11. A) Refractómetro (*WINEline HI 96811*). B) Valorador automático de acidez (*OMNIS SAMPLE ROBOT*).

i. Fenoles y antocianinas totales

Para cuantificar el contenido de fenoles y antocianinas totales de la granada se realizaron las siguientes extracciones:

- ♦ **Fenoles:** Se pesaron 5 g de arilos en tubos de centrifuga con 15 mL de extractante específico para los compuestos fenólicos [metanol: agua destilada (8:2, v/v) y 0.00839 g de NaF]. A continuación, se homogeneizó la muestra mediante un Ultraturrax (**Figura 12A**) y se centrifugó durante 15 minutos a 4 °C y a 10.000 rpm (**Figura 12B**). En tubos de ensayo se añadió 300 µL de tampón fosfato y 200 µL del sobrenadante. Se adicionó 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido previamente 1:10), iniciándose la reacción de viraje de color tras entrar en contacto con los compuestos fenólicos presentes en el extracto. Una vez transcurridos 2,5 minutos, se añadió 200 µL de carbonato de sodio para detener la reacción. Seguidamente, los tubos de ensayo se llevaron a un baño de 60 °C durante 5 minutos. Por último, se midió la absorbancia a 760 nm con el espectrofotómetro, de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Serna-Escolano et al. (2021).



Figura 12. A) Ultra Turrax® (IKA T18®). B) Centrífuga (5804 R, eppendorf).

- ♦ **Antocianinas:** La extracción fue similar al protocolo descrito previamente para los fenoles. Sin embargo, el líquido extractante fue diferente [metanol: agua destilada (8:2, v/v) y HCl al 0,1%]. Seguidamente, se midió la absorbancia a 520 nm con el espectrofotómetro (**Figura 13**). Cabe señalar que se diluyeron los extractos con un factor de dilución (FD) de 1:2.



Figura 13. Espectrofotómetro SHIMADZU (UV-1700 PharmaSpec).

j. Cuantificación de antocianinas individuales

Para la cuantificación de las antocianinas individuales, el extracto utilizado para la cuantificación de antocianinas totales (sin diluir) se filtró mediante un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm (**Figura 14**).



Figura 14. Filtros PVDF (CHROMAFIL® Xtra PET -45/25).

El extracto filtrado se pasó a unos viales para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (serie Agilent HPLC 1200 Infinity) (**Figura 15**). Para cuantificar las antocianinas individuales, se inyectaron 20 μ L de dos réplicas de cada extracto en un sistema HPLC trabajando con las condiciones cromatográficas previamente reportadas en frutos rojos (Martínez-Esplá et al., 2014b, 2017a).



Figura 15. HPLC (Agilent HPLC 1200 Infinity).

k. Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos individuales

Para la preparación de la muestra en la que determinar el contenido de azúcares y ácidos orgánicos individuales se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, pero en este caso se utilizó el zumo filtrado que había sido obtenido para el análisis del contenido de sólidos solubles totales y acidez total. Los ácidos orgánicos se analizaron a 210 nm en un sistema HPLC mientras que los azúcares se determinaron mediante el detector de índice de refracción y para su cuantificación se compararon con curvas estándares de azúcares y ácidos orgánicos puros, de acuerdo con lo descrito e identificado previamente en la granada 'Mollar de Elche' por García-Pastor et al. (2020b).

3.3 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm ES ($n = 3$). Para el análisis estadístico de los datos, se realizó un análisis de varianza ANOVA y se empleó el test de Tukey's para un nivel de significancia $p < 0,05$ con el objetivo de determinar las diferencias significativas entre días de conservación (0, 30, 60 y 90 días a 2 °C + 2 días a 20 °C) para cada tratamiento y parámetro evaluado. Dichas diferencias significativas se han representado en los gráficos en letras minúsculas o dobles asteriscos (**). Por otro lado, se llevó a cabo una prueba *t*-Student para la comparación de medias entre tratamientos en cada uno de los días de análisis y parámetros, representando las diferencias significativas con el símbolo del asterisco (*). Ambas pruebas estadísticas se realizaron con el programa SPSS versión 17.0. Los cálculos y gráficas se desarrollaron con el programa SigmaPlot versión 11.0 para Windows.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Influencia del tratamiento precosecha sobre los daños por frío (DPF), la fuga de electrolitos, el contenido de ácido malondialdehído (MDA) y la firmeza

Los síntomas de los daños por frío (DPF) fueron incrementando de forma significativa ($p < 0,05$) a lo largo de la conservación para ambos tratamientos estudiados, observándose una evolución similar tanto en la corteza externa como en la interna (**Figura 16A y B**).

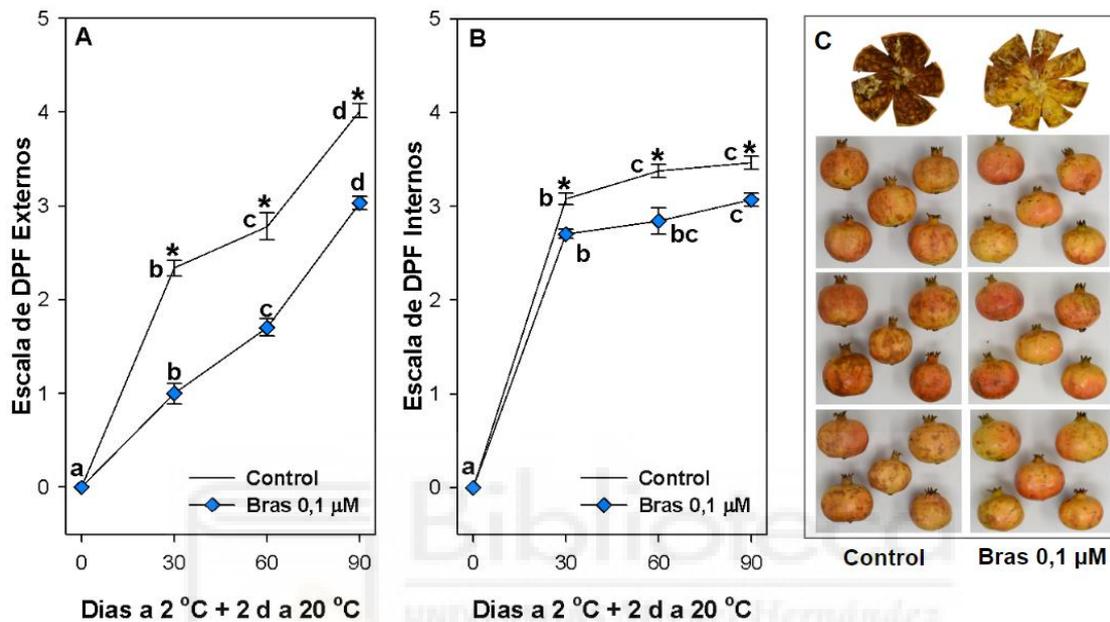


Figura 16. Efecto del tratamiento precosecha con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 µM sobre la incidencia de daños por frío (DPF) en la corteza externa (A) e interna (B) de granada durante 90 días de almacenamiento a 2 °C + 2 d a 20 °C, y aspecto visual de la granada 'Mollar de Elche' control y tratada con Bras 0,1 µM a los 90 días del experimento (C).

En cuanto a los daños externos, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control y los frutos tratados a partir de los 30 días de conservación en frío, destacando que el tratamiento con Bras redujo de forma significativa la incidencia de dicho desorden fisiológico. Además, se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes días de conservación para ambos tratamientos estudiados. La evaluación de los daños por frío (DPF) de la corteza externa para las granadas control alcanzó un valor de 4 según la escala hedónica a los 90 días de almacenamiento. Sin embargo, se observó que los frutos tratados obtuvieron como máximo un valor de 3 en la escala de daños externos al final del experimento (**Figura 16A**). Dicha mejora en la reducción de la incidencia de DPF externos por parte del tratamiento precosecha con brasinoesteroides se puede observar en la **Figura 16C**, donde se aprecia un menor pardeamiento y punteado en la superficie de los frutos tratados en comparación con las fotografías de las granadas control. Cabe destacar que la incidencia fue más significativa ($p < 0,05$) entre el momento de la recolección y los 30 días de almacenamiento, sobrepasando los 2 puntos en los frutos no tratados (**Figura 16A**).

