



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

TRATAMIENTOS PRECOSECHA CON MELATONINA Y GABA Y OTRAS ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN PARA INCREMENTAR LA CALIDAD DE LA GRANADA

JOSE MANUEL LORENTE MENTO

Directora de la tesis

Dra. Dña. María Serrano Mula

Codirector de la tesis

Dr. D. Antonio Fabián Guillén Arco



La Dra. Dña. **María Serrano Mula**, directora, y el Dr. D. **Antonio Fabián Guillén Arco**, codirector de la Tesis Doctoral titulada **“Tratamientos precosecha con melatonina y GABA y otras estrategias de conservación para incrementar la calidad de la granada”**.

INFORMAN:

Que D. **Jose Manuel Lorente Mento** ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Tratamientos precosecha con melatonina y GABA y otras estrategias de conservación para incrementar la calidad de la granada”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en _____ a ____ de _____ de 202__.

Directora de la tesis

Dra. Dña. María Serrano Mula

Codirector de la tesis

Dr. D. Antonio Fabián Guillén Arco



La **Dra. Dña. Juana Fernández López**, Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

INFORMA:

Que D. **Jose Manuel Lorente Mento** ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “**Tratamientos precosecha con melatonina y GABA y otras estrategias de conservación para incrementar la calidad de la granada**” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en _____ a ____ de _____ de 202__.

Profa. Dra. Dña. Juana Fernández López

Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,
Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA)

*“El aprendizaje
nunca agota la mente”*

— Leonardo da Vinci —



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra forma, han contribuido al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, deseo agradecer al Dr. D. Daniel Valero Garrido, director del grupo de Postrecolección de Frutas y Hortalizas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, por brindarme la oportunidad de formar parte de este equipo. Su apoyo y el hecho de estar siempre presente cuando lo he necesitado han sido pilares fundamentales a lo largo de este proceso."

En segundo lugar, quiero dedicar unas palabras a mi directora, codirector y tutor ya que gracias a ellos ha sido posible llevar a cabo este trabajo.

Dra. Dña. María Serrano Mula, gracias por todo lo que me has enseñado a lo largo de estos años de doctorado. Tu profesionalidad ha sido un modelo a seguir, permitiéndome adquirir conocimientos y habilidades que han fortalecido mi formación. Quiero resaltar también tu cercanía y constante disposición para brindar apoyo, especialmente en los momentos más desafiantes de este proceso. Tu dedicación y paciencia han marcado de manera significativa mi trayectoria, tanto a nivel académico como personal, y siempre te estaré profundamente agradecido.

Dr. D. Antonio Fabián Guillén Arco, todavía recuerdo aquella conversación en la cafetería donde me planteaste la posibilidad de trabajar juntos. Aquel momento marcó el inicio de una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida profesional, y no podría estar más agradecido por ello. Tu profesionalidad, energía positiva, sentido del humor y dedicación han sido un ejemplo constante a seguir. Gracias a ti, no solo he crecido académica y profesionalmente, sino que también he encontrado en este camino una motivación adicional para afrontar cada reto con confianza. Además, siempre recordaré con especial afecto los trayectos compartidos entre Orihuela y Alcoy. Esos momentos, llenos de conversaciones y risas, hicieron que esta etapa fuese aún más especial. Tu apoyo y amistad han sido invaluable, y nunca dejaré de apreciarlo.

Dr. D. Domingo Jesús Martínez Romero, quiero agradecerte sinceramente por todo lo que me has enseñado día a día durante este tiempo. Personalmente, considero que eres una de las personas más nobles, sinceras y de buen corazón que he tenido la suerte de conocer a lo largo de mi trayectoria académica. Es cierto que en algunas ocasiones hemos tenido diferencias de perspectiva, pero eso nunca ha empañado el profundo respeto y admiración que siento hacia ti. Tus valores humanos y tu integridad destacan en cada acción, y han dejado una huella imborrable. No cambies nunca.

Dr. D. Juan Miguel Valverde, Dr. D. Pedro Zapata, Dr. D. Salvador Castillo y Dra. Dña. Huertas Díaz, quisiera expresar mi profundo agradecimiento a cada uno de vosotros. De diferentes maneras, habéis contribuido significativamente a que esta etapa sea una experiencia enriquecedora y memorable. Cada uno de vosotros, con vuestro conocimiento, dedicación y cercanía, habéis aportado algo único que ha hecho de este camino una etapa llena de aprendizajes y gratitud.

En tercer lugar, y por ello no menos importante, también quiero dar las gracias a mis compañeros de trabajo, que en algunas ocasiones hemos compartido momentos tanto fuera como dentro del laboratorio. Jénifer Puente, Fernando Garrido, Alberto Guirao, Alicia Dobón, María José Giménez, María Gutiérrez, Marina Giménez Berenguer, Vicente Serna, María Celeste Ruiz, Marta Almansa, Ander Solana... y, sobre todo, a los siguientes compañeros:

Luciana, fuiste mi primera compañera de trabajo, y ello tiene un significado muy especial para mí, algo que siempre llevaré en mi memoria. Aunque el tiempo que compartimos fue breve, fue suficiente para descubrir en ti a una persona con grandes valores humanos, alguien que deja huella en quienes tienen la suerte de conocerte.

Iasmina Madalina, por ser una compañera extraordinaria, siempre auténtica y cercana. Gracias por tu carisma, por tu simpatía, y por una amistad que nunca olvidaré, mereu mă vei avea alături atunci când vei avea nevoie.

Fátima Badiche, gracias por los momentos compartidos y por todo el tiempo que hemos pasado juntos, tanto en el laboratorio como en el campo. Ha sido un verdadero placer conocerte, aprender de ti y compartir tantas experiencias. Como te dije en una ocasión, tu presencia y compañerismo han marcado una gran diferencia, como te dije una vez هنا لديك صديق.

Alba Robles por tu gran ayuda, tu dedicación y lo trabajadora que siempre has sido. Pero, sobre todo, por la gran persona que eres y esa sonrisa que tenías en cada momento, capaz de alegrar cualquier situación.

María Emma García, gracias por tu ayuda incondicional, por aclarar cualquier duda que tuve durante el desarrollo de los experimentos, y por hacer que las cosas difíciles parecieran fáciles. Aprecio profundamente la dedicación y la pasión que pones en tu trabajo, que son una inspiración para quienes te rodeamos.

Alberto Carrión, a ti no te considero un compañero, sino un AMIGO con mayúsculas. No creo que existan palabras suficientes para describir a la gran persona que eres. Gracias por ser tan legal, responsable, sincero, sencillo, noble, y por tu generosidad en todos los aspectos. Eres un amigo de tus amigos, siempre dispuesto a dar sabios consejos, escuchar con paciencia y compartir tu opinión con respeto. Personalmente, te considero un gran profesional, pero aún mejor persona, con valores humanos que son dignos de admiración. Siempre serás el chico de las cerezas, y quiero que sepas que puedes contar conmigo siempre para lo que necesites.

Muchas gracias a todos por todo...

Declaración sobre el uso de imágenes generadas por Inteligencia Artificial

En el marco del desarrollo de mi tesis doctoral, titulada “**Tratamientos precosecha con melatonina y GABA y otras estrategias de conservación para incrementar la calidad de la granada**”, he decidido incorporar imágenes generadas mediante herramientas de inteligencia artificial (*Bing Image Creator: <https://www.bing.com/create> y ChatGPT: <https://openai.com/chatgpt>*) para enriquecer el contenido y dotar al documento de un aspecto visual más atractivo. Estas imágenes han sido creadas con el objetivo de complementar y mejorar la presentación de los temas tratados, ofreciendo un recurso visual que facilite la comprensión de conceptos y proporcione una experiencia más dinámica al lector.

Es importante señalar que las imágenes generadas por inteligencia artificial son representaciones gráficas y artísticas basadas en descripciones proporcionadas por el autor, y no pretenden sustituir datos científicos ni representar información empírica de manera estricta. Por ello, deben interpretarse como recursos visuales complementarios al contenido textual.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias al apoyo de diversos proyectos financiados por el **Ministerio de Ciencia e Innovación y la Comisión Europea**, con fondos FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional), en el marco del proyecto RTI2018-099664-B-100. Del mismo modo, se expresa un reconocimiento especial a la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) por la concesión de la **Beca Predoctoral** (Contrato de Personal Investigador en Formación) otorgada al estudiante Jose Manuel Lorente Mento, cuyo respaldo ha sido fundamental para el desarrollo de esta investigación.

La presente Tesis Doctoral, titulada “**Tratamientos precosecha con melatonina y GABA y otras estrategias de conservación para incrementar la calidad de la granada**”, se desarrolla bajo la modalidad de tesis por compendio. Este formato integra y se fundamenta en un conjunto de publicaciones científicas que abordan los principales objetivos y avances de la investigación. Estas publicaciones, debidamente revisadas y aprobadas en el ámbito académico, constituyen la base sólida y rigurosa sobre la cual se articula el presente trabajo, permitiendo una visión global e integral del tema tratado.

- I. Lorente-Mento, J. M., Carrión-Antolí, A., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., & Martínez-Romero, D. (2023). Relationship among sugars, organic acids, mineral composition, and chilling injury sensitivity on six pomegranate cultivars stored at 2 °C. *Foods*, *12*(23), 1364.
doi: <https://doi.org/10.3390/foods12071364>
- II. Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valverde, J. M., Valero, D., & Serrano, M. (2021). Melatonin treatment to pomegranate trees enhances fruit bioactive compounds and quality traits at harvest and during postharvest storage. *Antioxidants*, *10*(8), 820.
doi: <https://doi.org/10.3390/antiox10060820>
- III. Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Carrión-Antolí, A., Valero, D., & Serrano, M. (2023). γ -Aminobutyric acid treatments of pomegranate trees increase crop yield and fruit quality at harvest. *Scientia Horticulturae*, *309*, 111633.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111633>
- IV. Lorente-Mento, J. M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Badiche, F., Serrano, M., & Guillén, F. (2023). Preharvest multiple applications of GABA improve quality traits and antioxidant compounds of pomegranate fruit during storage. *Horticulturae*, *9*(5), 534.
doi: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050534>
- V. Lorente-Mento, J. M., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Ruiz-Aracil, M. C., Valero, D., & Guillén, F. (2024). 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.
doi: <https://doi.org/10.3390/foods13010060>
- VI. Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Valverde, J. M., Valero, D., Badiche, F., Robles, A., Díaz-Mula, H. M., Serrano, M., & Martínez-Romero, D. (2024). Chilling injury control in pomegranate fruit with compostable stretchable skin film. *Scientia Horticulturae*, *323*, 112480. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112480>

ÍNDICE DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES

I

Relationship among sugars, organic acids, mineral composition, and chilling injury sensitivity on six pomegranate cultivars stored at 2 °C

- AUTORES -

Lorente-Mento, J. M., Carrión-Antolí, A., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., & Martínez-Romero, D.

- REVISTA -

Foods

- DOI -

10.3390/foods12071364

- AÑO DE PUBLICACIÓN -

2023

CATEGORÍA JCR®: Food Science and Technology

EDITORIAL: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)

ISSN: 2304-8158

QUARTIL: Q1

RANGO: 38/173

FACTOR DE IMPACTO: 4,7 (2023)

CITESCORE: 7,4



Melatonin treatment to pomegranate trees enhances fruit bioactive compounds and quality traits at harvest and during postharvest storage

- AUTORES -

Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valverde, J. M., Valero, D., & Serrano, M.

- REVISTA -

Antioxidants

- DOI -

10.3390/antiox10060820

- AÑO DE PUBLICACIÓN -

2021

CATEGORÍA JCR®: Food Science & Technology

EDITORIAL: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)

ISSN: 2076-3921

QUARTIL: Q1

RANGO: 20/173

FACTOR DE IMPACTO: 6,0 (2023)

CITESCORE: 10,6



γ -Aminobutyric acid treatments of pomegranate trees increase crop yield and fruit quality at harvest

- AUTORES -

Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Carrión-Antolí, A., Valero, D., & Serrano, M.

- REVISTA -

Scientia Horticulturae

- DOI -

10.1016/j.scienta.2022.111633

- AÑO DE PUBLICACIÓN -

2023

CATEGORÍA JCR®: Horticulture

EDITORIAL: Elsevier

ISSN: 1879-1018

QUARTIL: Q1

RANGO: 6/38

FACTOR DE IMPACTO: 3,9 (2023)

CITESCORE: 8,6



Preharvest multiple applications of GABA improve quality traits and antioxidant compounds of pomegranate fruit during storage

- AUTORES -

Lorente-Mento, J. M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Badiche, F., Serrano, M., & Guillén, F.

- REVISTA -

Horticulturae

- DOI -

10.3390/horticulturae9050534

- AÑO DE PUBLICACIÓN -

2023

CATEGORÍA JCR®: Horticulture

EDITORIAL: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)

ISSN: 2311-7524

QUARTIL: Q1

RANGO: 7/38

FACTOR DE IMPACTO: 3,1 (2023)

CITESCORE: 3,5



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

- AUTORES -

Lorente-Mento, J. M., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Ruiz-Aracil, M. C., Valero, D., & Guillén, F.

- REVISTA -

Foods

- DOI -

10.3390/foods13010060

- AÑO DE PUBLICACIÓN -

2024

CATEGORÍA JCR®: Food Science & Technology

EDITORIAL: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)

ISSN: 2304-8158

QUARTIL: Q1

RANGO: 38/173

FACTOR DE IMPACTO: 4,7 (2023)

CITESCORE: 7,4



Chilling injury control in pomegranate fruit with compostable stretchable skin film.

- AUTORES -

Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Valverde, J. M., Valero, D., Badiche, F., Robles, A.,
Díaz-Mula, H. M., Serrano, M., & Martínez-Romero, D.

- REVISTA -

Scientia Horticulturae

- DOI -

10.1016/j.scienta.2023.112480

- AÑO DE PUBLICACIÓN -

2024

CATEGORÍA JCR®: Horticulture

EDITORIAL: Elsevier

ISSN: 1879-1018

QUARTIL: Q1

RANGO: 6/38

FACTOR DE IMPACTO: 3,9 (2023)

CITESCORE: 8,6





El viaje milenario de la **granada...** de fruto sagrado a tesoro de Elche...

En la antigua Grecia, la granada no solo era apreciada por su sabor y beneficios nutricionales, sino que estaba profundamente entrelazada con las creencias mitológicas y religiosas de la época. El fruto de la granada simbolizaba la vida, la fertilidad y la regeneración. Uno de los mitos más conocidos asociados a la granada es el de Perséfone, hija de Deméter, la diosa de la agricultura y la cosecha. En este mito, Hades, dios del inframundo, secuestró a Perséfone para hacerla su reina. Durante su estancia en el inframundo, Perséfone comió seis arillos de granada, lo que la ató a pasar seis meses del año en el inframundo y los otros seis en la Tierra con su madre. Este mito era utilizado para explicar el ciclo de las estaciones: durante los meses en los que Perséfone está en el inframundo, su madre, en señal de duelo, provoca el invierno al detener el crecimiento de los cultivos, mientras que su regreso marca el comienzo de la primavera y la renovación de la vida. Además del mito de Perséfone, la granada jugaba un papel importante en los rituales funerarios griegos. Era costumbre ofrecer granadas en las tumbas para simbolizar la vida después de la muerte, ya que los griegos creían que el fruto tenía el poder de garantizar una buena fortuna en el más allá. También se incluía en las ceremonias matrimoniales como símbolo de fertilidad y buena fortuna, debido a la abundancia de semillas que contenía cada fruto.



En la antigua Roma, la granada era conocida como *malum punicum*, o "manzana púnica", en referencia a su origen en la región de Cartago. Al igual que los griegos, los romanos consideraban la granada un símbolo de abundancia, fertilidad y longevidad, y



estaba presente en diversas facetas de la vida cotidiana, desde la medicina hasta el arte y la religión. Uno de los aspectos más interesantes de la granada en la antigua Roma era su uso medicinal. Los médicos romanos valoraban las propiedades curativas del fruto, especialmente sus efectos astringentes. El zumo de granada se utilizaba para tratar problemas digestivos y como remedio para las inflamaciones. Asimismo, las cáscaras secas se molían y se empleaban en pomadas y ungüentos para

curar heridas y combatir infecciones y en el ámbito cosmético, las mujeres romanas usaban extracto de granada para embellecer su piel. La granada también tenía un fuerte componente simbólico en la vida pública romana. El fruto se asociaba con Juno, la diosa del matrimonio, y se le ofrecían granadas en templos para pedir protección sobre las uniones conyugales. Los frescos y mosaicos de las villas romanas a menudo representaban granadas entre motivos de jardines, destacando la importancia de este fruto en la iconografía romana como símbolo de riqueza y prosperidad. También aparecía en los ritos, especialmente en bodas y celebraciones familiares, como una forma de asegurar la continuidad de la vida y la procreación.

Hoy día, la granada ha ganado una notable popularidad en todo el mundo, no solo por su sabor único, sino por su amplia gama de beneficios para la salud gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antienvjecimiento, convirtiéndola en un alimento clave dentro de las dietas saludables y preventivas. En el ámbito cultural, continúa siendo un símbolo emblemático en diversas tradiciones contemporáneas. En Irán, ocupa un lugar especial en las bodas tradicionales. Es costumbre que las parejas recién casadas compartan este fruto como un símbolo de fertilidad y amor eterno. En Turquía, por otro lado, romper una granada durante el Año Nuevo es una práctica profundamente arraigada. Se cree que la cantidad de semillas que se dispersan simboliza la abundancia, la salud y la prosperidad que el hogar recibirá en el año entrante. En India, la granada se integra en rituales religiosos y familiares como una ofrenda a las deidades, ya que se le atribuye un fuerte vínculo con la fertilidad, la longevidad y la pureza.

La Granada Mollar de Elche: Un tesoro de la huerta valenciana.

En España, la variedad de granada Mollar de Elche destaca por su sabor dulce, y su corteza y arilos de color rosa suave. Esta variedad, cultivada en la región de Elche, cuenta con la Denominación de Origen Protegida (DOP) desde 2016, lo que resalta su importancia no solo como producto agrícola, sino también como símbolo cultural de la zona.

El cultivo de la granada Mollar tiene una historia que se remonta a siglos, y su vínculo con la región alicantina ha sido inquebrantable. El clima cálido y seco de la zona, combinado con los suelos fértiles, crea el entorno ideal para el cultivo de este fruto. Además, la cosecha de la granada Mollar se ha convertido en una parte esencial de la vida en Elche,

con festividades locales que celebran su recolección cada año. Entre estas tradiciones destaca el Misteri d'Elx, una obra sacra que data de la Edad Media y que ha sido declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO. El Misteri d'Elx tiene una conexión simbólica con la granada ya que se emplea un mecanismo llamado "Mangrana" durante la representación. Este dispositivo, con forma de esfera granate y dorada, evoca visualmente la fruta de la granada y refuerza un vínculo cultural entre esta obra sacra y el fruto emblemático de Elche, la granada Mollar.



La Mangrana, al descender desde la cúpula para saludar a la Virgen María y entregarle una palma dorada, se convierte en un símbolo que entrelaza elementos religiosos y culturales, destacando la identidad local de Elche tanto en el ámbito espiritual como en el agrícola. La granada Mollar de Elche, con su calidad excepcional y su reconocimiento a nivel nacional e internacional, no solo representa una fuente de ingresos para la zona, sino también una conexión con las raíces históricas y culturales de Elche.