Respecto a los daños internos, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control y los tratados a lo largo del almacenamiento en postcosecha (**Figura 16B**). El tratamiento con brasinoesteroides redujo de forma significativa ($p < 0,05$) la incidencia de daños por frío en la membrana interna de las granadas tratadas en precosecha (**Figura 16B**). Por otro lado, se apreció que, para ambos tratamientos, la incidencia de daños por frío internos incrementó significativamente ($p < 0,05$) tras 30 días de almacenamiento, siendo el incremento menos pronunciado tras 60 y 90 días de conservación al mantener valores de incidencia en torno a 3 (**Figura 16B**). Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos sobre la incidencia de daños por frío internos se pueden apreciar visualmente en la parte superior de la **Figura 16C**.

Se pudo concluir, que la aplicación del tratamiento con brasinoesteroides a la concentración de $0,1 \mu\text{M}$ fue altamente efectiva sobre la reducción de la incidencia de daños por frío en la corteza externa tras los primeros 30 días de almacenamiento frente a los frutos no tratados, ya que los síntomas de los daños por frío (DPF) se vieron reducidos por casi más de un punto y medio dentro de la escala hedónica, lo que resultó en que al final del experimento el estado de deterioro visual del fruto fuera significativamente ($p < 0,05$) menor que en el caso del control. Respecto a la incidencia de daños por frío en la corteza interna se observó un efecto también positivo por parte del tratamiento tras los 30 días a 2°C .

En un estudio reciente, donde se aplicó la 24-epibrasinólida en precosecha con la intención de demostrar el efecto sobre la tolerancia al frío en las granadas, se observaron unos resultados muy similares a los del presente trabajo a pesar de que las condiciones del experimento no fueran del todo iguales (Islam et al., 2022). En dicho estudio, se emplearon concentraciones superiores de Bras ($5, 10$ y $15 \mu\text{M}$) y temperaturas de almacenamiento de 5°C (Islam et al., 2022). Sin embargo, se observó el mismo patrón de comportamiento: incremento pronunciado del índice de los daños por frío (DPF) tras 30 días de conservación, alcanzándose a los 84 días del experimento el valor de 4 en la escala para el control al igual que se observa en la **Figura 16A y B**. Esto demuestra que, a pesar de que en el presente estudio se empleó una concentración mucho menor ($0,1 \mu\text{M}$) y se almacenaron los frutos en condiciones más extremas (2°C), durante el mismo periodo de tiempo (aproximadamente 90 días), el tratamiento resulta eficaz para paliar los efectos de los daños por frío (DPF).

Por otro lado, García-Pastor et al. (2020) también estudian reducir los daños por frío (DPF) mediante la aplicación en precosecha de jasmonato de metilo (JaMe) en la granada 'Mollar de Elche'. Las condiciones de almacenamiento son similares al presente estudio, conservando las granadas a 2°C y exponiéndolas a condiciones de vida útil (shelf-life) durante el mismo periodo de tiempo para manifestar los síntomas de daños por frío. Sin embargo, la

concentración del elicitor (5 mM) en su estudio es mucho mayor que la utilizada en el presente trabajo (0,1 μM), lo que resulta en un índice de DPF significativamente menor, aunque también cabría considerar que son reguladores del crecimiento vegetal distintos. En su estudio, los granados tratados alcanzaron un valor final de 1 para la corteza externa y de 2 para la interna a los 90 días, mientras que con nuestra concentración de 0,1 μM se alcanzaron valores de 3 en ambos casos (**Figura 16A y B**). Se podría concluir que la reducción del impacto de los daños por frío (DPF) en la granada 'Mollar de Elche' depende del elicitor empleado, la concentración aplicada y las condiciones de almacenamiento ensayadas.

Respecto a la fuga de electrolitos, expresada en porcentaje (%), mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los frutos control y los tratados en el momento de la recolección (día 0) y tras el periodo de almacenamiento prolongado (90 días en frío). En el momento de la recolección, se obtuvo un valor de 39% para las granadas control frente al 25% en el caso de los frutos tratados con brasinoesteroides, reduciéndose significativamente ($p < 0,05$) la fuga de electrolitos por parte del tratamiento (**Figura 17A**).

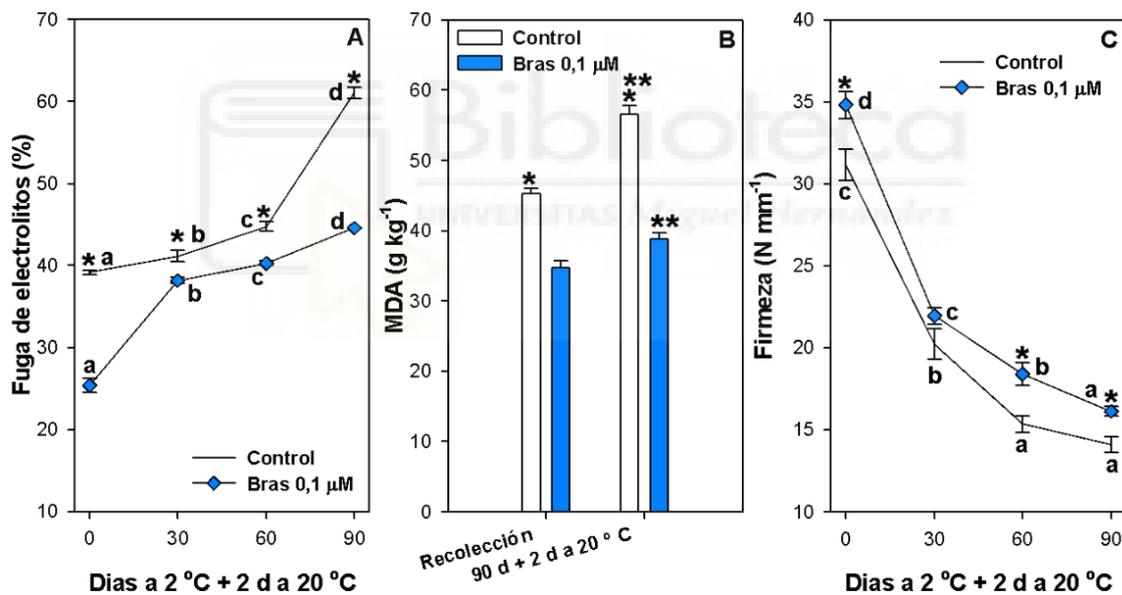


Figura 17. Efecto del tratamiento precosecha con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 μM sobre la fuga de electrolitos (A), el contenido de ácido malondialdehído (MDA) en el momento de la recolección y tras 90 días a 2 °C + 2 d a 20 °C (B) y la firmeza (C) de la granada 'Mollar de Elche' durante su almacenamiento.

No obstante, cabe señalar que en el control entre el día 0 y los 90 días, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en cuanto al porcentaje de fuga de electrolitos en comparación con los tratados, cuyo incremento fue menos pronunciado hasta casi alcanzar el valor del día 60 de los frutos control, lo cual se traduce en un incremento de la vida útil del fruto por parte del tratamiento precosecha (**Figura 17A**). Específicamente, se pudo apreciar cómo en el control, el porcentaje se acentuó alcanzándose el 60% de fuga de electrolitos que,

partiendo del valor de los 60 días, se podría decir que se incrementó en casi un 20% durante los últimos 30 días del almacenamiento en frío. Respecto a los frutos tratados, el incremento del porcentaje de la fuga entre los 60 y 90 días de almacenamiento fue significativamente ($p < 0,05$) inferior, dándose un incremento de tan sólo un 5% (**Figura 17A**).

De este modo, se podría decir que el tratamiento reduce de forma efectiva la fuga de electrolitos transcurridos los 30 días de refrigeración, a diferencia del control en el que el daño en la membrana celular empeora tras los últimos 30 días del experimento. De modo que se puede afirmar que el tratamiento contribuye al mantenimiento de una mejor calidad de la membrana celular del fruto a lo largo del tiempo de almacenamiento prolongado en frío, reduciendo la fuga de los electrolitos con respecto al control. Resultados similares se han observado en un estudio previo, donde obtuvieron el mismo porcentaje de fuga de electrolitos ($\approx 40\%$) al final de la conservación en frío tras la aplicación de brasinoesteroides a la concentración de $10 \mu\text{M}$, reduciéndose dicho parámetro en un 20-30% por parte del tratamiento.

En cuanto a la producción de ácido malondialdehído (MDA), expresada en g kg^{-1} , se realizaron dos cuantificaciones: en el momento de la recolección y tras 90 días de conservación en frío. Los resultados mostraron que las granadas control presentaban una producción de MDA significativamente ($p < 0,05$) superior a las que fueron tratadas con brasinoesteroides, tanto en el momento de la recolección como tras el final de la conservación postcosecha (**Figura 17B**). En este sentido, en el momento de la recolección, el control presentó un contenido de 45 g kg^{-1} de MDA, mientras que los tratados mostraron un nivel de 35 g kg^{-1} , siendo dicho valor significativamente inferior ($p < 0,05$). Estos resultados indican que en un inicio los frutos tratados con brasinoesteroides presentaron una producción de MDA del 22% inferior a los frutos control. Tras 90 días de almacenamiento (**Figura 17B**), la producción de MDA del control se incrementó unos 10 g kg^{-1} con respecto al momento de la recolección ($p < 0,05$). Sin embargo, en el caso de los tratados, el incremento fue menor en comparación al momento de la recolección, incrementándose en 3 g kg^{-1} ($p < 0,05$). Por tanto, se pudo concluir que el tratamiento con brasinoesteroides a la concentración de $0,1 \mu\text{M}$ reduce la producción de MDA, permaneciendo relativamente constante a lo largo del almacenamiento en frío. Consecuentemente, el daño oxidativo en el grupo de los frutos tratados fue significativamente inferior debido a que el MDA es el producto final de la peroxidación lipídica y puede servir como marcador del estrés oxidativo.

En un estudio reciente, Islam et al. (2022) también evaluaron la producción de MDA durante la conservación en frío de la granada y obtuvieron resultados similares, aunque dicha producción fue mucho más controlada en el presente estudio con la aplicación de

brasinoesteroides 0,1 μM a lo largo del tiempo de almacenamiento. Estos resultados sugieren que, a pesar del estrés oxidativo que sufre la granada durante el almacenamiento a 2 °C, la 24-epibrasinólida aplicada en precosecha reduce significativamente el incremento de la producción de MDA. Este parámetro, junto con la fuga de electrolitos, está altamente relacionado con el grado de integridad y funcionalidad de las membranas celulares y los daños por frío (DPF) en los frutos (Babalar et al., 2018).

Respecto a la firmeza, expresada en N mm^{-1} , se observó una tendencia propiamente descendiente durante el periodo de conservación para ambos tratamientos estudiados. Las granadas tratadas presentaron un nivel de firmeza significativamente ($p < 0,05$) superior que el control en el momento de la recolección: 35 frente 31 N mm^{-1} , respectivamente (**Figura 17C**). Tras los 30 días de almacenamiento, el control sufrió una disminución significativa de su firmeza hasta el día 60 en comparación con los frutos tratados, cuya disminución fue menor. El control pasó de 21 a 16 N mm^{-1} mientras que los tratados de 22 a 19 N mm^{-1} en el momento de la recolección. Tras 90 días, los controles obtuvieron una firmeza alrededor de 15 N mm^{-1} mientras que en los tratados la firmeza final fue de 17 N mm^{-1} . Se observó que el tratamiento retrasó de forma significativa ($p < 0,05$) las pérdidas de firmeza que ocurren durante el periodo de la senescencia de la granada (**Figura 17C**).

Se puede concluir que, a pesar de que durante los primeros y últimos 30 días de almacenamiento las granadas tratadas experimentan una mayor pérdida de firmeza, esta disminuye de forma más paulatina en comparación con el control. El control presenta una firmeza menor durante todo el experimento, lo que se traduce en una calidad inferior. Los resultados obtenidos acerca de la evolución del parámetro de firmeza fueron similares a los observados por García-Pastor et al. (2020b), donde: la firmeza sufre un descenso progresivo durante todo el almacenamiento en frío tanto en el caso del control como los tratados, siendo este más pronunciado durante los primeros 30 días del experimento y manteniéndose de forma casi estable y constante hasta el día 90 (**Figura 17C**).

b. Influencia del tratamiento precosecha sobre la tasa de respiración, las pérdidas de peso y el color externo

Respecto a la tasa de respiración expresada en $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (**Figura 18A**), se vio incrementada en ambos casos, tanto en las granadas control como en las tratadas. Los dos grupos de estudio siguieron una pauta similar de evolución con diferencias claramente significativas ($p < 0,05$) a partir del día 30 de almacenamiento, donde los frutos tratados presentaron una tasa de respiración significativamente inferior ($p < 0,05$).