ÍNDICE GENERAL

	Página
Estructura de la Tesis Doctoral.....	1
Resumen / Abstract.....	3
Listado de abreviaturas y siglas.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 Origen, distribución geográfica y morfología del granado.....	18
1.2 Variedades de granadas y clasificación.....	19
1.3 Producción y exportación de granada en el mundo.....	20
1.4 Producción y superficie cultivada de granada en España.....	22
1.5 Granada cv. "Mollar de Elche" [R (UE) 2016/83].....	23
1.6 Composición de la granada.....	24
1.6.1 Sólidos solubles totales, ph y acidez titulable.....	25
1.6.2 Ácidos grasos.....	25
1.6.3 Azúcares.....	25
1.6.4 Vitaminas y minerales.....	26
1.7 Propiedades funcionales de la granada.....	26
1.7.1 Punicalaginas.....	27
1.7.2 Antocianinas.....	28
1.7.3 Ácido elágico.....	28
1.8 Maduración de la granada en el árbol.....	30
1.9 Cambios durante la posrecolección.....	31
1.10 Estrategias de conservación de la granada.....	32
1.10.1 Temperatura y humedad relativa.....	32
1.10.2 Envasado en atmósfera modificada.....	33
1.10.3 Envasado de los frutos en plásticos biodegradables.....	34
1.10.4 Recubrimientos comestibles.....	37

1.10.5 1-Metilciclopropeno (1-MCP).....	38
1.11 <i>Tratamientos innovadores: elicitores</i>	40
1.11.1 <i>Jasmonato de metilo (JaMe)</i>	42
1.11.2 <i>Salicilatos</i>	45
1.12 <i>Melatonina y ácido γ-aminobutírico (GABA)</i>	46
1.12.1 <i>Melatonina</i>	47
1.12.1.1 <i>Biosíntesis de la melatonina en plantas</i>	48
1.12.1.2 <i>Importancia de la melatonina en la maduración de los frutos</i>	49
1.12.2 <i>Ácido γ-aminobutírico (GABA)</i>	53
1.12.2.1 <i>Biosíntesis del ácido γ-aminobutírico (GABA) en las plantas</i>	54
1.12.2.2 <i>Efectos del ácido γ-aminobutírico (GABA) en los frutos</i>	56
2. OBJETIVOS	60
3. MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.1 <i>Material vegetal y diseño experimental</i>	63
3.1.1 <i>Tratamientos y concentraciones empleados en prerecolección</i>	65
3.1.2 <i>Tratamientos y concentraciones empleados en posrecolección</i>	65
3.1.3 <i>Almacenamiento y conservación de los frutos</i>	67
3.2 <i>Rendimiento del cultivo: kg por árbol y número de frutos por árbol</i>	67
3.3 <i>Pérdida de peso</i>	67
3.4 <i>Tasa de respiración y concentración de CO₂ y O₂ en el interior de los frutos</i>	68
3.5 <i>Color de la corteza externa, interna y de los arilos</i>	68
3.6 <i>Firmeza</i>	69
3.7 <i>Índice de daños por frío</i>	69
3.8 <i>Toma de muestras para las siguientes determinaciones analíticas</i>	70
3.9 <i>Fuga de electrolitos</i>	70
3.10 <i>Contenido de malondialdehído (MDA)</i>	70

3.11 Sólidos solubles totales, acidez titulable e índice de madurez.....	71
3.12 Contenido de ácidos orgánicos y azúcares.....	71
3.13 Composición mineral.....	72
3.14 Cuantificación de polifenoles y antocianinas totales.....	72
3.15 Determinación y cuantificación de antocianinas individuales.....	73
3.16 Cuantificación de la actividad total antioxidante	74
3.17 Análisis estadístico	74
4. PUBLICACIONES.....	75
4.1 Publicación I	76
4.2 Publicación II.....	95
4.3 Publicación III.....	110
4.4 Publicación IV.....	120
4.5 Publicación V.....	135
4.6 Publicación VI.....	151
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	162
5.1 Efecto de los tratamientos sobre el rendimiento del cultivo.....	163
5.2 Efecto de los tratamientos sobre la calidad organoléptica del fruto.....	165
5.2.1 Pérdida de peso.....	166
5.2.2 Firmeza.....	168
5.2.3 Tasa de respiración.....	170
5.2.4 Color.....	172
5.2.5 Sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT).....	175
5.2.6 Daños por frío.....	177
5.3 Efecto de los tratamientos sobre la calidad funcional del fruto.....	182
6. CONCLUSIONES.....	188
7. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	193
6. BIBLIOGRAFÍA.....	196

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
FIGURAS	
<i>Figura 1:</i> Cultivo de la granada cv. “Mollar de Elche” (A) y partes del interior del fruto (B). Muestra: granada cv. “Mollar de Elche” Fuente: Elaboración propia (A) e Imagen adaptada de Melgarejo et al., 2022 (B).....	19
<i>Figura 2:</i> Principales países productores de granada en el mundo. Año de producción, hectáreas, producción total y fuente. Los resultados se expresan en toneladas (t). Fuentes: elaboración propia.....	21
<i>Figura 3:</i> Producción total de granada en el año 2019 en India, China, Irán, Turquía y Egipto (A) y producción destinada a exportación (B). Los resultados expresados en toneladas (t). Fuente: MAPA (2023).....	22
<i>Figura 4:</i> Superficie dedicada al cultivo del granado expresado en hectáreas (A), producción total de granadas (B) y principales Comunidades Autónomas productoras de granada expresado en porcentaje (C) en España. Los resultados de superficie y producción corresponden desde el año 2010 al 2021 y el porcentaje de producción de las principales Comunidades Autónomas al año 2021. Fuente: MAPA (2023).....	23
<i>Figura 5:</i> Etapas de desarrollo de la granada Mollar de Elche. Fuente: elaboración propia..	24
<i>Figura 6:</i> Principales compuestos fenólicos en la fruta de la granada. Fuente: Imagen adaptada de Viuda-Martos et al., 2010; Al-Muammar y Khan 2012; Rothwell et al., 2013; Viladomiu et al., 2013; Zarfeshany et al., 2014 y Zhao et al., 2014.	29
<i>Figura 7:</i> Representación esquemática de los diferentes tipos de estrés en plantas. Fuente: Imagen adaptada de Alnefaie et al. (2023).....	42
<i>Figura 8:</i> Participación de Jasmonatos a señales de desarrollo y medio ambiente. Fuente: Imagen adaptada de Li et al. (2018) y Pan et al. (2020).....	44
<i>Figura 9:</i> Biosíntesis de la melatonina en plantas a partir del triptófano. Fuente: Imagen adaptada de Tan et al. (2013) y Mannino et al. (2021).....	49
<i>Figura 10:</i> Vía metabólica del ácido γ -aminobutírico (GABA). Fuente: Imagen adaptada de Bouché et al. (2023).....	55

<i>Figura 11: Estudios que conforman la presente Tesis Doctoral durante diferentes campañas agrícolas.....</i>	64
<i>Figura 12: Escala hedónica de 5 puntos, donde 1 (sin síntomas), 2 (1-10 %), 3 (11-30 %), 4 (31-50 %) y 5 (> 50 %). Fuente: Imagen adapta de García-Pastor et al. (2020).....</i>	69

TABLAS

<i>Tabla 1: Clasificación de las diferentes variedades de granada en España. Fuente: Melgarejo et al. (2010).....</i>	20
<i>Tabla 2: Revisión bibliográfica del efecto de la melatonina aplicada como tratamiento precosecha en diferentes frutas y hortalizas. Fuente: elaboración propia.....</i>	51
<i>Tabla 3: Revisión bibliográfica del efecto de la melatonina aplicada como tratamiento poscosecha en diferentes frutas y hortalizas. Fuente: elaboración propia.....</i>	52
<i>Tabla 4: Revisión bibliográfica de los efectos del GABA aplicado como tratamiento precosecha en diferentes especies vegetales. Fuente: elaboración propia.....</i>	58
<i>Tabla 5: Revisión bibliográfica de los efectos del GABA aplicado como tratamiento poscosecha en diferentes especies vegetales. Fuente: elaboración propia.....</i>	59
<i>Tabla 6: Composición, tasa de transmisión de CO₂, O₂ y vapor de agua de las películas plásticas empleadas para el envasado de los frutos.....</i>	66

ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

Esta Tesis Doctoral ha sido organizada conforme a la normativa de la Universidad Miguel Hernández para la presentación de Tesis Doctorales en formato de Compendio de Publicaciones y se presenta de la siguiente manera:

Resumen / Abstract: Se ha expuesto un resumen conciso de los resultados más relevantes de la presente investigación doctoral.

Introducción: Esta Tesis Doctoral analiza en profundidad el cultivo del granado, abordando su origen, distribución geográfica y características morfológicas. Se ha estudiado la relevancia de las variedades comerciales más importantes y los factores que influyen en su calidad y composición química. Se contextualiza la importancia de la granada en los mercados nacionales e internacionales, subrayando su valor socioeconómico y su potencial funcional en la mejora de la salud y la nutrición. Además, se han investigado los cambios fisiológicos durante la maduración y la poscosecha, así como los tratamientos innovadores con elicitores y estrategias de conservación como el envasado en atmósferas modificadas.

Objetivos: En este apartado se han definido tanto el objetivo general como los objetivos específicos de la investigación.

Materiales y Métodos: Se ha descrito de forma resumida el material vegetal utilizado, el diseño experimental correspondiente a los tratamientos analizados, así como los métodos analíticos empleados para la realización de los experimentos que forman parte de esta Tesis Doctoral.

Resultados (Publicaciones): Se incluyen las 6 publicaciones utilizadas en esta Tesis Doctoral en el siguiente orden.

- Lorente-Mento, J. M., Carrión-Antolí, A., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., & Martínez-Romero, D. (2023). Relationship among sugars, organic acids, mineral composition, and chilling injury sensitivity on six pomegranate cultivars stored at 2 °C. *Foods*, 12(20), 1364.

<https://doi.org/10.3390/foods12071364>

- Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valverde, J. M., Valero, D., & Serrano, M. (2021). Melatonin treatment to pomegranate trees enhances fruit bioactive compounds and quality traits at harvest and during postharvest storage. *Antioxidants*, 10(8), 820.
<https://doi.org/10.3390/antiox10060820>
- Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Carrión-Antolí, A., Valero, D., & Serrano, M. (2022). γ -Aminobutyric acid treatments of pomegranate trees increase crop yield and fruit quality at harvest. *Scientia Horticulturae*, 306, 111633.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111633>
- Lorente-Mento, J. M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Badiche, F., Serrano, M., & Guillén, F. (2023). Preharvest multiple applications of GABA improve quality traits and antioxidant compounds of pomegranate fruit during storage. *Horticulturae*, 9(5), 534.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae9050534>
- Lorente-Mento, J. M., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Ruiz-Aracil, M. C., Valero, D., & Guillén, F. (2024). 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>
- Lorente-Mento, J. M., Guillén, F., Valverde, J. M., Valero, D., Badiche, F., Robles, A., Díaz-Mula, H. M., Serrano, M., & Martínez-Romero, D. (2023). Chilling injury control in pomegranate fruit with compostable stretchable skin film. *Scientia Horticulturae*, 329, 112480.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112480>

Discusión de resultados: En este apartado se exponen, analizan y discuten los resultados clave obtenidos a lo largo de esta investigación.

Conclusiones: Se han descrito las principales conclusiones alcanzadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Futuras líneas de investigación: se detallan las posibles estrategias de conservación para mejorar la calidad poscosecha de las granadas, adaptándolas a las demandas del mercado y a la sostenibilidad ambiental.

Bibliografía: se ha incluido la bibliografía utilizada en la redacción y justificación de la presente Tesis Doctoral.

RESUMEN

La presente tesis doctoral se centra en desarrollar y evaluar estrategias para mejorar el color de la granada cv. “Mollar de Elche” y reducir los daños por frío durante el almacenamiento poscosecha, dos factores clave que influyen en la calidad y comercialización de este fruto. En este contexto, resulta importante realizar una caracterización entre diferentes variedades de granada. Este análisis comparativo es fundamental para identificar las variedades que presentan una mayor resistencia al frío y las que muestran un mejor comportamiento en términos de calidad visual, especialmente en el color.

La decisión de incluir varias variedades, como Wonderful, Kingdom, Bigful, Acco, Purple Queen y Mollar de Elche, permite observar de manera detallada cómo cada cultivar responde a las bajas temperaturas y al daño por frío, lo que contribuye a entender mejor las diferencias intrínsecas entre ellos. Este enfoque proporciona un marco de referencia para seleccionar las variedades más prometedoras en términos de conservación poscosecha, lo que posteriormente permite enfocar las estrategias de mejora específicamente en la granada Mollar de Elche, buscando potenciar su resistencia al frío y mejorar su color, aspectos esenciales para su comercialización y aceptación por parte de los consumidores.

La conservación poscosecha de la granada presenta diversos desafíos, especialmente debido a su sensibilidad a las temperaturas subóptimas que pueden desencadenar daños por frío y afectar negativamente la calidad del fruto. Los estudios que se presentan permiten desarrollar un conjunto de estrategias para abordar estos problemas, enfocándose en cómo las diferentes variedades de granada responden a las bajas temperaturas, así como en la aplicación de tratamientos innovadores que mejoran la resistencia del fruto y prolongan su vida útil. Estas estrategias incluyen el uso en precosecha de melatonina y ácido γ -aminobutírico (GABA), así como en poscosecha de 1-MCP, jasmonato de metilo (JaMe) y el envasado con películas biodegradables, destacando la importancia de preservar la calidad del fruto desde la cosecha hasta su almacenamiento prolongado.

En este contexto, se estudiaron seis variedades de granada y se evaluó su respuesta a los daños por frío durante el almacenamiento a bajas temperaturas. Las variedades evaluadas fueron Wonderful, Kingdom, Bigful, Acco, Purple Queen y Mollar de Elche. El experimento consistió en almacenar las granadas a temperaturas inferiores a 5 °C y posteriormente exponerlas a 20 °C durante dos días para simular las condiciones comerciales de almacenamiento. Los resultados mostraron una gran variabilidad en la sensibilidad a los daños por frío entre los cultivares. La granada cv. “Kingdom” fue la más sensible, mientras que la variedad Mollar de Elche demostró ser la más resistente al frío, lo que subraya la importancia de seleccionar cultivares adecuados para el almacenamiento prolongado. En el estudio también destacó que la composición de los solutos en los arilos y la piel, como las antocianinas y los ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, entre otros), está estrechamente relacionada con la sensibilidad a los daños por frío. Además, una alta proporción de calcio respecto a potasio en la corteza del fruto se correlacionó con una mayor resistencia al frío, sugiriendo que una gestión adecuada de estos minerales durante el cultivo podría ser una herramienta clave para reducir los daños producidos por las bajas temperaturas.

La aplicación de tratamientos como la melatonina en precosecha, es otra estrategia prometedora para mejorar la conservación del fruto. Los resultados mostraron que la melatonina no solo aumenta los compuestos bioactivos, como las antocianinas y los fenoles, en los frutos cosechados, sino que también retrasa la pérdida de firmeza y la disminución de la acidez durante el almacenamiento. Estos efectos se traducen en una vida útil más prolongada y una mejor calidad del fruto, tanto en términos organolépticos como nutricionales, lo que hace que este tratamiento sea una herramienta eficaz para preservar la calidad del fruto por más tiempo.

El ácido γ -aminobutírico (GABA), empleado en precosecha, se destacó como un tratamiento eficaz para aumentar el rendimiento de los frutos, reflejado en un mayor peso, y mejorar sus características organolépticas, factores esenciales para su comercialización. Su aplicación en diferentes dosis incrementó significativamente la intensidad del color rojo en los arilos y la corteza, un atributo clave para la aceptación de los consumidores. Además, mejoró los niveles de compuestos antioxidantes, como las antocianinas y los fenoles totales, lo que contribuye tanto a su calidad visual como a su valor nutricional. Los frutos tratados con GABA mostraron una mayor firmeza, un proceso de maduración más lento y una mejor calidad visual en términos de color

durante más días de conservación, consolidándose como una herramienta valiosa para optimizar la calidad del fruto.

Otra de las estrategias llevadas a cabo fue la combinación de 1-MCP y metil jasmonato (MeJA) en poscosecha, donde ha demostrado ser efectiva para preservar la calidad del fruto. Estos tratamientos, cuando se aplican juntos, mostraron un efecto sinérgico, manteniendo la firmeza del fruto, reduciendo la pérdida de peso y mejorando el contenido de polifenoles y antocianinas. Además, la combinación de 1-MCP y MeJA retrasa el proceso de maduración del fruto, lo que prolonga su vida útil y mejora su calidad visual y nutricional durante el almacenamiento. Esta estrategia resulta particularmente prometedora ya que ofrece una solución eficaz para mitigar los daños poscosecha y mantener la calidad del fruto por más tiempo.

Finalmente, también se abordó una solución sostenible mediante el uso de envolturas plásticas biodegradables en el envasado de los frutos en poscosecha. El estudio mostró que las envolturas de PBAT-PLA (Nature Fresh®) constituyen una alternativa viable a los materiales plásticos convencionales (LLDPE) para mantener la calidad del fruto durante el almacenamiento. Aunque los frutos envasados con PBAT-PLA presentaron una mayor pérdida de peso en comparación con los materiales tradicionales, no se observó un impacto significativo en la calidad visual ni en los atributos esenciales del fruto, como el color y los compuestos antioxidantes. Este enfoque no solo permite preservar la calidad del fruto, sino que también contribuye a minimizar el impacto ambiental, alineándose con las tendencias globales hacia la sostenibilidad en el sector agrícola. Dicha estrategia se vincula estrechamente con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030, específicamente el ODS 12, relativo a la producción y el consumo sostenibles, y el ODS 13, centrado en la acción climática. La implementación de materiales biodegradables en el ámbito poscosecha no solo contribuye a la mitigación de la contaminación plástica, sino que también favorece la transición hacia sistemas agrícolas más sostenibles y resilientes, con un enfoque integral en la protección del medio ambiente y el cumplimiento de metas globales en materia de sostenibilidad.

ABSTRACT

This doctoral thesis focuses on developing and evaluating strategies to enhance the color of the “Mollar de Elche” pomegranate cultivar and reduce chilling injuries during postharvest storage, two key factors that significantly influence the quality and marketability of this fruit. In this context, it is crucial to conduct a characterization of different pomegranate varieties. This comparative analysis is essential for identifying the varieties that exhibit greater resistance to chilling and those that perform better in terms of visual quality, particularly color.

The decision to include multiple varieties, such as Wonderful, Kingdom, Bigful, Acco, Purple Queen, and Mollar de Elche, allows for a detailed observation of how each cultivar responds to low temperatures and chilling injuries, contributing to a better understanding of their intrinsic differences. This approach provides a reference framework for selecting the most promising varieties in terms of postharvest preservation, which subsequently enables targeted improvement strategies to focus specifically on the Mollar de Elche pomegranate. The aim is to enhance its resistance to chilling and improve its color, both of which are critical for its marketability and consumer acceptance.