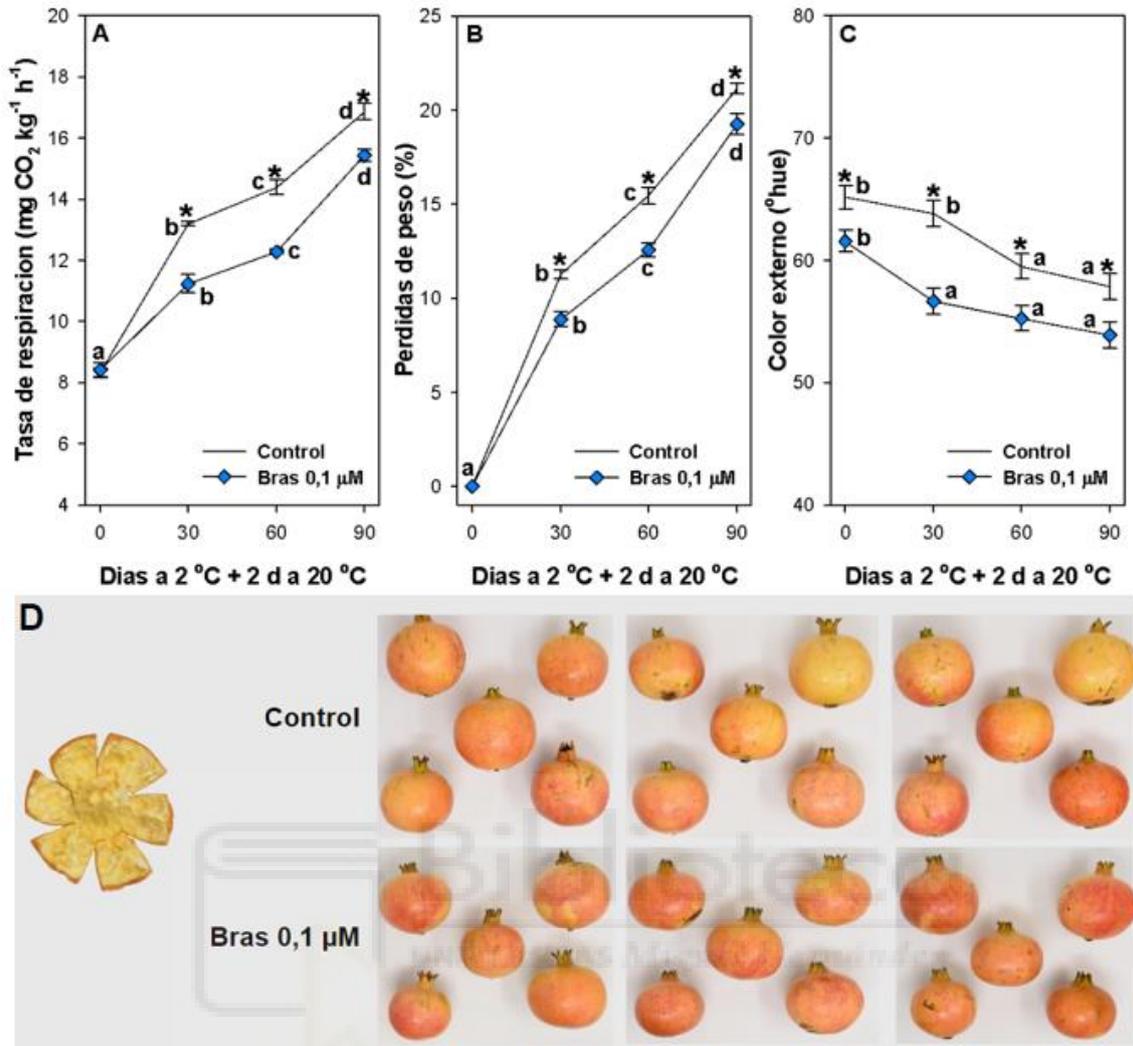


Figura 18. Efecto del tratamiento precosecha con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de $0,1 \mu\text{M}$ sobre la tasa de respiración (A), las pérdidas de peso (B) y el color externo (C y D) de la granada 'Mollar de Elche' durante su almacenamiento a $2^\circ\text{C} + 2 \text{ d a } 20^\circ\text{C}$.

A los 30 días de almacenamiento, el control presentó una tasa de respiración significativamente ($p < 0,05$) superior ($11 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en comparación con el tratado ($9 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Tras 60 días, se mantuvo la diferencia previamente existente entre ambos grupos ($p < 0,05$). De este modo, el control mostró una mayor tasa de respiración, a pesar de que hubiese progresado de forma menos abrupta que tras los primeros 30 días. Sin embargo, se observó un incremento más pronunciado en la tasa de respiración en los frutos tratados en comparación con el control, pasando de 12 a $19 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entre los 60 y 90 días de almacenamiento en frío. Esta diferencia fue de aproximadamente de $2 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respecto al grupo control, que alcanzó los $21 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Se podría afirmar que las granadas tratadas presentaron una menor tasa de respiración y, por ende, una menor actividad metabólica con respecto al control (Figura 18A).

De este modo, la aplicación en precosecha de 0,1 μM de Bras consiguió el mismo efecto que el observado con jasmonato de metilo (JaMe) por García-Pastor et al. (2020b), disminuyendo la tasa de respiración a lo largo del almacenamiento en postcosecha.

También se evaluaron las pérdidas de peso expresadas en porcentaje (%) (**Figura 18B**). Al igual que ocurre con la tasa de respiración, ambos grupos (control y tratados) mostraron un incremento similar a lo largo de la conservación ($p < 0,05$). Sin embargo, el control experimentó a lo largo del almacenamiento una pérdida de peso significativamente ($p < 0,05$) superior respecto a las granadas tratadas. Se estimó que al día 90, las granadas control habían disminuido en aproximadamente un 21% desde el momento de su recolección, frente a las granadas tratadas que mostraron pérdidas de peso entorno a un 19% con respecto a su peso inicial. Como se observó en el parámetro anterior, las pérdidas de peso fueron más notables tras los 60 y 90 días de análisis en el caso de los frutos tratados, siendo más acentuada la pérdida de peso para el control a lo largo de los 60 días de almacenamiento (**Figura 18B**).

En el estudio de Islam et al. (2022), la pérdida de peso se vio incrementada de forma sustancial a lo largo del almacenamiento y fue significativamente menor en las granadas sometidas al tratamiento con respecto al control, ocurriendo lo mismo que en los resultados mostrados en la **Figura 18B**. Durante los 60 días de experimento las granadas con el tratamiento prosiguieron de forma similar a los resultados mostrados por las granadas tratadas con jasmonato de metilo (JaMe) en el estudio de García-Pastor et al. (2020a) y mostrando una mayor diferencia significativa con estos en los últimos 30 días de almacenamiento.

Atendiendo a la evolución del color externo de la granada expresado en ángulo hue ($^{\circ}$ hue), se observó que la diferencia más notable entre el control y los tratados ocurrió en el día 30 del experimento ($p < 0,05$). Los frutos tratados sufrieron un cambio de color hacia el rojo más pronunciado en comparación con el grupo control (**Figura 18C**). Sabiendo que valores de $^{\circ}$ hue cercanos a 0° indican colores más rojos, se concluyó que, en la corteza externa, las granadas tratadas presentaron colores más rojo-anaranjados (entre 60° y 55° hue) desde el día de recolección y durante todo el periodo de almacenamiento en frío, ya que obtuvieron valores más bajos de $^{\circ}$ hue en comparación con el control, que presentó colores más amarillentos (**Figura 18D**). Se pudo visualizar por las fotografías presentadas en la **Figura 18D** que el tratamiento a la concentración de 0,1 μM fue capaz de proporcionar un mayor color rojizo a las granadas, además de mantenerlo durante el almacenamiento en frío, a diferencia del grupo control.

c. Influencia del tratamiento precosecha sobre el color interno, el contenido de sólidos solubles totales (SST) y la acidez total (AT)

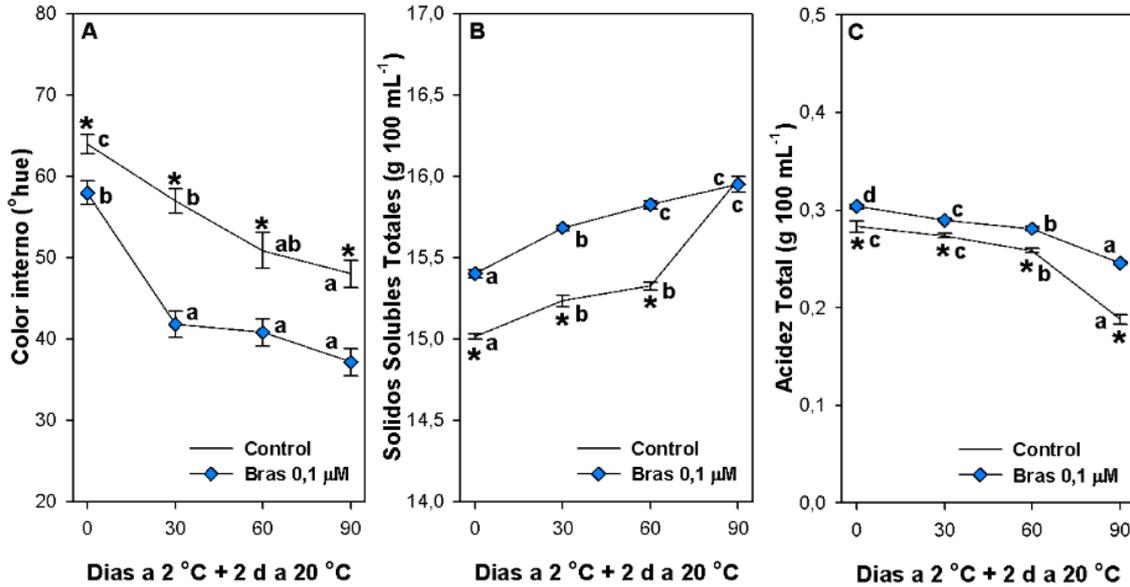


Figura 19. Efecto del tratamiento precosecha con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 μM sobre el color interno (A), el contenido de sólidos solubles totales (B) y la acidez total (C) de la granada 'Mollar de Elche' durante su almacenamiento a 2 °C + 2 d a 20 °C.

Respecto al color interno, se observó una evolución bastante similar a la del color externo (**Figura 19A**). Los frutos tratados presentaron valores de ° hue inferiores al control (60 ° frente a 65 ° hue). A partir del día 30, no sólo presentaron colores más rojizos, debido a un descenso de 16 ° hue respecto al día 0, sino que también lo mantuvieron alrededor de 40 ° hue y es por ello por lo que no se dieron diferencias significativas ($p > 0,05$) durante los últimos 60 días del almacenamiento en frío. Sin embargo, en el caso del control, sí hubo diferencias significativas entre los distintos días de muestreo ($p < 0,05$). Por lo tanto, se pudo concluir que efectivamente, el tratamiento con Bras es capaz de mantener el color interno de la granada a pesar de almacenarse a temperaturas subóptimas, lo que supone una ventaja comercial frente a las granadas que no reciben tratamiento alguno (Dhumal et al., 2022). Concorde al estudio de Xu et al. (2022), en el que se realizó un experimento sobre las semillas del árbol *Toona sinensis* que también presentan un color rojizo como el de la granada, se confirmó que la aplicación de brasinoesteroides mantuvo la calidad del color a lo largo del almacenamiento.

Respecto al contenido de sólidos solubles totales (SST), expresado en $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$, se observó que el control mantuvo unos valores bastante estables y sin mostrar diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los 30 y 60 días de almacenamiento con un valor de $15,25 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ (**Figura 19B**). Sin embargo, se observó un incremento muy pronunciado en los últimos 30 días alcanzando un valor de $15,9 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ al igual que los frutos tratados. En

cuanto a los tratados, el incremento del contenido de SST fue mucho menos pronunciado ($p < 0,05$) y siempre presentó valores superiores al control durante todo el almacenamiento (alrededor de $0,5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ más), exceptuando su final donde no se vio diferencia significativa entre ambos grupos. Por tanto, una mayor proporción de azúcares de las granadas tratadas a lo largo de la conservación en frío indica que son organolépticamente superiores a las granadas control.

Respecto a la acidez total (AT), expresada en $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$, se observó que las granadas tratadas mantuvieron de forma casi constante los valores de acidez a lo largo de todo el almacenamiento ($0,3 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$), a pesar de mostrar diferencias significativas entre los distintos días de tratamiento (**Figura 19C**). A diferencia de estas, el control presenta una caída de acidez de $0,1 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ durante los últimos dos muestreos ($p < 0,05$). De acuerdo con Dhumal et al. (2022), las granadas tratadas mantuvieron una mejor calidad organoléptica de sus arilos, ya que este fruto se caracteriza por tener un cierto matiz de sabor ácido. En caso de la granda 'Mollar de Elche', el ácido más abundante es el ácido málico (García-Pastor et al., 2020). La pérdida gradual de la acidez en el caso del control supondría en una menor aceptación en el mercado.

d. Influencia del tratamiento precosecha sobre la actividad antioxidante total hidrosoluble y el contenido de antocianinas y fenoles totales

En relación con el contenido de antocianinas totales, expresado en $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$, se observó que para ambos grupos de estudio se dio un incremento significativo a lo largo de su almacenamiento desde el día de recolección ($p < 0,05$) (**Figura 20A**). Las granadas tratadas ya presentaron en el día 0 un contenido muy superior con $8 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ frente a las granadas control con $5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. En el caso del control, la acumulación de antocianinas alcanzó a los 90 días el mismo valor inicial de las granadas tratadas. Mientras tanto, las granadas tratadas incrementaron significativamente su contenido en $2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ durante los últimos 30 días del experimento, alcanzándose un total de $10 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

En el estudio de García-Pastor et al. (2020), donde se aplicó en precosecha jasmonato de metilo (JaMe), se estableció una relación entre el contenido de antocianinas y la reducción del valor del $^{\circ}$ hue: a mayor reducción del ángulo, mayor contenido de antocianinas totales. Los resultados de sus experimentos en granada 'Mollar de Elche' coinciden con los obtenidos en el presente trabajo puesto que también se observó una relación entre la disminución del ángulo hue y el incremento del contenido de antocianinas.

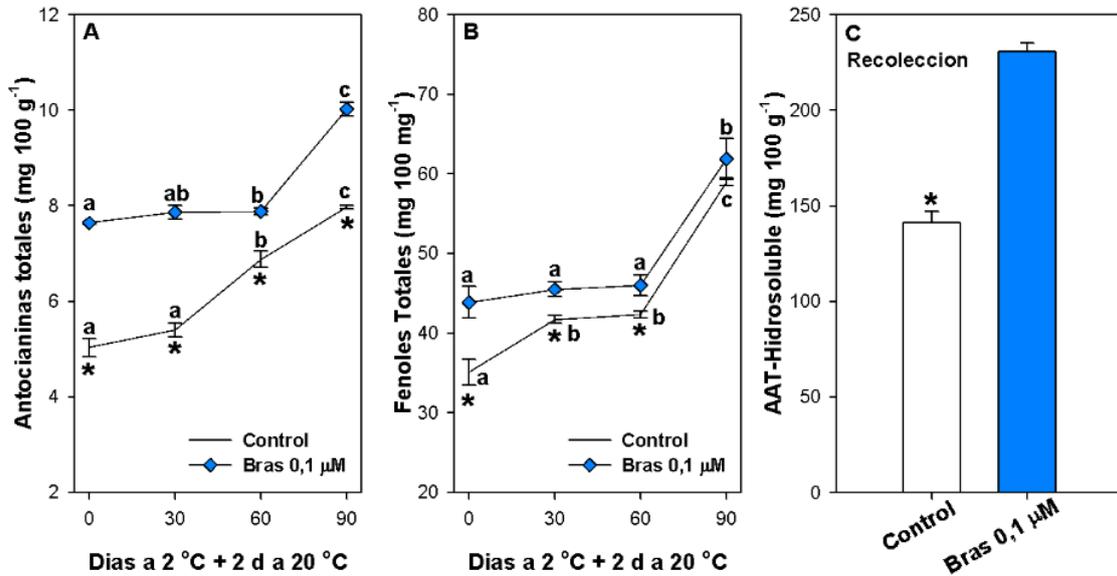


Figura 20. Efecto del tratamiento precosecha con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 µM sobre antocianinas totales (A), fenoles totales (B) y la actividad antioxidante hidrosoluble total (C) de la granada 'Mollar de Elche' durante su almacenamiento a 2 °C + 2 d a 20 °C.

Respecto a los fenoles totales, expresados en mg 100 g⁻¹, siguen un patrón muy similar que en el caso de las antocianinas (**Figura 20B**). Se observó que, para ambos grupos, el incremento fue muy pronunciado entre los días 60 y 90 del experimento ($p < 0,05$). El contenido de fenoles totales para los tratados fue constante durante 60 días con un valor de 45 mg 100 g⁻¹, sin diferencias significativas, mientras que, a los 90 días, aumentaron unos 20 mg 100 g⁻¹ su contenido en fenoles alcanzándose el valor de 62 mg 100 g⁻¹. En el caso del grupo control, el contenido en fenoles siempre fue inferior a pesar de que el incremento de su contenido en fenoles fuese ligeramente superior.

Sobre la actividad antioxidante total hidrosoluble, expresada en mg 100 g⁻¹, y cuyos datos se tomaron exclusivamente el día de recolección, se mostró que las granadas tratadas con brasinoesteroides presentan una mayor actividad antioxidante que las granadas control ($p < 0,05$) (**Figura 20C**). Mientras que las primeras, consiguieron un valor de 225 mg 100 g⁻¹, el control presentó un 33,3% menos de actividad antioxidante. Estos resultados concuerdan con los obtenidos respecto al contenido de antocianinas y fenoles totales.