The postharvest preservation of pomegranates presents various challenges, particularly due to their sensitivity to suboptimal temperatures, which can trigger chilling injuries and negatively impact fruit quality. The studies presented facilitate the development of a set of strategies to address these issues, focusing on how different pomegranate varieties respond to low temperatures and the application of innovative treatments that enhance fruit resistance and extend its shelf life. These strategies include the preharvest use of melatonin and γ -aminobutyric acid (GABA), as well as the postharvest application of 1-MCP, methyl jasmonate (JaMe), and biodegradable films, emphasizing the importance of preserving fruit quality from harvest to prolonged storage.

In this context, six pomegranate varieties were studied to evaluate their response to chilling injuries during storage at low temperatures. The varieties assessed were Wonderful, Kingdom, Bigful, Acco, Purple Queen, and Mollar de Elche. The experiment involved storing the pomegranates at temperatures below 5°C, followed by exposure to 20°C for two days to simulate commercial storage conditions. The results revealed

significant variability in sensitivity to chilling injuries among the cultivars. The “Kingdom” pomegranate proved to be the most sensitive, while the Mollar de Elche variety demonstrated the highest resistance to cold, highlighting the importance of selecting suitable cultivars for prolonged storage. The study also emphasized that the composition of solutes in the arils and peel, such as anthocyanins and organic acids (e.g., citric and oxalic acids), is closely related to sensitivity to chilling injuries. Furthermore, a higher calcium-to-potassium ratio in the fruit peel was correlated with greater cold resistance, suggesting that proper management of these minerals during cultivation could serve as a key strategy to mitigate damage caused by low temperatures.

The application of treatments such as melatonin during preharvest is another promising strategy for improving fruit preservation. The results demonstrated that melatonin not only enhances bioactive compounds, such as anthocyanins and phenols, in harvested fruits but also delays the loss of firmness and the reduction in acidity during storage. These effects translate into a longer shelf life and improved fruit quality, both in organoleptic and nutritional terms, making this treatment an effective tool for maintaining fruit quality over extended periods.

γ -Aminobutyric acid (GABA), applied during preharvest, proved to be an effective treatment for increasing fruit yield, as reflected in greater fruit weight, and enhancing organoleptic characteristics, both essential factors for marketability. Its application at different doses significantly intensified the red coloration of the arils and peel, a key attribute for consumer acceptance. Furthermore, it improved the levels of antioxidant compounds such as anthocyanins and total phenols, contributing to both the fruit's visual quality and nutritional value. GABA-treated fruits exhibited greater firmness, a slower ripening process, and superior visual quality in terms of color over extended storage periods, establishing it as a valuable tool for optimizing fruit quality.

Another strategy implemented was the postharvest combination of 1-MCP and methyl jasmonate (MeJA), which has proven effective in preserving fruit quality. When applied together, these treatments exhibited a synergistic effect, maintaining fruit firmness, reducing weight loss, and enhancing the content of polyphenols and anthocyanins. Moreover, the combination of 1-MCP and MeJA delayed the fruit ripening process, thereby extending its shelf life and improving its visual and nutritional quality during storage. This strategy is particularly promising as it provides an effective solution to mitigate postharvest damage and maintain fruit quality for longer periods.

Finally, a sustainable solution was also addressed through the use of biodegradable plastic wraps for postharvest fruit packaging. The study demonstrated that PBAT-PLA wraps (Nature Fresh®) represent a viable alternative to conventional plastic materials (LLDPE) for maintaining fruit quality during storage. Although fruits packaged with PBAT-PLA exhibited slightly greater weight loss compared to traditional materials, no significant impact was observed on visual quality or essential fruit attributes, such as color and antioxidant compounds. This approach not only helps preserve fruit quality but also minimizes environmental impact, aligning with global trends toward sustainability in the agricultural sector. This strategy is closely linked to the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs) of the 2030 Agenda, specifically SDG 12, which promotes responsible production and consumption, and SDG 13, which focuses on climate action. The implementation of biodegradable materials in the postharvest sector not only contributes to reducing plastic pollution but also facilitates the transition toward more sustainable and resilient agricultural systems, with an integrated focus on environmental protection and achieving global sustainability goals.

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se hace uso de diversas abreviaturas y siglas para facilitar la redacción y comprensión del contenido. A continuación, se presenta un listado detallado de las abreviaturas empleadas, acompañadas de su correspondiente significado, con el propósito de asegurar una lectura fluida y una interpretación precisa de los términos que aparecen a lo largo de este documento.

Abreviatura	Significado
AAT-H	<i>Actividad Total Antioxidante Hidrofílica, medida de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos presentes en una muestra.</i>
ABTS	<i>2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), compuesto químico utilizado comúnmente en ensayos de capacidad antioxidante.</i>
ACC	<i>1-Aminociclopropano-1-Carboxílico, compuesto precursor clave en la biosíntesis del etileno en plantas.</i>
ACC-oxidasa	<i>1-Aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, enzima que cataliza la conversión de ACC en etileno.</i>
ACC-sintasa	<i>1-Aminociclopropano-1-carboxilato sintasa, enzima clave en la biosíntesis del etileno en plantas.</i>
AJ	<i>Ácido Jasmónico, fitohormona vegetal que regula diversos procesos fisiológicos, como la defensa frente a patógenos, la respuesta al estrés, la senescencia y la maduración de frutos.</i>
ANOVA	<i>Análisis de Varianza (Analysis of Variance), técnica estadística utilizada para comparar las medias de dos o más grupos y determinar si existen diferencias significativas entre ellas.</i>
arctg	<i>Función arctangente, calcula el ángulo cuyo valor de tangente es el número dado.</i>
AOAD	<i>Arab Organization for Agricultural Development (Organización Árabe para el Desarrollo Agrícola), organización regional árabe que se dedica a la mejora del sector agrícola en los países árabes.</i>
AOS	<i>Aleno Óxido Sintetas, enzimas clave en la vía de biosíntesis del ácido jasmónico, que catalizan la conversión de 12,13-epóxidos derivados de lipoxigenasas en aleno óxidos, precursores esenciales para la formación de jasmonatos en plantas.</i>
APX	<i>Ascorbato peroxidasa, enzima antioxidante que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) utilizando ácido ascórbico (vitamina C) como donante de electrones.</i>
AS	<i>Ácido Salicílico, fitohormona vegetal implicada en la regulación de respuestas de defensa frente a patógenos, inducción de resistencia sistémica adquirida y mediación de procesos como el crecimiento y la floración en plantas.</i>
ASMT	<i>Acetil Serotonina O-Metiltransferasa, enzima que cataliza la metilación de la N-acetilserotonina para formar melatonina.</i>

AT	Acidez Titulable, parámetro que mide la cantidad total de ácidos presentes en una muestra.
Atago Co. Ltd.	Nombre de la empresa, Atago Company Limited, fabricante especializado en instrumentos ópticos de medición como refractómetros, polarímetros y otros equipos científicos.
ATB	Ácido Tiobarbitúrico, compuesto químico utilizado en el ensayo de TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico) para medir productos de la peroxidación lipídica, como el malondialdehído (MDA).
ATP	Adenosín Trifosfato, molécula esencial que actúa como la principal fuente de energía química en las células.
°C	Grados Celsius, unidad de medida de temperatura en la escala Celsius, donde 0 °C corresponde al punto de congelación del agua y 100 °C al punto de ebullición al nivel del mar.
Ca	Calcio, elemento químico
CAT	Catalasa, enzima antioxidante que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en agua (H ₂ O) y oxígeno molecular (O ₂), protegiendo a las células del estrés oxidativo.
CAT	Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos, también conocido como Ciclo de Krebs o Ciclo del Ácido Cítrico, es una vía metabólica central en las células aeróbicas.
CDEA	California Department of Food and Agriculture (Departamento de Alimentos y Agricultura de California), agencia del gobierno estatal encargada de regular y supervisar la producción agrícola, la seguridad alimentaria, la sanidad animal y vegetal.
CH	Ácido Cinámico-4-Hidroxilasa, enzima del metabolismo secundario de las plantas que cataliza la hidroxilación del ácido cinámico en ácido p-cumárico.
CHS	Chalcona sintasa, enzima clave en la biosíntesis de flavonoides en plantas.
CIE Lab	Espacio de color definido por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE), utilizado para describir los colores de forma numérica. El modelo incluye tres componentes: L (luminosidad, de 0 a 100), a (eje de verde a rojo) y b (eje de azul a amarillo), proporcionando una representación uniforme y perceptual del color.
cm ³	Centímetros cúbicos, unidad de volumen.
CO ₂	Dióxido de carbono, compuesto químico formado por un átomo de carbono y dos de oxígeno.
COMT	Ácido Cafeico 3-O-Metiltransferasa, enzima que cataliza la metilación del ácido cafeico para formar ácido ferúlico.
Cu	Cobre, elemento químico.
cv.	Cultivar, término utilizado para describir una variedad específica cultivada de una especie vegetal, como en el caso de "Granada cv. 'Mollar de Elche'".
C1, C2	C1 representa la conductividad eléctrica inicial, y C2 la conductividad eléctrica final,
d ⁻¹	Día, unidad de tiempo.
DFR	Dihidroflavonol 4-reductasa, enzima clave en la biosíntesis de antocianinas, los pigmentos responsables del color en muchas flores, frutas y plantas.

DHAR	<i>Dehidroascorbato reductasa, enzima que juega un papel clave en la regeneración del ácido ascórbico (vitamina C) en las células.</i>
DOP	<i>Denominación de Origen Protegida, certificación que garantiza el origen geográfico y la calidad específica de un producto, vinculado a las características del medio donde se produce y a los métodos tradicionales empleados.</i>
EDS5	<i>Enhanced Disease Susceptibility 5, gen que codifica una proteína transportadora involucrada en la biosíntesis y transporte del ácido salicílico (AS) en plantas.</i>
et al	<i>Expresión latina que significa "y otros". Se utiliza en citas académicas para referirse a múltiples autores de un documento cuando no se listan todos los nombres.</i>
Fe	<i>Hierro, elemento químico.</i>
g	<i>Aceleración relativa a la gravedad terrestre, utilizada como unidad para describir la fuerza centrífuga aplicada durante la centrifugación.</i>
Filadelfia, PA, USA	<i>Indica la ubicación de la empresa: Filadelfia, ciudad del estado de Pensilvania (PA), en los Estados Unidos de América (USA).</i>
g L ⁻¹	<i>g: Gramos, unidad de masa del Sistema Internacional (SI). Indica la cantidad de sustancia medida. L: Litro, unidad de volumen también aceptada en el SI. Representa el volumen de la solución en la que se encuentra disuelta la sustancia.</i>
GABA	<i>Ácido γ-Aminobutírico, aminoácido no proteico que actúa como un neurotransmisor inhibitorio en animales y como una molécula señal en plantas, regulando procesos como la respuesta al estrés, el crecimiento y el metabolismo celular.</i>
GABA-T	<i>GABA Transaminasa, enzima que cataliza la transaminación del ácido γ-aminobutírico (GABA) para formar semialdehído succínico (SSA).</i>
GT	<i>Flavonoide-3-O-glucosiltransferasa, enzima que cataliza la transferencia de un grupo glucosa al flavonoide en la posición 3 del anillo C, formando un flavonoide glucósido.</i>
GPX	<i>Glutación Peroxidasa, enzima antioxidante que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros peróxidos orgánicos a agua (H₂O) y alcoholes, utilizando glutación como donante de electrones, protegiendo las células del daño oxidativo.</i>
HNO ₃	<i>Ácido nítrico, compuesto químico inorgánico fuerte compuesto por hidrógeno (H), nitrógeno (N) y oxígeno (O).</i>
H ₂ O	<i>Agua, compuesto químico formado por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno. Es esencial para la vida, actúa como solvente universal y constituye una parte fundamental de los sistemas biológicos y ecológicos.</i>
H ₂ O ₂	<i>Peróxido de Hidrógeno, molécula reactiva de oxígeno (ROS) que se produce en organismos vivos como parte de procesos metabólicos y de respuesta al estrés.</i>
HPLC	<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High-Performance Liquid Chromatography), una técnica analítica utilizada para separar, identificar y cuantificar componentes en una mezcla.</i>
H.R.	<i>Humedad Relativa, medida que indica la cantidad de vapor de agua presente en el aire como un porcentaje del máximo que podría contener a una temperatura específica.</i>
hue*	<i>Parámetro derivado del espacio de color CIE Lab que representa el tono o matiz de un color.</i>

ICS	<i>Isocorismato Sintasa, enzima clave en la biosíntesis del ácido salicílico en plantas. Cataliza la conversión de corismato en isocorismato, que luego se convierte en ácido salicílico.</i>
ICP-MS	<i>Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), una técnica analítica avanzada utilizada para la detección y cuantificación de elementos en muestras a niveles de trazas y ultratrazas.</i>
ICS-Glu	<i>Isocorismato-9-Glutamato, derivado del isocorismato formado por la conjugación con glutamato. Es un intermediario en la vía de biosíntesis del ácido salicílico, que desempeña un papel crucial en la señalización de defensa de las plantas frente a estrés biótico.</i>
IM	<i>Índice de Madurez, parámetro utilizado para evaluar el estado de maduración de frutos o productos agrícolas.</i>
Inc.	<i>Abreviatura de "Incorporated", utilizada en los nombres de empresas registradas en Estados Unidos para indicar que es una corporación.</i>
J	<i>Potasio, un macronutriente que mejora la resistencia de las plantas al estrés, regula la apertura de estomas y contribuye al transporte de agua, nutrientes y azúcares.</i>
JaMe	<i>Jasmonato de Metilo, molécula derivada del ácido jasmónico que actúa como una fitohormona en plantas, regulando respuestas al estrés biótico y abiótico, así como procesos de desarrollo como la senescencia, la germinación y la defensa contra patógenos.</i>
JAZ	<i>Proteínas Jasmonate ZIM-domain, familia de proteínas que actúan como represores en la señalización del ácido jasmónico.</i>
JMT	<i>O-Metiltransferasa, una enzima involucrada en la biosíntesis de jasmonato de metilo (JaMe), catalizando la transferencia de un grupo metilo al ácido jasmónico, contribuyendo a la regulación de respuestas al estrés y procesos de desarrollo en plantas.</i>
kg ha ⁻¹	<i>Kilogramos por hectárea, unidad de medida que representa la cantidad de una sustancia (generalmente fertilizantes, pesticidas o cosechas) aplicada o producida en una superficie de una hectárea.</i>
kPa	<i>Kilopascal, unidad de presión en el Sistema Internacional (SI). Un kilopascal equivale a 1.000 pascales (Pa), donde 1 Pascal se define como 1 newton por metro cuadrado</i>
L.	<i>Abreviatura de Carl Linnaeus (Carlos Linneo), científico sueco considerado el padre de la taxonomía moderna.</i>
L/h	<i>Litros por hora, unidad de medida que indica la cantidad de líquido que fluye o se consume en una hora.</i>
LLPDE	<i>Polietileno Lineal de Baja Densidad, un polímero termoplástico con una estructura lineal y algunas ramificaciones, conocido por su flexibilidad, resistencia y uso en aplicaciones como películas plásticas, envases y revestimientos.</i>
LOX	<i>Lipoxigenasas, grupo de enzimas que catalizan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados en hidroperóxidos, participando en la biosíntesis de compuestos como el ácido jasmónico y en respuestas al estrés en plantas y animales.</i>
m ²	<i>Metro cuadrado, unidad de medida de área en el Sistema Internacional (SI). Representa el área de un cuadrado con lados de un metro de longitud.</i>
MAIL	<i>Ministry of Agriculture, Irrigation and Livestock (Ministerio de Agricultura, Irrigación y Ganadería) de Afganistán.</i>
Mn	<i>Manganeso, elemento químico.</i>

MATE	<i>Multidrug And Toxic Compound Extrusion, una familia de proteínas transportadoras que participan en la expulsión de compuestos tóxicos y metabolitos secundarios en células vegetales y animales.</i>
MAPA	<i>Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, organismo responsable de diseñar, coordinar y supervisar las políticas relacionadas con el sector agrario, pesquero y alimentario, promoviendo el desarrollo sostenible y competitivo de estos sectores.</i>
MDA	<i>Malondialdehído, compuesto orgánico que se genera como subproducto de la peroxidación de lípidos en las membranas celulares.</i>
mg	<i>miligramo, unidad de masa equivalente a una milésima parte de un gramo</i>
min.	<i>Minuto, unidad de tiempo equivalente a 60 segundos.</i>
mM	<i>Milimolar, unidad de concentración que indica milimoles de soluto por litro de solución.</i>
MYC2	<i>Factor de transcripción clave en la señalización del ácido jasmónico. MYC2 pertenece a la familia de factores bHLH (basic Helix-Loop-Helix) y regula la expresión de genes involucrados en la defensa contra patógenos, la respuesta al estrés abiótico y el desarrollo de plantas.</i>
N	<i>Normalidad, unidad de concentración química que indica el número de equivalentes de soluto por litro de solución.</i>
n	<i>Talla de la muestra (número de réplicas), indica la cantidad de observaciones, experimentos, o repeticiones realizadas para un análisis o estudio.</i>
Na	<i>Sodio, elemento químico.</i>
Na ₂ CO ₃	<i>Carbonato de sodio, compuesto químico inorgánico formado por sodio (Na) y carbonato (CO₃).</i>
NADH	<i>Nicotinamida Adenina Dinucleótido (en su forma reducida), una coenzima fundamental en el metabolismo celular.</i>
NaF	<i>Fluoruro de sodio, compuesto químico inorgánico formado por sodio (Na) y flúor (F).</i>
NaOH	<i>Hidróxido de sodio, compuesto químico inorgánico compuesto por sodio (Na), oxígeno (O) e hidrógeno (H).</i>
NHB	<i>National Horticultural Board (Junta Nacional de Horticultura) de la India, agencia del Gobierno de la India que promueve el desarrollo de la horticultura en el país.</i>
nL L	<i>Nanolitros por litro, una unidad de concentración que indica la cantidad de nanolitros de una sustancia presente en un litro de solución o gas.</i>
nm	<i>Nanómetro, unidad de longitud en el Sistema Internacional (SI) equivalente a 10⁻⁹ metros. Se utiliza comúnmente para medir longitudes de onda de luz, dimensiones de partículas a escala nanométrica y otras estructuras extremadamente pequeñas.</i>
nmol	<i>Nanomol, unidad de cantidad de sustancia en el Sistema Internacional (SI), equivalente a 10⁻⁹ moles.</i>
O ₂	<i>Oxígeno molecular, compuesto formado por dos átomos de oxígeno unidos covalentemente.</i>
ODS	<i>Objetivos de Desarrollo Sostenible, un conjunto de 17 objetivos adoptados por las Naciones Unidas en 2015 como parte de la Agenda 2030</i>

P	<i>Fósforo, un macronutriente que contribuye al desarrollo de raíces, la floración y la formación de frutos. Es vital en la transferencia de energía a través de compuestos como el ATP.</i>
Pa	<i>Pascal, unidad que mide la inversa de la presión en el Sistema Internacional (SI). Se utiliza comúnmente en física y química para describir propiedades relacionadas con la resistencia o respuesta a la presión, como la compresibilidad o la permeabilidad.</i>
PAL	<i>Fenilalanina Amonio Liasa, enzima clave en el metabolismo de las plantas que cataliza la conversión de fenilalanina en ácido cinámico, un paso inicial en la biosíntesis de compuestos fenólicos como ligninas, flavonoides y fitoalexinas, esenciales para la defensa y el desarrollo estructural en plantas.</i>
PBAT	<i>Poli(Butilén Adipato-co-Tereftalato), polímero biodegradable de base petroquímica con propiedades de flexibilidad y resistencia, empleado en la fabricación de materiales compostables y bioplásticos.</i>
PLA	<i>Ácido Poliláctico, polímero biodegradable derivado de recursos renovables como el almidón de maíz o la caña de azúcar, utilizado en aplicaciones de envases y bioplásticos.</i>
POD	<i>Peroxidasa, enzima antioxidante que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros peróxidos orgánicos, transformándolos en agua (H₂O) y oxígeno molecular (O₂).</i>
POX	<i>Peroxidasa, enzima que cataliza la oxidación de diversos sustratos utilizando peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como oxidante, desempeñando un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo y en procesos metabólicos en plantas y otros organismos.</i>
PPO	<i>Polifenol oxidasa, enzima que cataliza la oxidación de polifenoles a quinonas, compuestos que pueden reaccionar con otros compuestos y formar productos pigmentados, como los marrones, en frutas y vegetales.</i>
PVDF	<i>Fluoruro de Polivinilideno (Polyvinylidene Fluoride), polímero termoplástico altamente resistente a productos químicos, rayos UV y temperaturas extremas. S</i>
R (UE) 2016/83	<i>Reglamento (Unión Europea) 2016/83, normativa adoptada por el Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea que regula aspectos específicos relacionados con la producción, etiquetado, calidad, o comercialización de productos en el ámbito de la Unión Europea.</i>
r=	<i>El valor de r representa el coeficiente de correlación en un análisis estadístico, que mide la fuerza y dirección de la relación lineal entre dos variables.</i>
ROS	<i>Especies Reactivas de Oxígeno, grupo de moléculas y iones derivados del oxígeno que son altamente reactivos debido a la presencia de electrones desapareados.</i>
SCFOI1-JAZ	<i>Complejo proteico formado por SCF (Skp, Cullin, F-box), la proteína receptora COI1 (Coronatine-Insensitive 1) y las proteínas JAZ (Jasmonate ZIM-domain). Este complejo es clave en la señalización del ácido jasmónico, regulando la degradación de los represores JAZ para activar las respuestas transcripcionales frente al estrés y desarrollo en plantas.</i>
SE	<i>Error estándar (Standard Error), medida estadística que indica la precisión con la que una muestra representa a la población.</i>
SNAT	<i>Serotonina N-Acetiltransferasa, enzima que cataliza la transferencia de un grupo acetilo de la acetil-CoA a la serotonina, formando N-acetilserotonina.</i>
SOD	<i>Superóxido Dismutasa, enzima antioxidante que cataliza la dismutación del radical superóxido (O₂⁻) en oxígeno molecular (O₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), protegiendo a las células del daño oxidativo</i>

SSA	<i>Semialdehído Succínico, intermediario metabólico en la degradación del GABA (ácido γ-aminobutírico) a través de la vía del semialdehído succínico.</i>
SSADH	<i>Succínico Semialdehído Deshidrogenasa, enzima que cataliza la oxidación del semialdehído succínico (SSA) a succinato.</i>
SSCRA	<i>State Statistical Committee of the Republic of Azerbaijan (Comité Estatal de Estadística de la República de Azerbaiyán), el organismo gubernamental encargado de recopilar, procesar y publicar estadísticas oficiales en Azerbaiyán</i>
SST	<i>Sólidos Solubles Totales, medida que indica la concentración de azúcares, ácidos y otros compuestos solubles presentes en una solución, comúnmente evaluados en productos agrícolas.</i>
<i>t</i>	<i>Toneladas, unidad de medida de masa equivalente a 1.000 kilogramos, utilizada comúnmente para expresar grandes cantidades de peso o producción.</i>
<i>t de Student</i>	<i>Una distribución de probabilidad utilizada en estadística para realizar pruebas de hipótesis, especialmente cuando el tamaño de la muestra es pequeño y/o la desviación estándar de la población es desconocida.</i>
<i>t-CA</i>	<i>Ácido Trans-Cinámico, compuesto orgánico derivado de la fenilalanina a través de la actividad de la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL). Es un intermediario clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos, como flavonoides y ligninas, que son esenciales para la defensa, estructura y pigmentación de las plantas.</i>
TCA	<i>Ácido Tricloroacético, compuesto químico orgánico utilizado comúnmente como agente precipitante de proteínas en análisis bioquímicos.</i>
TDC	<i>L-Triptófano Descarboxilasa, enzima que cataliza la conversión del L-triptófano en triptamina mediante la eliminación de un grupo carboxilo. Es un paso clave en la biosíntesis de alcaloides indólicos y otras moléculas bioactivas en plantas.</i>
TurkStat	<i>Turkish Statistical Institute (Instituto Estadístico de Turquía), la entidad oficial encargada de recopilar, procesar y publicar estadísticas oficiales en Turquía.</i>
TPH	<i>Putativo Triptófano Hidroxilasa, enzima que se hipotetiza cataliza la hidroxilación del L-triptófano para formar 5-hidroxitriptófano, un precursor clave en la biosíntesis de serotonina y otros metabolitos indólicos en plantas y animales.</i>
TX-XT2i	<i>Modelo de analizador de textura desarrollado por Stable Micro Systems. Es un equipo utilizado para evaluar propiedades texturales de materiales y alimentos, como firmeza, elasticidad, cohesión y dureza, mediante pruebas de compresión, tensión y otras técnicas mecánicas.</i>
T1, T2, T3, T4, T5	<i>Fases de desarrollo definidas como 30 (T1), 60 (T2), 90 (T3), 105 (T4) y 120 (T5) días después de la floración.</i>
T5H	<i>Triptamina 5-Hidroxilasa, enzima clave que cataliza la hidroxilación de la triptamina en 5-hidroxitriptamina (serotonina). Es fundamental en la biosíntesis de serotonina en plantas y otros organismos, contribuyendo a procesos de defensa y señalización.</i>
UFGT	<i>Antocianidina 3-O-glucosiltransferasa, enzima que cataliza la transferencia de un grupo glucosa a las antocianidinas, formando antocianinas glucósidas.</i>
UTMX	<i>Coordenada X del sistema de coordenadas Universal Transversal de Mercator (UTM), que representa la posición este-oeste en metros desde el meridiano central de la zona UTM correspondiente.</i>

UTMY	Coordenada Y del sistema de coordenadas UTM, que representa la posición norte-sur en metros desde el ecuador.
UV	Ultravioleta, tipo de radiación electromagnética con longitudes de onda más cortas que la luz visible (10-400 nm), utilizada en procesos como la esterilización, análisis químico y que puede causar efectos biológicos como el daño celular y la síntesis de vitamina D.
Zn	Zinc, elemento químico.
$(Ab \times D \times V \times 100 \times 449,2)/(W \times 23,900)$	Fórmula para calcular la concentración o cantidad de un compuesto en una muestra. Ab es la absorbancia, D el factor de dilución, V el volumen del extracto, W el peso de la muestra en gramos, 100 y 23,900 son factores de conversión, y 449,2 es una constante relacionada con el compuesto o longitud de onda específica.
μmol	Micromol, unidad de cantidad de sustancia que equivale a 10^{-6} moles.
1-MPC	1-Metilciclopropeno, compuesto gaseoso utilizado como regulador del crecimiento en productos agrícolas para inhibir la acción del etileno, prolongando la vida útil y frescura de frutas, verduras y flores.
4CL	Ligasa de 4-coumaroyl-CoA, enzima clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos y ligninas en plantas
Σ	Suma (sumatoria), operador matemático que indica la suma de una serie de términos.



▶ 1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen, distribución geográfica y morfología del granado

El granado (*Punica granatum* L.) perteneciente a la familia Punicaceae, es una especie originaria de Irán y el norte de la India, pero debido a su fácil capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas se ha extendido y cultivado en otros países y regiones a lo largo de los años (Meerts et al., 2009). Actualmente, el granado se cultiva en diferentes países de la cuenca mediterránea (Egipto, Israel, Turquía, España, Italia, etc.), en Asia (Irán, Irak, Afganistán, China etc.), en Estados Unidos, Sudáfrica, Argentina y Brasil (Fadavi et al., 2005; Hummer et al., 2011). Las condiciones óptimas para el crecimiento del granado se dan en climas de tipo mediterráneo, donde se incluyen una alta exposición a la luz solar, inviernos suaves y veranos secos y calurosos sin lluvia durante las últimas etapas del desarrollo del fruto. La posibilidad de cultivarse en zonas áridas y con bajos requerimientos hídricos y su capacidad de desarrollarse en condiciones en las que otros frutales no lo harían, hace que presente unas excepcionales expectativas de cultivo debido a su rentabilidad (Melgarejo y Salazar, 2003).

Las dos especies de granado son: *Punica granatum* L. (frutos comestibles) y *Punica nana* L. (frutos no comestibles y de uso ornamental) (Melgarejo et al., 2010). El árbol del granado puede medir entre 5 y 10 metros de altura, con abundantes ramas, y flores de color rojo, con 5-8 pétalos (Melgarejo et al., 2022). La floración del granado comienza en los meses de abril y mayo y puede durar hasta octubre y noviembre, dependiendo de la variedad. El desarrollo del fruto puede durar entre 5 a 7 meses a partir del momento de la floración (Jurenka, 2008). Para ello, se requieren unas determinadas condiciones de luminosidad, temperatura y humedad, y además al ser un fruto no climatérico no continúa su maduración una vez recolectado (Bartual-Martos, 2014). La granada es una baya de forma esférica que presenta un color que varía desde el amarillo al rojo. Dependiendo de la variedad, presenta un diámetro de 6-12 cm y sus semillas se encuentran rodeadas de una pulpa (arilos) que es la parte comestible de la granada (Melgarejo et al., 2022) (Figura 1).

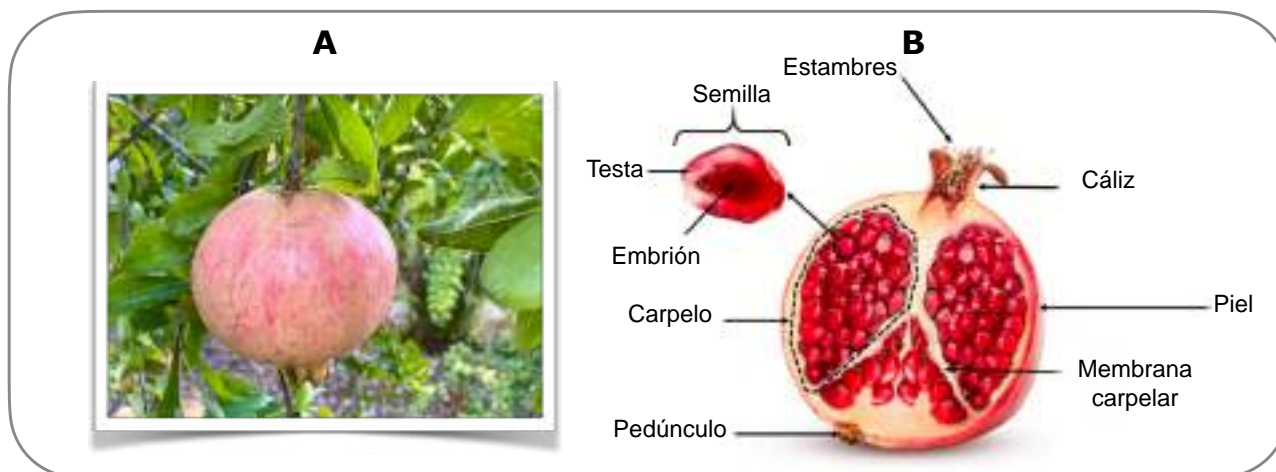


Figura 1: Cultivo de la granada cv. "Mollar de Elche" (A) y partes del interior del fruto (B). Muestra: granada cv. "Mollar de Elche" Fuente: Elaboración propia (A) e Imagen adaptada de Melgarejo et al., 2022 (B).

1.2 Variedades de granadas y clasificación

La granada ha cobrado especial interés en los últimos años debido principalmente a sus propiedades organolépticas y funcionales (Li et al., 2006). Actualmente se han descrito más de 500 variedades de granada en todo el mundo, las cuales dependen de su lugar de origen. Entre los países productores de granada destaca la India con variedades como Dholka y Ganesh; Turquía, importante país productor como los cultivares Hizcanar, Kandhari y Provence; Estados Unidos donde destacan los cultivares Wonderful y Paper Shell y España con las variedades Mollar de Elche, Blanca, Valenciana y Tendral (Stover y Mercure, 2007).

Las variedades de granadas se pueden clasificar por su contenido de ácidos (Melgarejo et al., 2010). En las variedades más ácidas la concentración de ácido cítrico es mayor que la concentración de ácido málico y en las variedades más dulces la concentración de estos dos ácidos es similar (Mena et al., 2011). En términos generales, los frutos que presentan una coloración externa más roja son más ácidos, mientras que las variedades con tonalidades más rosadas son más dulces. Por lo tanto, en las variedades españolas se ha establecido una clasificación que se basa en el índice de madurez (IM), y es la relación entre el contenido de sólidos solubles totales (SST) y la acidez titulable (TA) (Martínez et al., 2006) (Tabla 1).



Tabla 1: Clasificación de las diferentes variedades de granada en España. Fuente: Melgarejo et al. (2010).

Variedad	Acidez titulable (% ácido cítrico)	Índice de madurez
Ácidas	2,3 - 2,7	5 - 7
Ácidas - dulces	0,5 - 1	17 - 24
Dulces	0,15 - 0,5	31 - 98

La granada cv. “Valenciana”, “Acco”, “Kingdom”, “Bigful”, “Wonderful”, “Purple Queen” y “Mollar de Elche” son las variedades que presentan un mayor interés comercial, esta última es la más cultivada y comercializada en España y en Europa.

1.3 Producción y exportación de granada en el mundo

Analizar y obtener información acerca de la producción mundial de granada es una tarea bastante compleja ya que no se dispone de resultados actualizados acerca de la superficie de cultivo y producción de los principales países productores en el mundo (Ergun, 2012). No obstante, los resultados se obtienen de distintas agencias estadísticas de agricultura, informes de noticias y asociaciones de productores y/o exportadores.

La superficie mundial que se dedica al cultivo de la granada es aproximadamente de 836.000 hectáreas con una producción de 8,1 millones de toneladas. India es el mayor productor del mundo, con cerca de 3 millones de toneladas producidas en 262.000 hectáreas. La producción mundial ha aumentado un 5 % en la última década debido principalmente a la demanda tanto para el consumo local como para su exportación (NHB, 2020). China, seguido de Irán, son el segundo y tercer país productor de granada, con 1,2 millones y 915.000 toneladas, respectivamente (Financial Tribune, 2016; Yuan y Zhao, 2019). La India, China e Irán son, por tanto, los 3 mayores productores de granada, con una producción mundial del 70 % en una superficie de 476.000 hectáreas y con un rendimiento de 10,8 toneladas/hectárea. Otros importantes países productores de granada son Turquía, Egipto y Estados Unidos (Figura 2).

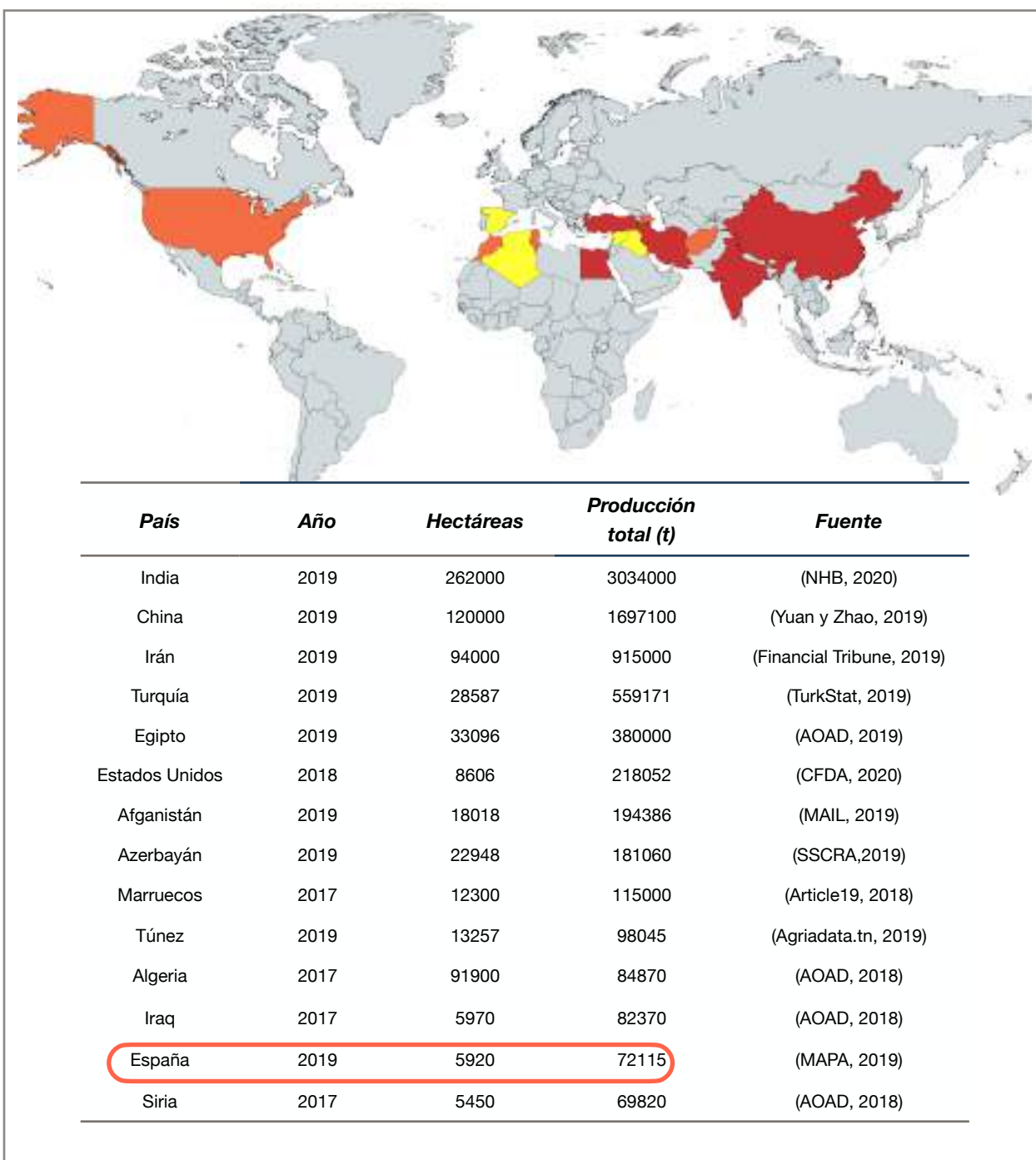


Figura 2: Principales países productores de granada en el mundo. Año de producción, hectáreas, producción total y fuente. Los resultados se expresan en toneladas (t). Fuentes: elaboración propia.