Comparando los resultados de este estudio con la investigación realizada por Saba y Zarei (2019), se observa que ambos confirman que tanto el contenido de fenoles como la actividad antioxidante de las granadas (AAT-H), bajo la influencia de elicitores vegetales, fueron superiores a los frutos control durante la conservación en frío. Estos hallazgos también concuerdan con los resultados reportados por García-Pastor et al. (2020). Como se mencionó anteriormente, los elicitores actúan mediante la interacción con receptores específicos (Eder y Cosio, 1994), los cuales activan la expresión de la enzima PAL (fenilalanina amonio-liasa),

responsable de la síntesis de fenoles y la producción de antocianinas en diversas frutas (**Figura 3**). Así, cuanto mayor sea la concentración de fenoles y de antocianinas el poder antioxidante de la granada será superior y, por tanto, los consumidores obtendrán mayores beneficios para su salud (Gil et al., 2000).

e. Influencia del tratamiento precosecha sobre el contenido de antocianinas y azúcares y ácidos orgánicos individuales

En cuanto al contenido de antocianinas individuales, expresado en mg 100 g⁻¹, un total de 6 antocianinas fueron identificadas y cuantificadas mediante HPLC en función del tiempo de retención tal y como se observó en el cromatograma (**Figura 21A y B**).

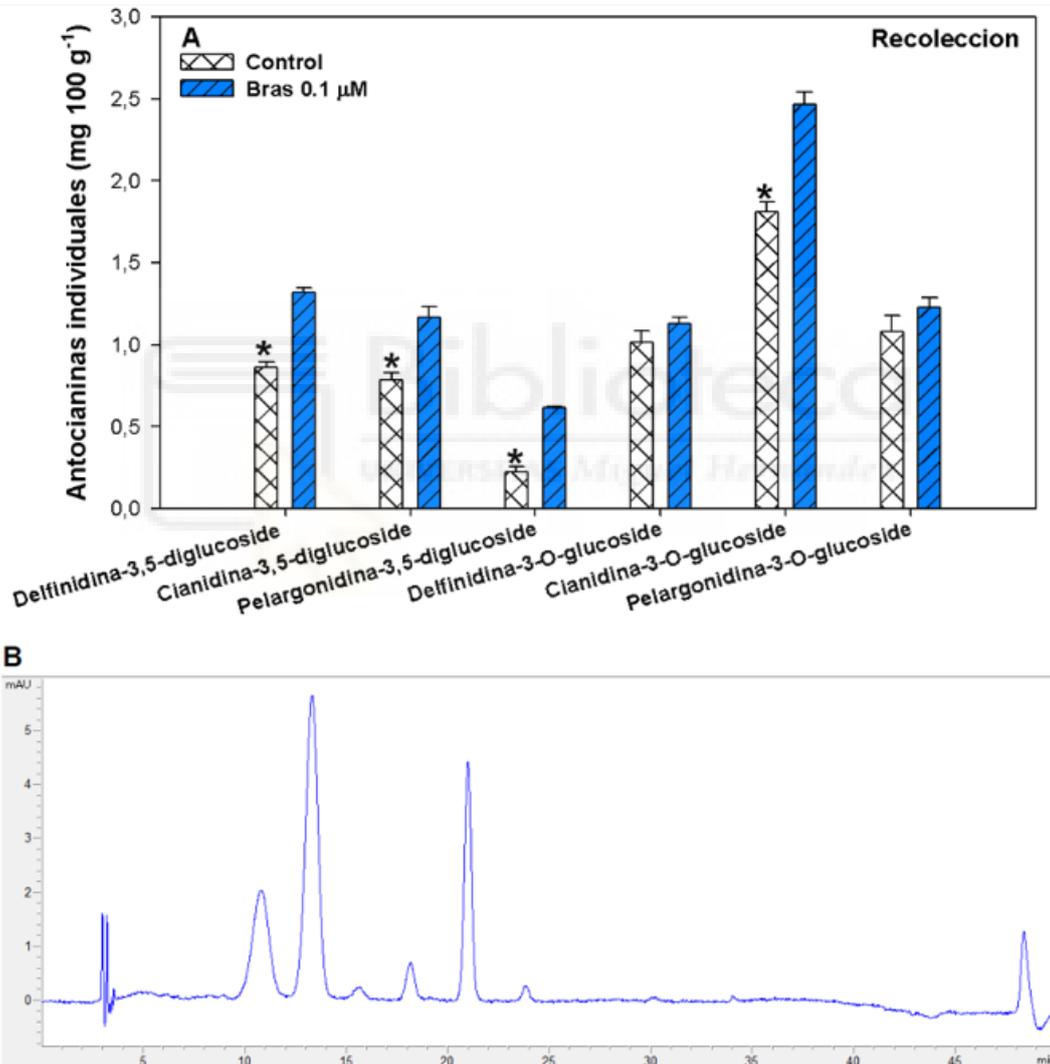


Figura 21. Efecto del tratamiento precosecha con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 μM sobre el contenido de antocianinas individuales (**A**) y cromatograma con los tiempos de retención para cada compuesto detectado por HPLC (**B**) de la granada 'Mollar de Elche' en el momento de su recolección.

Las antocianinas identificadas fueron: Delfinidina-3,5-diglucoside (10,78 min), Cianidina-3,5-diglucoside (13,29 min), Pelargonidina-3,5-diglucoside (15,65 min), Delfinidina-3-O-glucoside (18,17 min), Cianidina-3-O-glucoside (20,98 min), Pelargonidina-3-O-glucoside (23,79 min). De entre ellas, la Cianidina-3-O-glucoside fue la antocianina más representativa, tanto en el grupo control como en las tratadas.

Se pudo observar que el tratamiento con brasinoesteroides potenció en general el contenido de cada una de las antocianinas individuales estudiadas. Especialmente en el caso de la Cianidina-3-O-glucoside, la Delfinidina-3,5-diglucoside, la Cianidina-3,5-diglucoside y la Pelargonidina-3,5-diglucoside observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control (**Figura 21A**). Sin embargo, no se determinaron diferencias significativas en el caso de la Delfinidina-3-O-glucoside y la Pelargonidina-3-O-glucoside.

Analizando el perfil de antocianinas individuales del artículo de García-Pastor et al. (2019), se mostró que a diferencia del tratamiento con jasmonato de metilo (JaMe), la antocianina que más se vio estimulada con brasinoesteroides fue la Delfinidina-3,5-diglucoside siendo la segunda más abundante mientras que las granadas tratadas con MeJa la presentaron a baja concentración. Los frutos tratados por MeJa sufrieron un incremento de la concentración de la Cianidina-3-O-glucoside de unos 2 mg 100 g⁻¹ con respecto al control, mientras que con brasinoesteroides a 0,1 μM el incremento fue de 0,7 mg 100 g⁻¹. Cabe destacar, que ninguno de los dos tratamientos fue capaz de estimular de forma significativa la acumulación de Pelargonidina-3-O-glucoside.

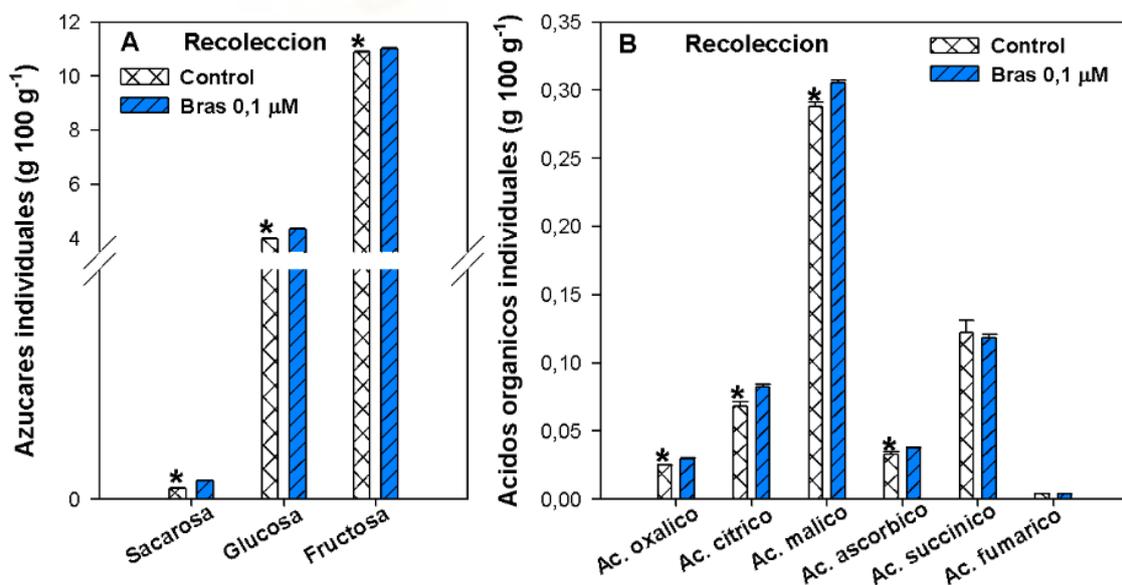


Figura 22. Efecto del tratamiento precosecha con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 μM sobre el contenido de azúcares individuales (A) y ácidos orgánicos individuales (B) de la granada 'Mollar de Elche' en el momento de su recolección.