Por otro lado, Turquía fue el principal país exportador de granada en el año 2019 con cerca de 155.000 toneladas, lo cual lo convierte en el mayor exportador, representando el 23 % de las exportaciones mundiales, seguido de Egipto con un 19 % y la India con un 10 % (ITC, 2020). Las exportaciones mundiales de granada pasaron de 450.000 toneladas



en el año 2012 a 668.000 toneladas en el año 2019. Aunque China e Irán son los mayores productores de granada en el mundo (Figura 3A) sus exportaciones a otros países son notablemente inferiores en comparación con otros países, como pueden ser Turquía e Irán. China se encuentra en la octava posición como país exportador, con un total de 12.600 toneladas, lo que supone un 0,7 % de su producción total, y en caso de Irán esta cuota fue ligeramente superior, de 1,2 % (Figura 3B). La gran demanda en China influye sobre la exportación de granadas, ya que los mercados locales tienen preferencia sobre los mercados internacionales. En el caso de Irán, la producción también se destina al mercado nacional, debido a los problemas de mercancías como consecuencia de las sanciones económicas (Kahramanoglu, 2019).

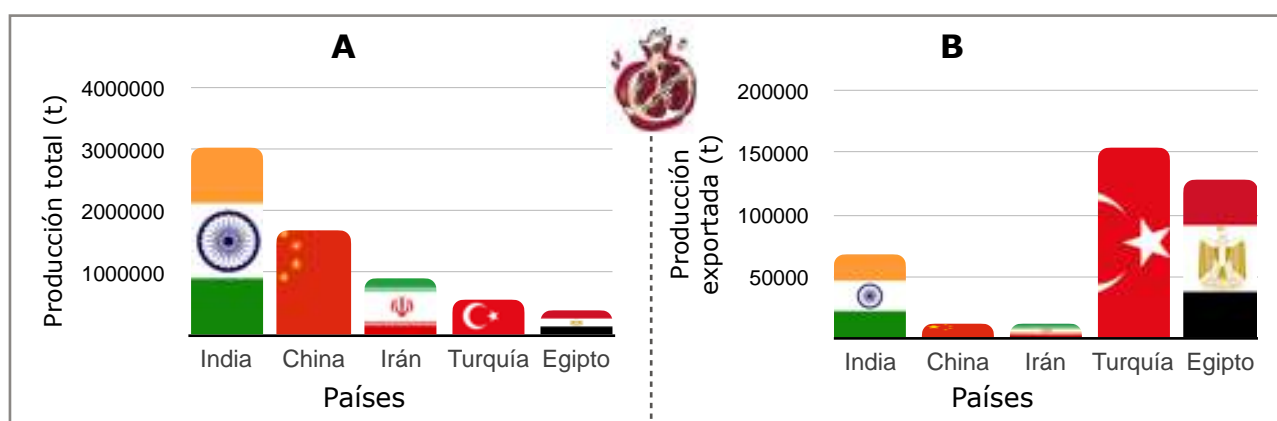


Figura 3: Producción total de granada en el año 2019 en India, China, Irán, Turquía y Egipto (A) y producción destinada a exportación (B). Los resultados expresados en toneladas (t).
Fuente: MAPA (2023).

1.4 Producción y superficie cultivada de granada en España

En España, la producción total de granada fue de 84.477 toneladas en el año 2021 siendo la Comunidad Valenciana la región de mayor producción (69,80 %) (Figura 4B), seguido de la Región de Murcia, Andalucía y Cataluña con un 11,92, 8,59 y 1,99 %, respectivamente (Figura 4C). Además, la superficie dedicada al cultivo del granado ha pasado de 2.386 hectáreas en el año 2010 a 5.619 hectáreas en el año 2021, lo que supone un incremento del 135,50 % (Figura 4A). La provincia de Alicante es donde se centra mayormente el cultivo del granado, especialmente en Elche, Albuera y Alicante, lo que pone de manifiesto su valor socioeconómico en estas localidades. Entre las diferentes variedades de granada en España, la más cultivada es la Mollar de Elche que



se encuentra salvaguardada por una Denominación de Origen Protegida (DOP) desde el año 2016 [R (UE) 2016/83].

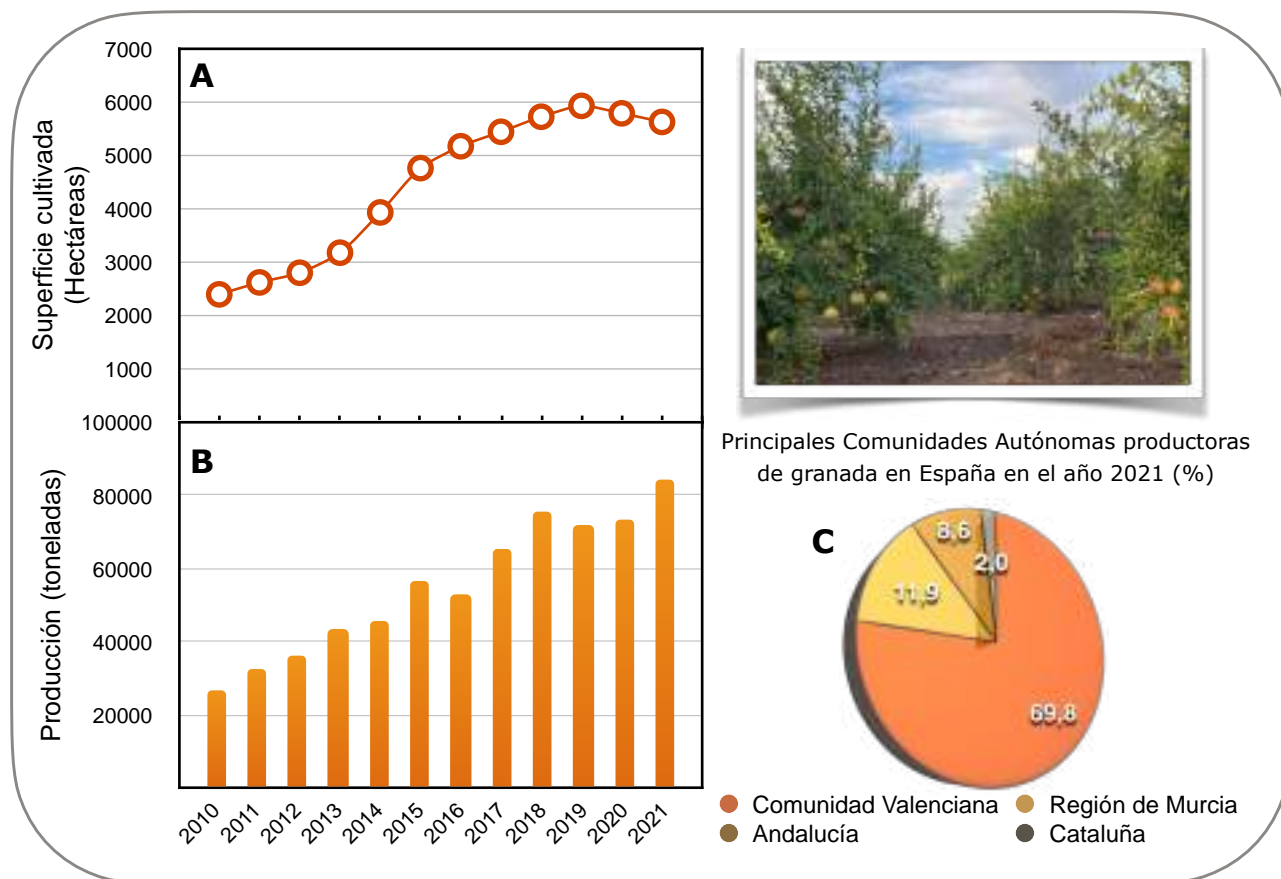


Figura 4: Superficie dedicada al cultivo del granado expresado en hectáreas (A), producción total de granadas (B) y principales Comunidades Autónomas productoras de granada expresado en porcentaje (C) en España. Los resultados de superficie y producción corresponden desde el año 2010 al 2021 y el

1.5 Granada cv. “Mollar de Elche” [R (UE) 2016/83]

El producto que se encuentra amparado por la Denominación de Origen Protegida Granada cv. “Mollar de Elche” o Granada de Elche es el fruto de la especie *Punica granatum* L., procedente de la variedad Mollar, de las categorías Extra y Primera que se encuentran definidas en la Norma del Codex para la granada. Se caracteriza por su equilibrio entre acidez y azúcares y por tener un color externo que oscila del amarillo crema al rojo (Figura 5). La floración del granado comienza en los meses de marzo y abril y la recolección de la granada se realiza entre los meses de septiembre y noviembre.



Las características del fruto maduro son las siguientes:

- Forma del fruto: redonda, dividida en lóbulos interiormente y corteza fina, lisa y brillante.
- Color: de crema a rojo intenso en el exterior. Las semillas están recubiertas de una pulpa cuyo color oscila entre el rojo intenso y el rojo.
- Grados Brix: mínimo de 14°.
- pH: mínimo 3,30 y máximo 4,40

Los arilos presentan un sabor dulce, y su piñón se caracteriza por ser blando, a diferencia de otras variedades. La zona de producción agrícola de la granada cv. "Mollar de Elche" se constituye por los términos municipales pertenecientes a las comarcas de Bajo Vinalopó, Alacantí y Bajo Segura, situadas en la provincia de Alicante (Comunidad Valenciana). Esta localización presenta rasgos diferenciadores en cuanto a climatología respecto a otras zonas del Mediterráneo español. Especialmente destacan las escasas precipitaciones, elevados niveles de radiación solar y el bajo porcentaje de días nublados entre los meses de junio a septiembre. Estos factores son determinantes ya que pueden afectar al color externo de la granada y de los arilos, al sabor y a la composición de los antocianos.



Figura 5: Etapas de desarrollo de la granada Mollar de Elche. Fuente: elaboración propia.

1.6 Composición de la granada

Factores como la variedad, zona de cultivo, condiciones meteorológicas, grado de madurez, etc. pueden afectar a la composición química de la granada (Mirdehghan y Rahemi, 2007). Solamente un 50 % del fruto del granado es comestible, donde se incluyen los arilos que representan un 40 % y las semillas un 10 %. Además, el zumo que se obtiene de los arilos contiene un 85 % de agua, 10 % de azúcares totales y otros compuestos orgánicos, entre los que destacan las pectinas y compuestos fenólicos (Viuda-Martos et al., 2010). Diversos estudios han demostrado que la variedad de



granada y el estado de madurez puede influir sobre la actividad antioxidante y otros parámetros fisicoquímicos como los sólidos solubles totales, el pH, la acidez titulable, ácidos orgánicos y la composición fenólica (Poyrazoglu et al., 2002; Opara et al., 2009; Pareek et al., 2015).

1.6.1 Sólidos solubles totales, ph y acidez titulable

Los sólidos solubles totales (SST), el pH y la acidez titulable (AT) son atributos muy importantes de calidad en la granada (Shwartz et al., 2009; Pareek et al., 2015; García-Pastor et al., 2020a). El pH aumenta durante la maduración del fruto, y por el contrario, la AT disminuye con el avance de la maduración de la fruta. Esta disminución de los niveles de AT durante el desarrollo del fruto coincide, además, con el aumento de la concentración de azúcar, y es un proceso que ocurre durante la maduración de la granada (Kulkarni y Aradhya, 2005). La relación sólidos solubles totales / acidez total (SST/AT), también denominada índice de madurez, se utiliza para clasificar la granada en ácidas, semiácidas y dulces (Martínez et al., 2006). El índice de madurez es uno de los indicadores más fiables de la madurez del fruto de la granada (Fawole y Opara, 2013a).

1.6.2 Ácidos orgánicos

El contenido en ácidos orgánicos en la granada depende principalmente del tipo de cultivar (Legua et al., 2000). La composición y concentración de los ácidos orgánicos influyen sobre los atributos sensoriales del consumidor (Carbonell-Barrachina et al., 2012). Los principales ácidos orgánicos presentes en la fruta de la granada son el ácido cítrico, málico y oxálico, mientras que el ácido tartárico, succínico y quínico se encuentran en cantidades inferiores. Durante la maduración de los frutos se produce una disminución significativa del contenido de ácidos orgánicos, ello se debe a que son utilizados como sustrato durante los procesos de respiración del fruto (Moing et al., 2001).

1.6.3 Azúcares

Los azúcares más abundantes en la fruta de la granada son la glucosa y la fructosa y su concentración oscila entre 50-100 g L⁻¹ y 45-85 g L⁻¹, respectivamente (Guía de



Referencia AIJN 2012). Además, la relación glucosa/fructosa se sitúa entre 0,7 y 1,0 (Mena et al., 2011; Melgarejo et al., 2000). La sacarosa no está presente en todas las variedades y su contenido es muy bajo, especialmente en los frutos semiácidos. Durante el proceso de maduración de la granada se produce un aumento en el contenido total de azúcares, esto se debe a la hidrólisis del almidón en las primeras etapas de desarrollo de la fruta (Shwartz et al., 2009). Como resultado, aumenta la cantidad de los dos azúcares principales, glucosa y fructosa, y también afecta al contenido de sólidos solubles totales que aumentan durante las etapas de maduración.

1.6.4 Vitaminas y minerales

El zumo de los arilos de la granada puede contener vitamina C en concentraciones que pueden variar entre 8 y 40 miligramos (mg) por cada 100 mililitros (mL) de zumo y vitamina K en pequeñas concentraciones (0,1 - 0,6 microgramos por cada 100 mL) (USDA, Acceso: Mayo 2023). Es importante destacar que estos resultados son estimaciones generales y su concentración puede depender de diferentes factores como la variedad, el grado de madurez, los métodos de cultivo, entre otros. Por otro lado, el potasio es el mineral predominante en el zumo de la granada seguido del calcio y el magnesio, con unas concentraciones aproximadas de 275, 8 y 3 mg, por cada 100 mL de zumo, respectivamente (Mataix et al., 2009). Con la maduración del fruto se produce una importante disminución de los elementos minerales (Fawole y Opara, 2013a).

1.7 Propiedades funcionales en la granada

En los últimos años, ha aumentado de forma considerable el número de estudios que describen las propiedades beneficiosas de la granada (Panth et al., 2017). Debido principalmente a su contenido fenólico (Figura 6), se ha demostrado que posee propiedades anticancerígenas, antihipertensivas y antioxidantes (Hong et al., 2008; Basu y Penugoda, 2009; Zhang et al., 2023). Los compuestos fenólicos están formados por anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante (Arranz et al., 2010). Están implicados en la capacidad de antiproliferación de diferentes tipos de células cancerígenas que se asocian a diversos tipos de cáncer, como puede ser, el de colon o próstata (Sun et al., 2002). Los polifenoles son compuestos



presentes en los alimentos de origen vegetal, y son la principal fuente de antioxidantes en la dieta. El consumo de productos vegetales aporta un alto contenido en fitoquímicos y otros micronutrientes (Opara et al., 2009). Estudios llevados a cabo en animales demuestran la capacidad de protección de los polifenoles frente a enfermedades degenerativas (Scalbert et al., 2005). Algunos compuestos fenólicos poseen mayor efecto antioxidante que la propia vitamina C y E, y además presentan una mayor biodisponibilidad (Cao et al., 1998; Mazza et al., 2002). En la actualidad, se conocen más de 10.000 estructuras fenólicas, de las cuales se han identificados al menos 4.000 flavonoides (Kennedy y Wightman, 2011). La diversidad y amplia distribución de los polifenoles en las plantas permite categorizar estos compuestos en diferentes formas (Tsao, 2010). La granada es un fruto que presenta una gran cantidad de compuestos fenólicos (Faria y Calhau, 2011), los cuales son responsables de su capacidad antioxidante. Algunos ejemplos son: las punicalaginas, las antocianinas y el ácido eláxico (Gil et al., 2000).

1.7.1 Punicalaginas

La punicalagina es uno de los mayores polifenoles que se conoce, con una masa molecular de 1084,7 g/mol, y se caracteriza por presentar una alta actividad antioxidante (Houston et al., 2017). La punicalagina, también conocida como 2, 3-(S)-hexahidroxi-difenol-4, 6-(S, S)-galagil-D-glucosa, pertenece a la familia de los elagitaninos y se encuentra presente en la granada en formas alfa y beta, que son solubles en agua y poseen una alta biodisponibilidad (Jacob et al., 2019). Este polifenol es objeto de numerosos estudios científicos debido principalmente a sus propiedades beneficiosas para la salud. Se ha demostrado que posee actividad antioxidante, lo que es capaz de neutralizar los radicales libres en el cuerpo (Seeram et al., 2005). Los radicales libres son moléculas que pueden causar daño celular y contribuir al envejecimiento y a numerosas enfermedades crónicas (Vučić et al., 2019). La punicalagina también presenta propiedades antiinflamatorias y ha demostrado efectos preventivos frente a diversas enfermedades crónicas, como la diabetes, la obesidad y ciertos tipos de cáncer. Diversos estudios han demostrado que este compuesto es capaz de inhibir la proliferación de células cancerosas y promover la apoptosis (Larrosa et al., 2006).



1.7.2 Antocianinas

La granada es un fruto rico en pigmentos antocianicos (Hernández et al., 1999), pigmentos naturales que pertenecen a la clase de compuestos flavonoides. Estos compuestos son conocidos por proporcionar color rojo intenso a diferentes frutos, hortalizas y flores. Este color rojo depende de la concentración de la antocianina y de su estructura química (Holcroft y Kader 1999). Las principales antocianinas presentes en el fruto de la granada son: delfinidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido, cianidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido, pelargonidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido (Gil et al., 1995; Hernández et al., 1999). Además de proporcionar color a los frutos, las antocianinas poseen propiedades antioxidantes ya que neutralizan los radicales libres y protegen contra el daño oxidativo (Kim et al., 2003; Tsuda et al., 2003). Su capacidad antioxidante se debe fundamentalmente a su estructura química, que les permite donar electrones o hidrógenos a los radicales libres, estabilizándolos y evitando así el daño celular (Hu et al., 2016).

1.7.3 Ácido elágico

El ácido elágico es un compuesto fenólico que se encuentra presente en numerosas frutas y vegetales, como las granadas, las fresas, las frambuesas, entre ellos (Clifford y Scalbert, 2000). Forma parte de la familia de los elagitaninos, que se caracterizan por poseer una estructura química compleja. El ácido elágico se forma por la hidrólisis de los elagitaninos que puede ocurrir por diferentes factores, mecanismos y condiciones, como la concentración del compuesto, tiempo de reacción y las condiciones del pH (Faria et al., 2006). Un estudio llevado a cabo por González-Barrio et al. (2010) investigó la hidrólisis química de los elagitaninos utilizando ácido clorhídrico como agente de hidrólisis. Durante la reacción, los elagitaninos se descompusieron y liberaron ácido elágico, entre otros compuestos. Al igual que las punicalaginas y antocianinas, el ácido elágico puede presentar efectos beneficiosos para la salud, ya que tiene actividad antioxidante y antiinflamatoria (Lu, et al., 2008; El-Shitany et al., 2014). Puede prevenir la aparición de cáncer en diferentes tipos de células cancerosas, como el cáncer de mama (Prasad y Aggarwal, 2014), o el cáncer de piel (Afaq et al., 2003).