En el caso de los azúcares individuales, expresados en g 100 g⁻¹, se observaron diferencias significativas entre el control y los frutos tratados ($p < 0,05$) (**Figura 22A**). En el grupo de los tratados, el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa fue ligeramente superior en comparación con el grupo control. En el día 0 las granadas tratadas presentaron 5 g 100 g⁻¹ de glucosa y 11 g 100 g⁻¹ de fructosa. Respecto a los ácidos orgánicos individuales, expresados en g 100 g⁻¹, se apreciaron diferencias significativas para cada uno de los cuantificados ($p < 0,05$) a excepción de los ácidos succínico y fumárico (**Figura 22B**).

De acuerdo con estudios previos en granada 'Mollar de Elche' (García-Pastor et al., 2019) también se observó que de entre los azúcares, la fructosa era el azúcar mayoritario seguido de la glucosa. A pesar de ello, se vio que el tratamiento con el jasmonato de metilo (JaMe) no otorgó diferencias significativas atribuidas al tratamiento o al almacenamiento a 10 °C durante 60 días. Otro estudio de García-Pastor et al. (2020b), donde se empleó ácido oxálico (OA) sólo consiguió que se dieran diferencias significativas en el caso de la glucosa, mientras que para la fructosa y la sacarosa no ($p > 0,05$). Por tanto, podemos decir que el tratamiento con brasinoesteroides (Bras) a la concentración de 0,1 µM sí fue capaz de estimular la acumulación de fructosa y glucosa (**Figura 22A**).

Por medio de los resultados obtenidos en el trabajo de García-Pastor et al. (2019) con jasmonato de metilo (JaMe), se comprobó que el ácido predominante era el málico, seguido del succínico y del cítrico. Además, el tratamiento del presente estudio con brasinoesteroides en precosecha tampoco fue capaz de ofrecer diferencias significativas para el ácido fumárico ($p > 0,05$) con respecto al control. Sin embargo, únicamente con brasinoesteroides se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en caso del ácido oxálico (**Figura 22B**).

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Tras la discusión de los resultados obtenidos para la realización del presente trabajo se pudo afirmar que verdaderamente la aplicación de brasinoesteroides (Bras) reduce la incidencia de daños por frío (DPF) en la granada 'Mollar de Elche' durante la conservación postcosecha.

- ◆ Redujo el daño celular y oxidativo significativamente puesto que tanto la fuga de electrolitos ($p < 0,05$) como la producción de malondialdehído (MDA) ($p < 0,05$).
- ◆ Preservó de forma significativa ($p < 0,05$) tanto la firmeza como el color externo e interno, y, por tanto, la calidad del fruto.
- ◆ Disminuyó notablemente ($p < 0,05$) las pérdidas de peso y la tasa de respiración de los frutos, lo que indica una mejor retención de la humedad y menor actividad metabólica, respectivamente.

- ◆ Tuvo efectos positivos sobre los atributos organolépticos de la granada manteniendo su sabor dulce y astringente, así como consiguió un retraso significativo ($p < 0,05$) en la degradación de su color.
- ◆ Incrementó de forma significativa ($p < 0,05$) el contenido de antocianinas y fenoles conforme el paso del tiempo proporcionando una mayor actividad antioxidante.
- ◆ Aumentó el contenido de cada una de las antocianinas individuales estudiadas ($p < 0,05$), especialmente la Cianidina-3-O-glucoside.
- ◆ Incrementó el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa significativamente ($p < 0,05$) además de los ácidos málico y oxálico.

Así, se plantean las posibles líneas de investigación futura: Extender el estudio sobre otras frutas para evaluar el efecto y la efectividad de los brasinoesteroides en diferentes condiciones de cultivo y almacenamiento; analizar los efectos a largo plazo del uso de este compuesto en la calidad postcosecha y vida útil de las frutas; estudiar la concentración óptima para cada fruto y determinar el momento de aplicación que ofrezca mayores beneficios; y fomentar la colaboración entre los agricultores, la industria agrícola y las instituciones de investigación con el fin de desarrollar prácticas agrícolas sostenibles y alcanzar una agricultura más resiliente.

6. AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 'PROMETEO 2021/089 - *Innovative and eco-friendly pre- and postharvest strategies with natural compounds to improve quality of fruits*' financiado por la Generalitat Valenciana (GVA), al grupo de Post-recolección de Frutas y Hortalizas de la UMH y a la empresa Hebegu S.L. (Albatera, Alicante) por el material vegetal suministrado y el asesoramiento técnico.

7. BIBLIOGRAFÍA

Artés, F., Tudela, J. A., & Gil, M. I. (1998). Improving the keeping quality of pomegranate fruit by intermittent warming. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung. B, Referate Und Lebensmittelrecht*, 207(4), 316-321. <https://doi.org/10.1007/s002170050339>

Aviram, M., Dornfeld, L., Kaplan, M., Coleman, R., Gaitini, D., Nitecki, S., Hofman, A., Rosenblat, M., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Hayek, T., & Fuhrman, B. (2002). Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *PubMed*, 28(2-3), 49-62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12224378>

Babalar, M., Pirzad, F., Sarcheshmeh, M. A. A., Talaei, A., & Lessani, H. (2018). Arginine treatment attenuates chilling injury of pomegranate fruit during cold storage by enhancing antioxidant system activity. *Postharvest Biology And Technology*, 137, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.012>

Dhumal, S. S., Pawar, R. D., & Patil, S. S. (2022). Post-Harvest Management and Value Addition in Pomegranate. En *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105113>