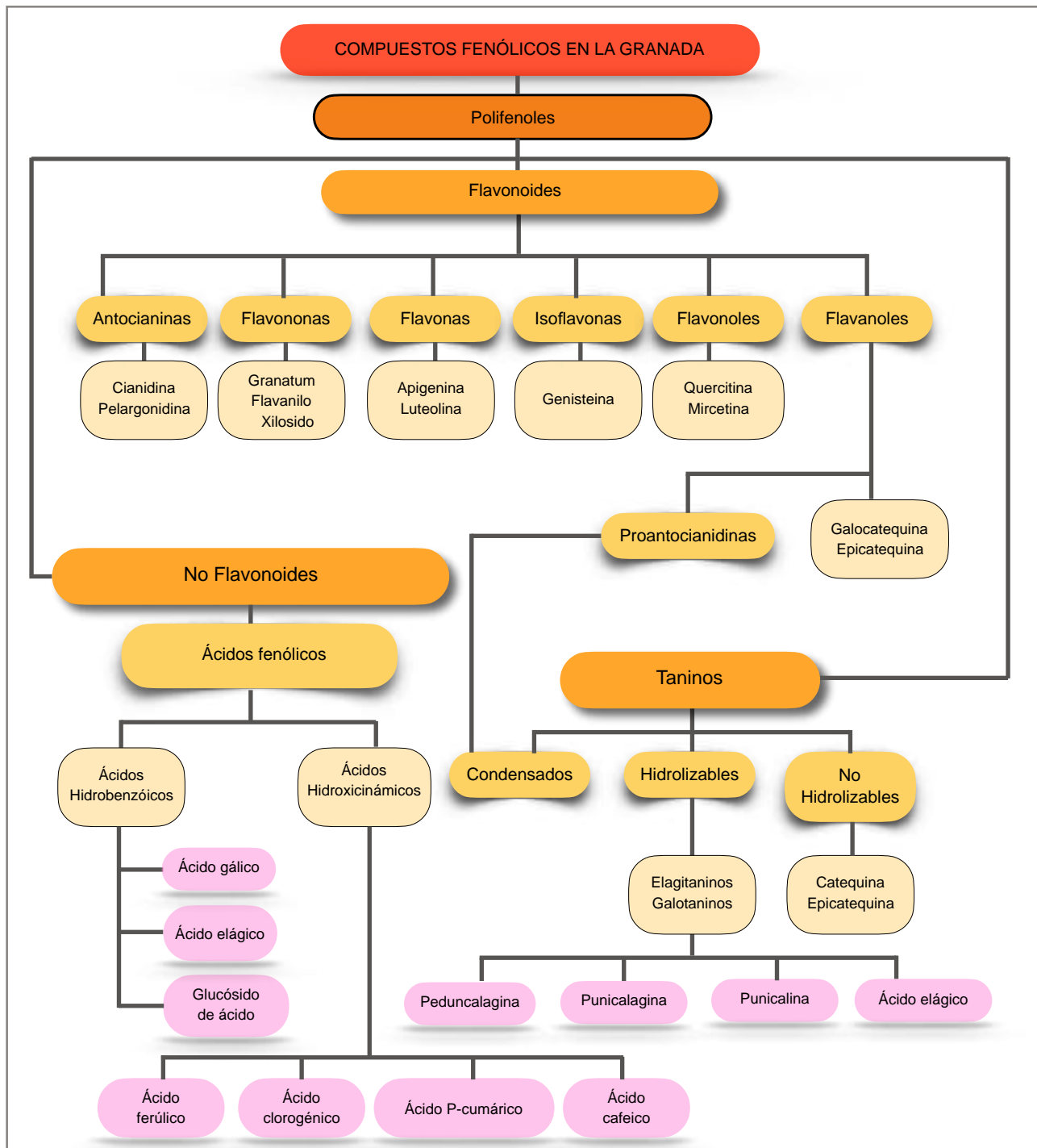


Figura 6: Principales compuestos fenólicos en la fruta de la granada. Fuente: Imagen adaptada de Viuda-Martos et al., 2010; Al-Muammar y Khan 2012; Rothwell et al., 2013; Viladomiu et al., 2013; Zarfeshany et al., 2012 y Zhao et al., 2014.



1.8 Maduración de la granada en el árbol

De acuerdo con los mecanismos fisiológicos implicados en la maduración de los frutos, estos se clasifican en dos grupos principales: climatéricos y no climatéricos. Las frutas climatéricas se caracterizan por un aumento significativo en la respiración y la producción de etileno, lo que activa su maduración incluso después de ser recolectadas. En contraste, las frutas no climatéricas, como la granada, no experimentan este incremento en etileno ni en la respiración durante su proceso de maduración (Giovannoni, 2001; Cherian et al., 2014; Giovannoni et al., 2017; Fenn y Giovannoni, 2021; Kou et al., 2021; Li et al., 2021a). A diferencia de las frutas climatéricas, que pueden continuar madurando con la aplicación de etileno exógeno, la granada solo madura en el árbol (Fray y Grierson, 1993; Alexander y Grierson, 2002; Barry y Giovannoni, 2007; Gapper et al., 2013).

La maduración de la granada implica una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos (Mubarok et al., 2019a; Mubarok et al., 2019b), como el aumento de azúcares (fructosa y glucosa), cuya concentración al momento de la cosecha oscila entre el 3 % y el 8 %, y una reducción en la acidez que varía entre el 0,2 % y el 2,5 %, dependiendo de la variedad (Melgarejo et al., 2000; Poyrazoglu et al., 2002; Mirdehghan y Rahemi, 2007; Ozgen et al., 2008). Los ácidos predominantes, málico y cítrico, contribuyen al equilibrio de dulzor y acidez en el fruto maduro (Famiani et al., 2015). Por otro lado, las vitaminas también experimentan diversos cambios a lo largo de su desarrollo (Usanmaz, 2014). En particular, la vitamina C (ácido ascórbico) tiende a disminuir durante las primeras fases de maduración del fruto, alcanzando concentraciones finales que oscilan entre 10 y 36 mg por cada 100 gramos tras la recolección (Kulkarni y Aradhya, 2005; Sayyari et al., 2010). Durante la maduración también se produce un aumento del color de los arilos debido principalmente a la acumulación de las antocianinas (Fawole y Opara, 2013a; Wu y Tian, 2017). En variedades más ácidas, las antocianinas mayoritarias son la cianidina 3,5-diglucósido y cianidina 3-glucósido, mientras que en variedades menos ácidas las mayoritarias son la cianidina 3-glucósido seguida de la delfinidina 3-glucósido (Miguel et al., 2004; Kulkarni y Aradhya, 2005; D'Aquino et al., 2010). La concentración de antocianinas en el fruto maduro depende principalmente de la variedad, y su concentración oscila entre valores de 10-200 mg/100 g de peso fresco del fruto



(Mirdehghan y Rahemi, 2007; Ozgen et al., 2008; Sayyari et al., 2010; 2011). A medida que se va desarrollando el fruto también se producen cambios en la concentración de los polifenoles, ya que disminuyen de forma significativa durante las primeras etapas de desarrollo del fruto. Una vez recolectados, la concentración del contenido fenólico se sitúa entre 90-120 mg/100 g de peso fresco del fruto, dependiendo de la variedad (Kulkarni y Aradhya, 2005; Mirdehghan y Rahemi, 2007; Ozgen et al., 2008; Sayyari et al., 2010). No obstante, es importante considerar que la concentración de polifenoles es notablemente superior en la corteza en comparación con los arilos (Li et al., 2006).

1.9 Cambios durante la postrecolección

La granada, al igual que el resto de los frutos, cuando es recolectada, continúa su actividad metabólica, lo que da lugar a diversas alteraciones que provocan la disminución de su calidad en un corto periodo de tiempo (Pott et al, 2020). La deshidratación, aumento de la tasa respiratoria, daños por frío y la sobremaduración son las principales alteraciones que se producen cuando el fruto es recolectado (Mirdehghan et al., 2019). Además, los posibles daños mecánicos durante la recolección y/o manipulación pueden originar fisuras en la corteza del fruto, provocando un aumento de la deshidratación, pardeamiento y entrada de microorganismos (Heber et al., 2006).

La deshidratación se debe principalmente al proceso de transpiración, la cual se define como la pérdida de agua en estado de vapor por la superficie de los órganos vegetales y que depende principalmente de la estructura de la epidermis y del espesor de la cutícula (Fonseca et al., 2002). La temperatura y la humedad relativa pueden afectar directamente al proceso de deshidratación (Fonseca et al., 2002; Caleb et al., 2012a). Por lo tanto, para reducirla se debe disminuir la temperatura y aumentar la humedad relativa (Mahajan et al., 2008, Caleb et al., 2012a). La granada es sensible a los daños por frío, cuando es almacenada a temperaturas inferiores a 5 °C, los cuales se manifiestan mediante pardeamiento y depresiones en la corteza (Elyatem y Kader, 1984), contribuyendo así a la pérdida de calidad del fruto. Durante la conservación en frío, también se producen una serie de alteraciones en la composición lipídica de las membranas celulares, con una reducción significativa de la concentración de ácidos grasos, tanto de los saturados como



de los insaturados. Esta disminución origina el incremento en la fuga de electrolitos, debido a los daños provocados en la permeabilidad de la membrana (Mirdehghan et al., 2019).

Por otro lado, durante la conservación postrecolección de la granada, se produce una disminución significativa de la acidez, debido a la disminución de los ácidos mayoritarios, que afecta significativamente al sabor. Además, la firmeza del fruto se reduce y aumenta el índice de madurez (Kader et al., 1984; Gil et al., 1996; Fawole et al., 2012). En cuanto a los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de los arilos de la granada cv. “Mollar de Elche” también se producen cambios cuando el fruto es recolectado en un estado de madurez avanzado y se almacena durante largos períodos de tiempo a temperaturas inferiores a 5 °C (Sayyari et al., 2010; 2011). Ello da lugar a una disminución en la concentración de los polifenoles totales y del contenido del ácido ascórbico, provocando con ello una disminución de la actividad antioxidante y, por lo tanto, pérdidas en las propiedades funcionales del fruto. No obstante, estudios llevados a cabo con granada cv. “Mollar de Elche” recolectada en un estado de madurez más temprano, se ha comprobado que aumentó el contenido de polifenoles, antocianinas y actividad antioxidante (Mirdehghan et al., 2019). Por lo tanto, el estado de madurez, la variedad y el tiempo de conservación son factores que influyen directamente sobre la evolución de los compuestos bioactivos de la granada (Fawole et al., 2012).

1.10 Estrategias de conservación de la granada

Como se ha comentado en el apartado anterior, la granada presenta pérdidas de calidad cuando es recolectada. No obstante, existen diferentes estrategias de conservación que ayudan a mantener las propiedades organolépticas y funcionales del fruto entre los que destacan:

1.10.1 Temperatura y humedad relativa

La temperatura es el factor más importante para controlar la respiración, transpiración y el desarrollo de microorganismos. La conservación en frío desempeña un papel crucial como estrategia de conservación de los frutos, ya que permite prolongar su vida útil y



mantener su calidad (Rapisarda et al., 2008). Las temperaturas inferiores a 10 °C retrasan los procesos de maduración y deterioro, además de controlar el crecimiento microbiano. El frío es capaz de reducir la actividad metabólica en las frutas, aumentando el tiempo de conservación. Además, el frío actúa como inhibidor del crecimiento microbiano ya que las bajas temperaturas disminuyen la actividad enzimática y metabólica de los microorganismos, prolongando la vida útil de los frutos. En la granada, temperaturas entre 5-7 °C pueden alargar la vida comercial del fruto durante 2-3 meses (Kader et al., 1984; Sayyari et al., 2011). No obstante, las temperaturas inferiores a 5 °C pueden causar daños por frío, lo que provoca pardeamientos tanto en la corteza como en los arilos, además de hendiduras en la corteza y la aparición de podredumbres (Elyatem y Kader, 1984), reduciendo así la aceptabilidad del fruto. Diferentes estudios han descrito que las variedades de granadas menos ácidas, como la granada cv. “Mollar de Elche”, son más susceptibles a sufrir daños por frío en comparación con las variedades más ácidas (Wonderfu), y es por ello, que estas primeras se deben almacenar a una temperatura de 10 °C (Kader et al., 1984). En otro estudio, se ha descrito una considerable reducción de los daños por frío cuando granadas almacenadas a temperaturas por debajo de los 5 °C fueron sometidas a temperaturas de 20 °C durante 24 horas cada seis días de almacenamiento en frío (Artés et al., 1998), aunque el ataque fúngico no se inhibió completamente. La humedad relativa es otro factor importante y su principal objetivo es reducir la pérdida de peso sin aumentar el desarrollo de microorganismos y podredumbres. La humedad relativa, en la conservación de la granada se debe situar en torno al 90-95 % (Artés et al., 2000).

1.10.2 Envasado en atmósfera modificada

El envasado en atmósfera modificada es una técnica utilizada en la industria alimentaria para mantener la calidad de los frutos (Lufu et al., 2018; Artés et al., 2000). Consiste en modificar la composición de los gases en el interior de los envases con el objetivo de reducir el crecimiento de microorganismos y retrasar los procesos de deterioro (Caleb et al., 2012b). Algunos de los beneficios del envasado de las granadas en atmósfera modificada son: reducción de la pérdida de peso, retraso en el proceso de maduración y preservar el color natural de la granada, así como su textura y sabor (Artés et al., 2000;



Lufu et al., 2020a). Para prolongar el almacenamiento y la vida útil de la fruta, los polímeros que se utilizan para el envasado de la granada están diseñados para reducir la pérdida de agua, tasa de respiración y la proliferación microbiana (Artés et al., 2000; Caleb et al., 2012b). En un estudio llevado a cabo por Lufu et al. (2018) consiguieron reducir la pérdida de peso y el desarrollo de microorganismos de la granada Wonderful durante su almacenamiento en frío a 5 °C con el uso de polímeros micro y macroperforados de 2 milímetros Xtend®. Del mismo modo Selcuk y Erkan (2015) describieron que las granadas de la variedad Hicaznar envasadas en film Xtend® y ZOEpac® presentaron una menor pérdida de peso y desarrollo de podredumbres durante 120 días de almacenamiento en frío a 6 °C. En general, el uso de polímeros para el envasado de la granada presenta excelentes prestaciones mecánicas, como la resistencia a la tracción y a los desgarres y, además, a la permeabilidad de los gases (Siracusa et al., 2008; Caleb et al., 2012b). Sin embargo, los nuevos estilos de vida y tendencias de consumo que muestran la preferencia de los consumidores por envases sin plásticos y que sean respetuosos con el medio ambiente, hacen que el uso de polímeros no se considere una óptima herramienta en poscosecha (Motelica et al., 2020). De ahí surge la necesidad de emplear o llevar a cabo otras estrategias que sean capaces de garantizar la calidad de la granada durante su conservación y, además, que sean respetuosas con el entorno medioambiental (Ncube et al., 2020). El uso de plásticos biodegradables, recubrimientos comestibles o compuestos naturales procedentes de las plantas, son algunos ejemplos de ello.

1.10.3 Envasado de los frutos en plásticos biodegradables

La tecnología de envasado de frutas y hortalizas ha experimentado una evolución acelerada, impulsada por el objetivo primordial de optimizar su conservación, comercialización, venta y consumo. En los últimos años, además de cumplir con estas funciones básicas, los envases deben ser también respetuosos con el medio ambiente y seguros para los consumidores (Abdul Khalil et al., 2018). Ante este nuevo paradigma, se han desarrollado materiales innovadores con propiedades biodegradables y métodos de fabricación sostenibles, que contribuyen a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero y la mitigación de la formación de microplásticos (Dedieu et al., 2022).



Recientemente, se han introducido en el mercado películas fabricadas con polímeros biodegradables, tales como el ácido poliláctico (PLA) y el Poli(Butilén Adipato-co-Tereftalato) (PBAT) (Dedieu et al., 2022).

El PLA es un biopolímero derivado de recursos renovables, como el almidón de maíz o la caña de azúcar, lo que lo convierte en una opción para aplicaciones de envasado sostenible. Se caracteriza por ser biodegradable bajo condiciones industriales de compostaje y por tener propiedades mecánicas que lo hacen competitivo frente a plásticos derivados del petróleo, como el polietileno (Siracusa et al., 2008). Sin embargo, uno de los desafíos del PLA es su fragilidad y su limitada capacidad de deformación, lo que restringe su uso en aplicaciones que requieren una mayor flexibilidad. Además, el PLA tiene una alta permeabilidad a gases como el oxígeno (O_2), dióxido de carbono (CO_2) y vapor de agua (H_2O), lo que limita su capacidad para proteger los alimentos envasados durante largos períodos de tiempo (Rabnawaz et al., 2017; Khalid y Arif, 2022).

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado mezclas de PLA con PBAT, un copoliéster alifático-aromático que combina propiedades de biodegradabilidad con una mayor flexibilidad y resistencia mecánica. El PBAT, aunque derivado de fuentes petroquímicas, es completamente biodegradable en el suelo y en entornos compostables, lo que lo convierte en un complemento ideal para mejorar las propiedades del PLA (Dedieu et al., 2022). Las mezclas de PLA y PBAT han demostrado ser altamente efectivas para mejorar la resistencia al impacto y a la elongación o estiramiento, lo que permite su aplicación en una gama más amplia de productos de envasado, incluyendo películas y bolsas flexibles (Changwichan et al., 2018). Sin embargo, el uso de esta combinación sigue siendo limitado en la industria del envasado de frutas y hortalizas, habiéndose documentado hasta la fecha únicamente en productos como la fruta de la pasión (Zhang et al., 2019a) y en brócoli (Paulsen et al., 2022).

Las mezclas de PLA-PBAT no solo mejoran las propiedades mecánicas del PLA, sino que también conservan la biodegradabilidad de ambos componentes. A diferencia del polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), que es altamente resistente a la biodegradación, los productos fabricados con mezclas de PLA y PBAT pueden



descomponerse en un período mucho más corto bajo condiciones controladas de compostaje industrial (Gioia et al., 2021). Esta capacidad de biodegradación hace que las mezclas de PLA-PBAT sean una solución atractiva para reducir la huella ambiental del envasado de un solo uso, que ha sido una preocupación creciente en los últimos años.

Sin embargo, a pesar de sus beneficios ambientales, las mezclas de PLA-PBAT también presentan desafíos. Uno de los principales obstáculos es el costo de producción, que sigue siendo superior al de los plásticos tradicionales como el LLDPE. Además, el PLA y el PBAT tienen diferentes puntos de fusión y velocidades de cristalización, lo que puede complicar el procesamiento de estas mezclas y afectar la calidad del producto final (Rossi et al., 2015). A pesar de estos desafíos, se han logrado avances importantes en la optimización del procesamiento de mezclas PLA-PBAT, mejorando la compatibilidad de ambos polímeros y aumentando la eficiencia de producción (Zembouai et al., 2014).

Otro aspecto crítico por considerar es la reciclabilidad de las mezclas PLA-PBAT. Aunque estos materiales son biodegradables, su integración en sistemas de reciclaje existentes es limitada. La mezcla de biopolímeros con plásticos convencionales puede afectar negativamente la calidad del material reciclado, lo que dificulta la implementación de sistemas de reciclaje a gran escala para estos productos (Park y Kim, 2014). Sin embargo, se están llevando a cabo investigaciones para desarrollar métodos de reciclaje más eficientes para los biopolímeros, lo que podría aumentar su viabilidad en el futuro.

En términos de propiedades de barrera, las mezclas de PLA-PBAT presentan una mejora respecto al PLA puro, aunque siguen siendo inferiores al LLDPE. El polietileno lineal de baja densidad es conocido por su excelente resistencia a la permeabilidad de gases, lo que lo convierte en un material ideal para aplicaciones de envasado de alimentos que requieren una protección a largo plazo. Sin embargo, las investigaciones actuales están enfocadas en mejorar las propiedades de barrera de las mezclas PLA-PBAT mediante la adición de nanorellenos y otros aditivos que pueden reducir la permeabilidad y mejorar la estabilidad del material (Changwichan et al., 2018).

Tanto el LLDPE como las mezclas de PLA-PBAT juegan un papel crucial en la industria del envasado, pero desde perspectivas muy diferentes. Mientras que el LLDPE sigue



siendo el estándar debido a sus propiedades mecánicas y su versatilidad, el PLA y sus mezclas con PBAT representan una alternativa más sostenible en la lucha contra la contaminación plástica. A medida que avanza la investigación en biopolímeros y se superan los desafíos técnicos, es probable que las mezclas PLA-PBAT jueguen un papel cada vez más importante en el futuro del envasado sostenible. Las innovaciones en el procesamiento, reciclabilidad y propiedades de barrera de estas mezclas serán clave para su adopción masiva en la industria del envasado (Siracusa et al., 2008; Rabnawaz et al., 2017; Dedieu et al., 2022).

1.10.4 Recubrimientos comestibles

Los recubrimientos comestibles, conocidos también como películas comestibles, son capas delgadas que se aplican sobre los alimentos con el fin de mejorar su apariencia, aumentar su vida útil y aportar propiedades beneficiosas (Aguirre-Joya et al., 2018). Para conseguir una fina capa protectora, los recubrimientos pueden ser pulverizados sobre el fruto, o el fruto puede ser sumergido en ellos (Yousuf et al., 2018; Thakur et al., 2019). El recubrimiento comestible está elaborado con ingredientes no tóxicos y biodegradables, como polisacáridos, proteínas y lípidos y actúa como capa de barrera contra el intercambio de solutos, la pérdida de agua y la difusión de los gases (Sabbah et al., 2019; Kõrge et al., 2020). En la industria alimentaria, el recubrimiento comestible presenta un coste de fabricación asequible, toxicológicamente es seguro y preserva la calidad del alimento (Bhardwaj et al., 2019). En los últimos años, el uso de recubrimientos comestibles ha mostrado un gran potencial como tecnología poscosecha para conservar y alargar la vida útil de los frutos durante su almacenamiento (Vargas et al., 2008; Dhall, 2013; Jafarzadeh et al., 2021). En cuanto a la granada, numerosos estudios han demostrado la eficacia de los recubrimientos comestibles para minimizar la pérdida de peso y la incidencia de podredumbres en diferentes variedades durante su almacenamiento en frío (Miguel et al., 2004; Barman et al., 2011; Meighani et al., 2015; Kawhena et al., 2021). También se han observado resultados similares en otros tipos de frutos, como cítricos (Ali et al., 2021), aguacate (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005), melón (Cong et al., 2007) y piña (Nguyen, 2020). Actualmente, los recubrimientos comestibles se combinan con otras tecnologías como el envasado en atmósfera



modificada, con el fin de mantener la calidad organoléptica de los frutos. Por ejemplo, la granada de la variedad Wonderful tratada con un recubrimiento de goma arábiga y almidón de maíz y envasada en atmósfera modificada presentó una menor pérdida de peso cuando fue almacenada en frío a 5 °C durante 42 días (Kawhena et al., 2021).

1.10.5 1-Metilciclopropeno (1-MCP)

El 1-metilciclopropeno (1-MCP) es un compuesto inhibidor de la acción del etileno y tiene efectos importantes en la maduración y senescencia en frutos, hortalizas y flores. Este compuesto ha sido objeto de múltiples estudios debido a su capacidad para prolongar la vida útil de productos frescos durante el almacenamiento y transporte, lo que ha revolucionado las prácticas poscosecha. Desde su descubrimiento, más de un centenar de estudios han analizado en profundidad sus mecanismos de acción y aplicaciones comerciales (Blankenship y Dole, 2003).

A nivel molecular, el 1-MCP actúa bloqueando los receptores de etileno presentes en las células vegetales. Este compuesto tiene una afinidad significativamente mayor por los receptores de etileno que el propio etileno, lo que le permite ocupar estos sitios y prevenir la unión del etileno, inhibiendo así las respuestas fisiológicas asociadas a esta hormona (Sisler y Serek, 2006). Una vez que el 1-MCP se une a los receptores, su efecto persiste durante un período de tiempo considerable, dependiendo de factores como la especie vegetal, la temperatura y el estado fisiológico del producto (Watkins, 2002). Esto detiene la transcripción de genes relacionados con la maduración, retrasando procesos fisiológicos del fruto, como su ablandamiento y cambios en color y sabor (Yang y Hoffman, 1984; Fan et al., 1999a; Watkins et al., 2000; Watkins, 2006).

El etileno es responsable de varios procesos de maduración (Mubarok et al., 2019c), tales como la abscisión de hojas y flores, la descomposición de la clorofila (responsable del amarillamiento) y la degradación de la firmeza de los tejidos vegetales. Al inhibir estas funciones mediante el bloqueo de los receptores de etileno, el 1-MCP ralentiza la maduración y prolonga la vida útil de los productos agrícolas (Sisler et al., 1996).

Además, el 1-MCP también interfiere en la biosíntesis del etileno en algunas especies mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, lo que refuerza su capacidad de



inhibición (Blankenship y Dole, 2003). Las aplicaciones comerciales del 1-MCP han demostrado ser enormemente beneficiosas en la industria hortícola y de floricultura. Este compuesto se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de productos, incluyendo frutas climatéricas como manzanas, peras, plátanos y aguacates, así como en flores cortadas y plantas ornamentales (Watkins, 2002). El uso del 1-MCP permite que estos productos mantengan su firmeza, frescura y apariencia estética durante períodos prolongados, lo que facilita su almacenamiento, transporte y comercialización (Serek et al., 1995). En el caso de las flores cortadas, el tratamiento con 1-MCP retrasa significativamente los efectos del etileno, previniendo la senescencia y la abscisión de pétalos y hojas, lo que extiende considerablemente su vida útil (Serek et al., 1995). Asimismo, en productos hortícolas sensibles al etileno, como los tomates y los aguacates, el 1-MCP permite controlar el proceso de maduración, lo que contribuye a mejorar la logística y reducir las pérdidas poscosecha (Blankenship y Dole, 2003).

El tratamiento con 1-MCP tiene un impacto significativo en la calidad poscosecha de los productos frescos. En frutas como las manzanas y peras, el compuesto ayuda a mantener la firmeza y textura crujiente durante meses, lo que mejora la experiencia del consumidor y prolonga el tiempo en el que las frutas se mantienen comercializables (Fan et al., 1999b). Además, el 1-MCP al retrasar el amarillamiento causado por la descomposición de la clorofila, preserva el color y la apariencia visual de los productos, lo que es crucial para la percepción de frescura (Jiang et al., 2001). Asimismo, el uso del 1-MCP ha demostrado ser efectivo en la reducción de la producción de compuestos volátiles asociados con el proceso de maduración. Esto contribuye a mejorar no solo el sabor, sino también la composición nutricional de los productos almacenados (Fan et al., 1999a). Su aplicación en granada mostró resultados positivos, reduciendo significativamente el pardeamiento de la corteza, así como la pérdida de peso, la producción de etileno y un aumento de la firmeza, acidez titulable y el contenido de vitamina C (Khademi et al., 2017; Valdenegro et al., 2018; Wan et al., 2023). A pesar de los múltiples beneficios del 1-MCP, existen algunas limitaciones y consideraciones importantes. Una de las principales limitaciones es la variabilidad en la respuesta de diferentes especies al tratamiento. Mientras que, en frutas climatéricas, como las manzanas y los plátanos, el 1-MCP es altamente efectivo, en frutas no climatéricas, como



las fresas o las uvas, su eficacia es limitada debido a la menor dependencia de estas especies del etileno para su maduración (Sisler et al., 1999).

Otro aspecto por considerar es que la eficacia del 1-MCP depende de diversos factores ambientales, como la temperatura y el tiempo transcurrido entre la cosecha y el tratamiento. El compuesto debe aplicarse lo antes posible después de la cosecha para obtener los mejores resultados, ya que la exposición prolongada al etileno antes del tratamiento puede reducir significativamente su efecto (Jiang et al., 2001). Además, con el tiempo, las plantas pueden regenerar nuevos receptores de etileno, lo que eventualmente restaura la sensibilidad al etileno, limitando la duración del efecto del 1-MCP (Sisler et al., 1996). Esto implica que el compuesto no es una solución permanente y que se deben gestionar cuidadosamente los tiempos de almacenamiento y distribución para evitar una maduración repentina y no deseada.

1.11 Tratamientos innovadores: elicitores

Las plantas están continuamente expuestas a diferentes tipos de estrés, tanto de origen biótico como abiótico (Figura 7), los cuales han sido objeto de estudio en las últimas décadas (Cavanagh et al., 2008; Munns y Tester, 2008; Chinnusamy y Zhu, 2009; Mittler y Blumwald, 2010). El estrés biótico, provocado por organismos vivos como bacterias, virus, hongos e insectos, son una amenaza persistente para las plantas, ya que pueden causar graves daños, pérdidas económicas y escasez de alimentos (Jiménez et al., 2023; Aina et al., 2022). Estos organismos bióticos pueden afectar el crecimiento y la salud de las plantas al provocar infecciones, plagas y enfermedades que reducen su productividad y, en muchos casos, resultan en una pérdida considerable de recursos agrícolas (Ali et al., 2023). Además del estrés biótico, las plantas se enfrentan a la amenaza del estrés abiótico, como la sequía, la salinidad, la alta intensidad lumínica, el frío, los nutrientes y las altas temperaturas (Alnefaie et al., 2023) siendo este último, uno de los factores más investigados en la actualidad (Ahuja et al., 2010; Mittler y Blumwald, 2010; Mittler et al., 2012; Li et al., 2013). La aplicación de elicitores ha demostrado ser una estrategia efectiva en la industria frutícola, ya que mejora la calidad de los frutos y aumenta su



resistencia frente a enfermedades y estrés ambiental (Thakur y Sohal, 2013; Moreno-Escamilla et al., 2018; García-Pastor et al., 2020a).

Los elicitores son compuestos naturales o sintéticos (ácido salicílico, jasmónico, oligogalacturónidos, etc.) capaces de activar las respuestas de defensa de las plantas (Schreiner, 2005), dando lugar a mecanismos de resistencia y protección frente a patógenos y condiciones adversas (Caicedo-Lopez et al., 2021). Entre las respuestas más relevantes, destacan: 1) *Activación de genes de defensa* que codifican proteínas y enzimas clave involucradas en las respuestas de defensa, como las quitinasas, glucanasas y enzimas de señalización (Burketová et al., 1999). La activación de estos genes da lugar a la síntesis de metabolitos secundarios que protegen a las plantas contra los patógenos. 2) *Producción de metabolitos secundarios* como las fitoalexinas, que son compuestos producidos en respuesta a la presencia de patógenos. Los flavonoides, destacados por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y los terpenoides, que pueden actuar como inhibidores frente a patógenos, desempeñan un papel clave en la defensa de las plantas (Paladines-Quezada et al., 2019). 3) *Activación de respuestas antioxidantes* para contrarrestar el estrés oxidativo causado por los patógenos y los factores mediambientales, como las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y glutatión peroxidasa (GPX) (Pnueli et al., 2003), las cuales ayudan a neutralizar los radicales libres y a reducir los daños oxidativos en las células vegetales (Ge et al., 2019). 4) *Fortalecimiento de la pared celular* mediante la deposición de compuestos como lignina, suberina y calosa, que refuerzan la estructura y resistencia de la pared celular contra la penetración de patógenos (Sticher et al., 1997). Además, los elicitores pueden aumentar la producción de polisacáridos como las pectinas, que mejoran la cohesión y la estabilidad de la pared celular (Gozzo, 2003). 5) *Respuestas sistémicas adquiridas*, lo que se traduce, en la activación de defensas en otras partes de las plantas. Estas respuestas implican la transmisión de señales a través del sistema vascular, lo que resulta en la activación de genes de defensa en tejidos distantes (Ryals et al., 1996). Debido a su capacidad para mejorar la calidad organoléptica, nutricional y funcional del fruto (Moreno-Escamilla et al., 2017; De la Rosa et al., 2024) y además de ser compuestos respetuosos con el medio ambiente, los elicitores han cobrado gran interés por parte de los investigadores en los últimos años (El-



Gamal et al., 2007). La aplicación de estos se puede llevar a cabo mediante pulverización foliar, es decir, aplicándolos directamente sobre las hojas, o bien mediante tratamientos de inmersión de los frutos.

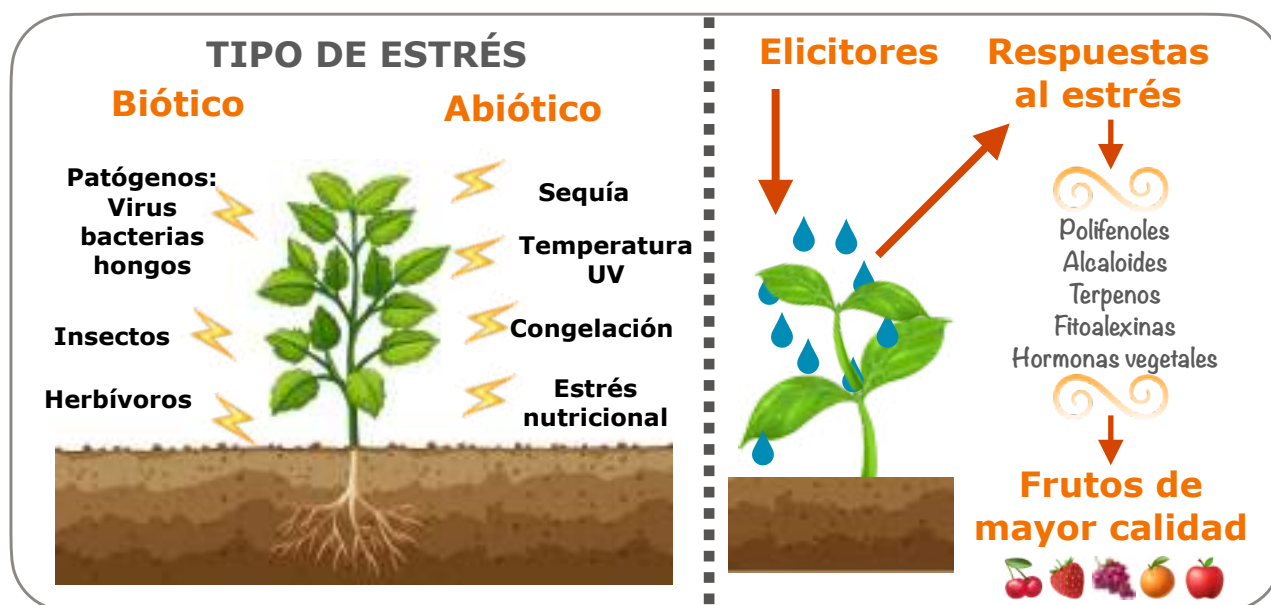


Figura 7: Representación esquemática de los diferentes tipos de estrés en plantas. Fuente: Imagen adaptada de Alnefaie et al. (2023).

1.11.1 Jasmonato de metilo (JaMe)

El jasmonato de metilo (JaMe) es un compuesto derivado del ácido jasmónico (AJ), perteneciente al grupo de las oxilipinas, moléculas clave en la señalización de respuestas al estrés en las plantas. Estas oxilipinas no solo participan en la defensa contra patógenos y herbívoros, sino que también regulan diversos procesos fisiológicos, como el crecimiento y el desarrollo (Li et al., 2018; Pan et al., 2020) (Figura 10). El JaMe ha ganado popularidad debido a su versatilidad en la regulación de diversas funciones en las plantas, así como por su potencial aplicación en la biotecnología agrícola (Wasternack y Hause, 2013).

La biosíntesis del jasmonato de metilo se inicia con la liberación de ácido linolénico a partir de galactolípidos en las membranas de los cloroplastos (Wasternack y Hause, 2013). Este ácido graso es procesado a través de una serie de reacciones enzimáticas mediadas por las lipoxigenasas (LOX) y las aleno óxido sintasas (AOS), que finalmente



producen ácido jasmónico. Este se convierte en JaMe mediante la acción de la enzima jasmonato O-metiltransferasa (JMT), produciendo un compuesto volátil que actúa como señal de defensa (Seo et al., 2001). El JaMe desempeña un papel crucial en la señalización de defensa de las plantas, a través del complejo SCFCO11-JAZ. Este complejo regula la activación de factores de transcripción que, en condiciones normales, están reprimidos por las proteínas JAZ. En presencia de JaMe o AJ, las proteínas JAZ se degradan, lo que libera factores de transcripción como MYC2, permitiendo la expresión de genes de defensa (Chini et al., 2007; Yan et al., 2007).

Además de su papel en la defensa, el JaMe regula procesos clave como la senescencia, la maduración de frutos y la abscisión de hojas. En la maduración de frutos, induce la producción de compuestos volátiles que contribuyen al aroma y sabor, mientras que en la senescencia promueve la degradación controlada de proteínas, facilitando la redistribución de nutrientes (Wasternack, 2007). Estos procesos son esenciales para el ciclo de vida de la planta y su capacidad para adaptarse a cambios ambientales. En términos de impacto en la calidad de los frutos, se ha investigado ampliamente el uso de JaMe en la horticultura como tratamiento poscosecha para mejorar la calidad de los productos agrícolas. Entre los beneficios de su aplicación, se incluye la mejora en la síntesis de compuestos volátiles (Cai et al., 2020), el aumento de los niveles de antioxidantes, y la inhibición de la senescencia de los frutos (Zhu et al., 2022). En particular, se ha encontrado que el JaMe mejora la firmeza de los frutos y retrasa la actividad de las enzimas que hidrolizan las paredes celulares, lo cual resulta en una vida útil más prolongada (Baswal et al., 2020; Wang et al., 2021a). También ha sido utilizado para inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios, como los fenoles, antocianinas y flavonoides, compuestos que no solo mejoran la calidad nutricional de los frutos, sino que también incrementan su valor antioxidante. Por ejemplo, se ha demostrado que en cultivos como el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y las cerezas (*Prunus avium* L.), la aplicación exógena de JaMe aumenta los niveles de fenoles endógenos mediante la activación de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), una enzima clave en la vía biosintética de los compuestos fenólicos (Flores y del Castillo, 2014; Tao et al., 2022). En cerezas y mandarinas, por ejemplo, ha demostrado ser eficaz para reducir el daño por frío y la degradación de las membranas celulares, así como para mitigar el estrés oxidativo



durante el almacenamiento en frío (Baswal et al., 2020; Pan et al., 2022). En otras frutas, como los arándanos y los caquis, la aplicación de JaMe ha resultado en una mayor firmeza del fruto y en un menor índice de descomposición, además de mejorar la estabilidad de la pared celular y reducir la peroxidación lipídica (Cao et al., 2010; Bagheri y Esna-Ashari, 2022). Además de mejorar la firmeza, el JaMe también influye en la composición química de los frutos, incrementando los niveles de sólidos solubles, azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa) y otros compuestos fenólicos. Por ejemplo, en frambuesas, la aplicación de JaMe antes de la cosecha resultó en un aumento en el contenido de quercetina y ácido elálgico, junto con una mayor actividad de la enzima PAL, promoviendo así la biosíntesis de flavonoides (Ghasemnezhad y Javaherdashti, 2008; Flores y del Castillo, 2014). Estos efectos no solo mejoran el sabor y la calidad nutricional de los frutos, sino que también prolongan su vida útil, lo que es crucial para su comercialización y consumo. Su aplicación en frutas como el kiwi ha mostrado resultados prometedores para reducir la pérdida de peso, minimizar las pérdidas de vitamina C y mejorar el contenido de fenoles y flavonoides durante el almacenamiento (Lv et al., 2018; Wu et al., 2020a). En el caso del tomate, se ha observado que el JaMe puede regular la biosíntesis de etileno, una hormona clave en el proceso de maduración y senescencia de los frutos, lo que sugiere que la dosis de JaMe aplicada puede tener efectos tanto inhibidores como estimulantes sobre el etileno dependiendo de la concentración utilizada (Tao et al., 2021; Bron et al., 2023).