- Eder, J., & Cosio, E. G. (1994).** Elicitors of Plant Defense Responses. En *International review of cytology* (pp. 1-36). [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62404-3](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62404-3)
- Elyatem, S. M., & Kader, A. A. (1984).** Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. *Scientia Horticulturae*, 24(3-4), 287-298. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(84\)90113-4](https://doi.org/10.1016/0304-4238(84)90113-4)
- Esteban Alcaraz, J. (2023).** *Aplicación de brasinoesteroides en precosecha para la mejora de la calidad físico-química y funcional de la granada Mollar de Elche* [Trabajo Fin de Grado] Universidad Miguel Hernández de Elche
- Fang, R., Lv, G., Zhang, X., Chen, J., Chen, X., & Wang, B. (2023).** Preharvest 24-epibrassinolide treatment prolongs harvest duration and shelf life in sweet corn. *Food Chemistry. Molecular Sciences*, 7, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2023.100179>
- Gao, H., Kang, L., Liu, Q., Cheng, N., Wang, B., & Cao, W. (2014).** Effect of 24-epibrassinolide treatment on the metabolism of eggplant fruits in relation to development of pulp browning under chilling stress. *Journal Of Food Science And Technology/Journal Of Food Science And Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1402-y>
- García-Pastor, M. E., Giménez, M. J., Valverde, J. M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D., & Zapata, P. J. (2020b).** Preharvest Application of Oxalic Acid Improved Pomegranate Fruit Yield, Quality, and Bioactive Compounds at Harvest in a Concentration-Dependent Manner. *Agronomy*, 10(10), 1522. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101522>
- García-Pastor, M. E., Serrano, M., Guillén, F., Giménez, M. J., Martínez-Romero, D., Valero, D., & Zapata, P. J. (2019).** Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture/Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 100(1), 145-153. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10007>
- García-Pastor, M. E., Serrano, M., Guillén, F., Zapata, P. J., & Valero, D. (2020a).** Preharvest or a combination of preharvest and postharvest treatments with methyl jasmonate reduced chilling injury, by maintaining higher unsaturated fatty acids, and increased aril colour and phenolics content in pomegranate. *Postharvest Biology And Technology*, 167, 111226. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111226>
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000).** Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>
- Giraldo, G. (2002).** Poscosecha de frutos tropicales. Informe sobre la Industria Hortícola. *Horticultura Revista de Industria Distribución y Socioeconomía*, 154-160. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint%5Chortint_2002_E_154_161BIS.pdf
- Gómez, P. A., & Artés, F. (2004).** Controlled atmospheres enhance postharvest green celery quality. *Postharvest Biology And Technology*, 34(2), 203-209. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.04.007>
- Islam, M., Ali, S., Nawaz, A., Naz, S., Ejaz, S., Shah, A. A., & Razzaq, K. (2022).** Postharvest 24-epibrassinolide treatment alleviates pomegranate fruit chilling injury by regulating proline metabolism and antioxidant activities. *Postharvest Biology And Technology*, 188, 111906. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111906>
- Liu, Q., Guo, X., Du, J., Guo, Y., Guo, X., & Kou, L. (2023).** Comparative analysis of husk microstructure, fruit quality and concentrations of bioactive compounds of different

pomegranate cultivars during low temperature storage. *Food Bioscience*, 52, 102400. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102400>

Lorente-Mento, J. M., Carrión-Antolí, A., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., & Martínez-Romero, D. (2023a). Relationship among Sugars, Organic Acids, Mineral Composition, and Chilling Injury Sensitivity on Six Pomegranate Cultivars Stored at 2 °C. *Foods*, 12(7), 1364. <https://doi.org/10.3390/foods12071364>

Lorente-Mento, J. M., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Ruiz-Aracil, M. C., Valero, D., & Guillén, F. (2023b). The Simultaneous Use of 1-Methylcyclopropene and Methyl Jasmonate Vapor as an Innovative Strategy for Reducing Chilling Injury and Maintaining Pomegranate Fruit Quality at Suboptimal Temperatures. *Foods*, 13(1), 60. <https://doi.org/10.3390/foods13010060>

Maghoumi, M., Amodio, M. L., Cisneros-Zevallos, L., & Colelli, G. (2023). Prevention of Chilling Injury in Pomegranates Revisited: Pre- and Post-Harvest Factors, Mode of Actions, and Technologies Involved. *Foods*, 12(7), 1462. <https://doi.org/10.3390/foods12071462>

Manghwar, H., Hussain, A., Ali, Q., & Liu, F. (2022). Brassinosteroids (BRs) Role in Plant Development and Coping with Different Stresses. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(3), 1012. <https://doi.org/10.3390/ijms23031012>

Marangoni, A., Palma, T., & Stanley, D. (1996). Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology And Technology*, 7(3), 193-217. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00042-9](https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00042-9)

Martínez-Esplá, A., García-Pastor, M. E., Zapata, P. J., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., & Gironés-Vilaplana, A. (2017a). Preharvest application of oxalic acid improves quality and phytochemical content of artichoke (*Cynara scolymus* L.) at harvest and during storage. *Food Chemistry*, 230, 343-349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.051>

Martínez-Esplá, A., Zapata, P. J., Valero, D., García-Viguera, C., Castillo, S., & Serrano, M. (2014b). Preharvest Application of Oxalic Acid Increased Fruit Size, Bioactive Compounds, and Antioxidant Capacity in Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.). *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 62(15), 3432-3437. <https://doi.org/10.1021/jf500224g>

Mincuzzi, A., Sanzani, S. M., Palou, L., Ragni, M., & Ippolito, A. (2022). Postharvest Rot of Pomegranate Fruit in Southern Italy: Characterization of the Main Pathogens. *Journal Of Fungi*, 8(5), 475. <https://doi.org/10.3390/jof8050475>

Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiology*, 180(3), 1246-1250. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>

Nanda, S., Rao, D. S., & Krishnamurthy, S. (2001). Effects of shrink film wrapping and storage temperature on the shelf life and quality of pomegranate fruits cv. Ganesh. *Postharvest Biology And Technology*, 22(1), 61-69. [https://doi.org/10.1016/s0925-5214\(00\)00181-2](https://doi.org/10.1016/s0925-5214(00)00181-2)

PubChem Structure Search. (2024). National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponible online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi> (consultado el 15 de junio de 2024).

R (UE) 2016/ 83. (2016). 'Mollar De Elche' Pomegranate (POD). Disponible online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32016R0083> (consultado el 19 de junio de 2024).

Saba, M. K., & Zarei, L. (2019). Preharvest methyl jasmonate's impact on postharvest chilling sensitivity, antioxidant activity, and pomegranate fruit quality. *Journal Of Food Biochemistry*, 43(3), e12763. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12763>

Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz-Mula, H. M., & Serrano, M. (2011b). Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biology And Technology*, 60(2), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.12.012>

Serna-Escolano, V., Martínez-Romero, D., Giménez, M. J., Serrano, M., García-Martínez, S., Valero, D., Valverde, J. M., & Zapata, P. J. (2021). Enhancing antioxidant systems by preharvest treatments with methyl jasmonate and salicylic acid leads to maintain lemon quality during cold storage. *Food Chemistry*, 338, 128044. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128044>

Serna-Escolano, V., Valverde, J. M., García-Pastor, M. E., Valero, D., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Zapata, P. J., & Serrano, M. (2019). Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(11), 5035-5043. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9746>

Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M. T., Romojaro, F., & Flores, F. B. (2009). Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture/Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 89(4), 555-573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3468>

Siboza, X. I., Bertling, I., & Odindo, A. O. (2014). Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). *Journal Of Plant Physiology*, 171(18), 1722-1731. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.05.012>

Srivastava, L. M. (2002). Brassinosteroids. En *Elsevier eBooks* (pp. 205-215). <https://doi.org/10.1016/b978-012660570-9/50150-7>

Superficies y producciones anuales de cultivos. (2023, noviembre 14). <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>

Tibullo, D., Caporarello, N., Giallongo, C., Anfuso, C. D., Genovese, C., Arlotta, C., Puglisi, F., Parrinello, N. L., Bramanti, V., Romano, A., Lupo, G., Toscano, V., Avola, R., Brundo, M. V., Di Raimondo, F., & Raccuia, S. A. (2016). Antiproliferative and Antiangiogenic Effects of *Punica granatum* Juice (PGJ) in Multiple Myeloma (MM). *Nutrients*, 8(10), 611. <https://doi.org/10.3390/nu8100611>

Wang, Q., Ding, T., Gao, L., Pang, J., & Yang, N. (2012). Effect of brassinolide on chilling injury of green bell pepper in storage. *Scientia Horticulturae*, 144, 195-200. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.018>

Xu, X., Guo, C., Ma, C., Li, M., Chen, Y., Liu, C., Chu, J., & Yao, X. (2022). Brassinolide Soaking Reduced Nitrite Content and Extended Color Change and Storage Time of *Toona sinensis* Bud during Low Temperature and Near Freezing-Point Temperature Storage. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(21), 13110. <https://doi.org/10.3390/ijms232113110>

Ye, J., Li, J., Han, X., Zhang, L., Jiang, T., & Xia, M. (2012). Effects of Active Modified Atmosphere Packaging on Postharvest Quality of Shiitake Mushrooms (*Lentinula edodes*) Stored at Cold Storage. *Journal Of Integrative Agriculture/Journal Of Integrative Agriculture*, 11(3), 474-482. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(12\)60033-1](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(12)60033-1)