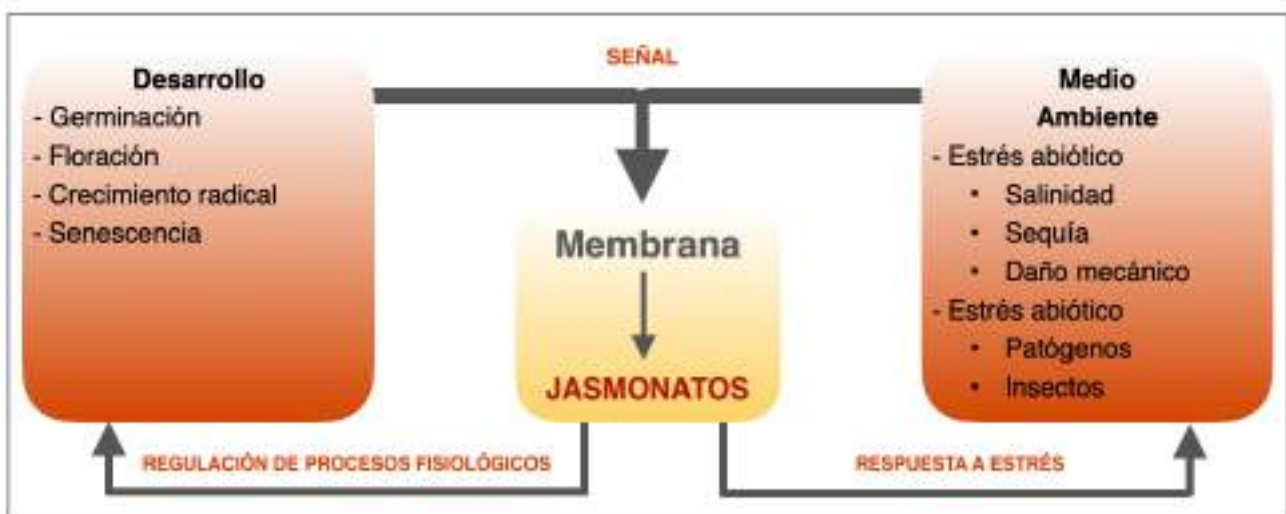


Figura 8: Participación de Jasmonatos a señales de desarrollo y medio ambiente. Fuente: Imagen adaptada de Li et al. (2018) y Pan et al. (2020).



1.11.2 Salicilatos

Los salicilatos son compuestos fenólicos (Cheynier, 2012; Pham, 2015) que las plantas sintetizan de forma natural como parte de su estrategia de defensa frente a diversas amenazas externas y situaciones de estrés ambiental (Hao et al., 2018; Zhao et al., 2020; Zhang y Li, 2019). Cuando una planta sufre una agresión, los salicilatos actúan como moléculas de señalización, provocando una respuesta sistémica de defensa en toda la planta (Tripathi et al., 2019). Esta respuesta incluye la activación de genes relacionados con la producción de proteínas de defensa, antioxidantes y otros compuestos protectores.

Uno de los compuestos fenólicos más destacados es el ácido 2-hidroxibenzoico, conocido como ácido salicílico (AS), ampliamente estudiado por su relevancia biológica y farmacológica (Dempsey et al., 2011; Lefevere et al., 2020). En plantas, la biosíntesis de AS se origina a partir de dos vías: la vía de la isocorismato sintasa (ICS) y la vía de la fenilalanina amonio liasa (PAL) (Torrens-Spence et al., 2019; Rekhter et al., 2019; Lefevere et al., 2020). Ambas son rutas biosintéticas que comienzan en los plástidos a partir del corismato y varían entre las especies vegetales. Aunque las plantas utilizan ambas vías de forma simultánea, la ruta ICS es la principal, contribuyendo a más del 90 % de la síntesis de ácido salicílico (Chen et al., 2009; Rekhter et al., 2019). Ambas vías se originan a partir de un precursor metabólico primario, el corismato. En la vía ICS, el primer paso es la conversión de corismato a su isómero, el isocorismato, mediante la enzima isocorismato sintasa (Yokoo et al., 2018).

En las plantas, el isocorismato se sintetiza en los plástidos y, posteriormente, se transporta desde los plástidos al citosol mediante el gen EDS5. Este gen se localiza en la envoltura del plástido y codifica la enzima transportadora MATE (extrusión de compuestos tóxicos y multirresistencia) plastidial (Yamasaki et al., 2013; Rekhter et al., 2019; Torrens-Spence et al., 2019). Posteriormente, la enzima isocorismato sintasa se conjuga con L-glutamato y se convierte en isocorismato-9-glutamato (ICS-Glu) a través de la enzima amidotransferasa citosólica. Finalmente, la descomposición espontánea de ICS-Glu produce ácido salicílico y 2-hidroxiacrilóil-N-glutamato. Por otro lado, las plantas utilizan la



vía PAL para sintetizar una fracción menor (~10%) de ácido salicílico y esto ocurre completamente en el citosol. Aquí, la enzima PAL convierte la fenilalanina en ácido trans-cinámico (t-CA) (Dong y Shang, 2013). Posteriormente, el t-CA se convierte en ácido salicílico a través de dos posibles intermediarios: ácido orto-cumárico y benzaldehído.

El ácido salicílico ha sido empleado en numerosas investigaciones como una herramienta eficaz para mejorar tanto el rendimiento como la calidad de los frutos en diversas especies vegetales, especialmente bajo condiciones de estrés hídrico. En cerezos sometidos a riego deficitario, su aplicación ha demostrado ser capaz de mitigar los efectos negativos del estrés hídrico. Además, se ha observado un aumento en la calidad del fruto, con mejoras significativas en el peso, el tamaño y la firmeza del fruto (González-Villagra et al., 2024). Su aplicación también incrementó la producción y mejoró varios atributos de calidad del fruto, como los sólidos solubles totales, el contenido de fenoles y la actividad antioxidante en el fruto del maqui (González-Villagra et al., 2023; 2024).

Su uso en la granada también ha demostrado numerosos beneficios sobre la calidad del fruto, como por ejemplo, la reducción del ataque fúngico y la disminución de daños por frío durante el almacenamiento. Estos efectos se vieron acompañados por un aumento en los sólidos solubles totales y la actividad antioxidante (García-Pastor et al., 2020b). Otro estudio realizado en granada cv. "Hicaznar", determinó que el tratamiento poscosecha con 2 mM de ácido salicílico, combinado con un almacenamiento en atmósfera controlada, ayudó a retrasar la pérdida de peso y firmeza durante el almacenamiento, preservando altos niveles de compuestos antioxidantes como los polifenoles y las antocianinas (Boshadi et al., 2018).

1.12 Melatonina y ácido γ -aminobutírico (GABA)

Otras de las sustancias que están siendo objeto de estudio en la actualidad por su impacto en la fisiología y mejora de la calidad de los frutos en las plantas son la melatonina y el ácido γ -aminobutírico (GABA). Ambos compuestos han despertado un gran interés debido a sus múltiples beneficios en la regulación de procesos de defensa y crecimiento vegetal (Guo et al., 2023; Khan et al., 2024).



1.12.1 Melatonina

La melatonina es una biomolécula que presenta efectos pleiotrópicos, además, está relacionada con la regulación de los ritmos circadianos y los ciclos biológicos en animales y plantas (Stehle et al., 2011; Jayarajan y Sharma, 2021). La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) fue descubierta en el año 1995 en las plantas y su estructura es similar a compuestos como el triptófano, la auxina y la serotonina (Jayarajan y Sharma, 2021). En plantas, la melatonina actúa como señal biológica que participa en varios procesos como la fotosíntesis, el desarrollo, la defensa, la germinación, la floración, la osmorregulación, y la protección frente al estrés biótico y abiótico (Hattori et al., 1995; Sharma y Zheng, 2019). Numerosos estudios científicos han demostrado que la aplicación de melatonina en cultivos hortícolas es capaz de mejorar la calidad de los frutos (Madebo et al., 2022), siendo una alternativa al empleo de productos químicos que pueden ser nocivos para la salud y el medioambiente (Jayarajan y Sharma, 2021).

Adicionalmente, se ha observado que la melatonina también juega un papel crucial en la reducción del estrés oxidativo en plantas, al incrementar la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa (Sharma y Zheng, 2019). Este efecto antioxidante resulta especialmente beneficioso para prolongar la vida útil de los productos vegetales tras la cosecha. También se ha reportado que este compuesto mejora la resistencia a condiciones de almacenamiento adversas, como las bajas temperaturas, que suelen causar daños por frío en frutas y hortalizas (Madebo et al., 2022). Por lo tanto, la melatonina no solo tiene aplicaciones agronómicas en el cultivo, sino que también podría integrarse en estrategias poscosecha más sostenibles para reducir pérdidas económicas y minimizar el impacto ambiental.

Las frutas se consumen principalmente como productos frescos, sin embargo, son alimentos muy perecederos una vez recolectados, dando lugar a una disminución de su contenido nutricional y de su calidad organoléptica y, por tanto, provocando un rechazo por parte de los consumidores (Kerch, 2015). Además, durante la maduración de los frutos se producen cambios como el ablandamiento, producción de etileno, pudriciones, entre otros (Mubarok et al., 2016). Desde hace años, se han estudiado métodos que



ayuden a prevenir las pérdidas en poscosecha de los cultivos vegetales, como la prevención del efecto del etileno a nivel receptor utilizando 1-metilciclopropeno como inhibidor del etileno (Mubarok et al., 2022), técnicas de mutación en genes receptores de etileno (Wiguna et al., 2021), atmósferas modificadas y aplicación de compuestos químicos, como fungicidas, ceras y óxido nítrico (Rastegar et al., 2020b).

1.12.1.1 Biosíntesis de la melatonina en plantas

A diferencia de los animales, el proceso de biosíntesis de la melatonina en las plantas es más complejo. La biosíntesis de la melatonina se produce, normalmente en los cloroplastos, pero también puede producirse en las mitocondrias (Jayarajan y Sharma, 2021). En la síntesis de la melatonina intervienen seis enzimas: L-triptófano descarboxilasa (TDC), triptamina 5-hidroxisilasa (T5H), serotonina N-acetiltransferasa (SNAT), acetil serotonina O-metiltransferasa (ASMT), ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT), y putativo triptófano hidroxilasa (TPH) (Mannino et al., 2021).

El primer paso en el proceso de biosíntesis de la melatonina es la conversión del triptófano, que es el compuesto clave para la biosíntesis de la melatonina, en serotonina a través de dos vías diferentes; procesos de hidroxilación y descarboxilación. La descarboxilación es más frecuente en las plantas que la hidroxilación. La primera vía es la descarboxilación del triptófano a triptamina con la ayuda de la enzima TDC, después la triptamina se hidroxila en la 5ª posición del anillo de indol para formar 5-hidroxitriptamina (serotonina) con la ayuda de la enzima T5H. La segunda vía implica la hidroxilación del triptófano a 5-hidroxitriptófano con la ayuda de la enzima TPH, seguida del proceso de descarboxilación del 5-hidroxitriptófano para formar serotonina con la ayuda de la enzima TDC (Mannino et al., 2021).

El segundo paso en el proceso de biosíntesis de la melatonina es el proceso de conversión de la serotonina en melatonina a través de dos vías diferentes; las enzimas SNAT catalizan la serotonina en N-acetilserotonina y, a continuación, la N-acetilserotonina se convierte en melatonina con la ayuda de las enzimas ASMT. La segunda vía es el proceso de conversión de la serotonina en 5-metoxitriptamina con la ayuda de la enzima ASMT o COMT, seguido por el proceso de conversión de 5-metoxitriptamina en



melatonina catalizado por las enzimas SNATs o COMT (Tan et al., 2012; Mannino et al., 2021) (Figura 8).

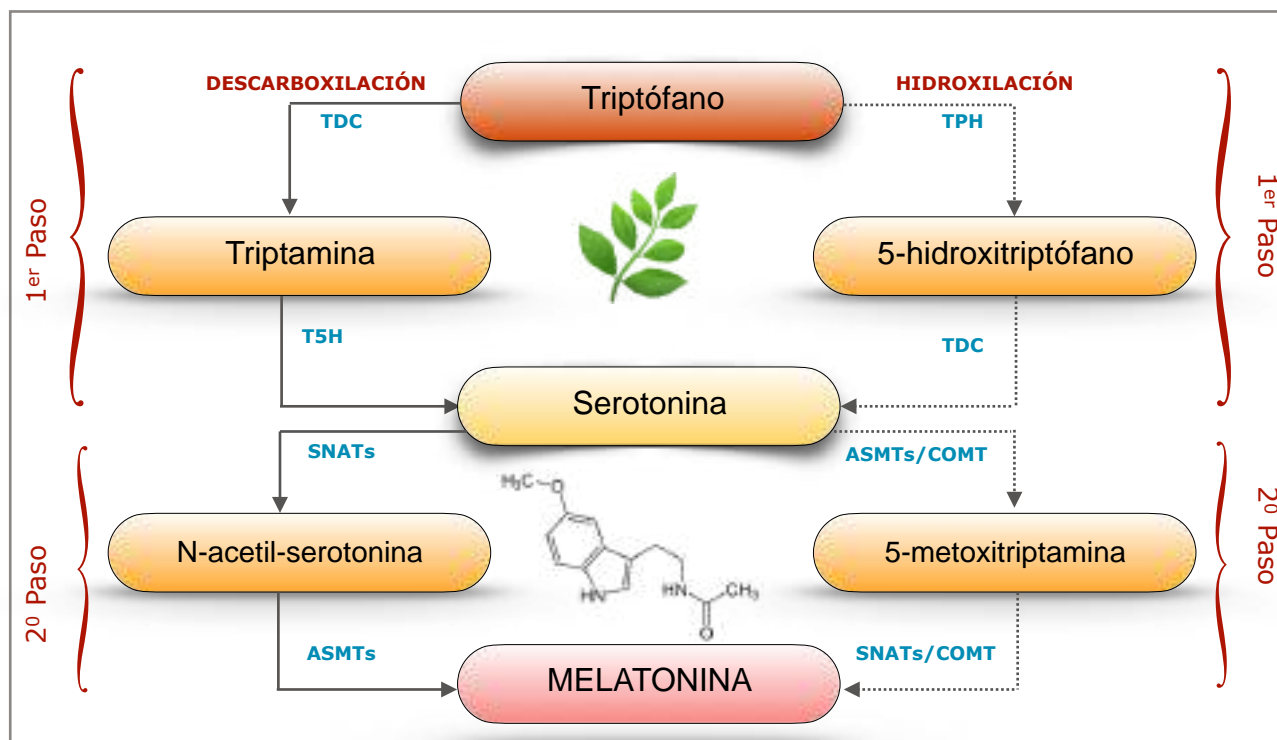


Figura 9: Biosíntesis de la melatonina en plantas a partir del triptófano. Fuente: Imagen adaptada de Tan et al. (2012) y Mannino et al. (2021).

1.12.1.2 Importancia de la melatonina en la maduración de los frutos

Diversos estudios han demostrado que la melatonina afecta a las vías de la biosíntesis del etileno, sin embargo, difiere entre las diferentes especies vegetales. La melatonina puede inducir o inhibir la producción de etileno durante diferentes procesos en las plantas. En tomates se ha comprobado que aumenta la producción de etileno mediante la regulación de la enzima 1-aminociclopropano ácido carboxílico sintasa 4 (Sun et al., 2015). Sin embargo, en peras puede reducir la producción de etileno (Zhai et al., 2018). Sun et al. (2015) demostraron que la melatonina exógena aumenta la biosíntesis del etileno antes y después del pico climatérico al aumentar la expresión de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintetasa junto con la del receptor de etileno. Además, las enzimas implicadas en la hidrólisis de los componentes de las paredes celulares, los carbohidratos, y en la biosíntesis de ácidos grasos y fenoles se ven



afectadas por la melatonina, lo que demuestra que la melatonina exógena regula la maduración y la senescencia de la fruta (Sun et al., 2016).

La aplicación de melatonina exógena sobre los frutos afecta los procesos fisiológicos durante su maduración y conservación (Pang et al., 2020; Xia et al., 2020). La melatonina puede influir en el contenido de metabolitos presentes en la fruta, ya que puede aumentar el contenido de ácido ascórbico, fenoles y flavonoides regulando las actividades del ácido cinámico-4-hidroxilasa (CH) y PAL en la vía metabólica fenilpropanoide, que regula la síntesis de flavonoides y otros metabolitos (Zhang et al., 2020; Fan et al., 2022a). Generalmente, durante el almacenamiento de los frutos, el contenido del ácido ascórbico disminuye debido al cambio de ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico por el proceso de la oxidasa del ácido ascórbico (Choudhary et al., 2008). Sin embargo, recientes investigaciones indican que el tratamiento con melatonina puede cambiar el contenido de ácido ascórbico en la fruta, resultando en un mayor nivel de resistencia al estrés oxidativo durante su maduración (Galano et al., 2011; Gao et al., 2016; Rastegar et al., 2020a).

La aplicación de melatonina en fresas demostró que puede reducir las concentraciones de malondialdehído (MDA) y H_2O_2 , al tiempo que aumenta el contenido total de fenoles y flavonoides, contribuyendo así a aumentar su actividad antioxidante (Liu et al., 2018). Sin embargo, el tratamiento con melatonina en fresas resultó en un menor contenido de ácido ascórbico (Liu et al., 2018). La respuesta difirió a la del tratamiento con melatonina en melocotones, donde mostró que mantenía su contenido de ácido ascórbico (Gao et al., 2016; Liu et al., 2018). Esto puede deberse a diferencias entre las especies vegetales, las condiciones de la fruta y las concentraciones de melatonina.

En la fruta de la granada, se ha demostrado que la aplicación de melatonina, especialmente a través del riego de los árboles, no solo aumentó el peso de los frutos, sino que también mejoró significativamente la concentración de vitamina C y antocianinas (Korkmaz et al., 2019). Las Tablas 2 y 3 presentan diversos ejemplos del uso de la melatonina como tratamiento, tanto en precosecha como en la de poscosecha, aplicados en distintas frutas y hortalizas.



Tabla 2: Revisión bibliográfica del efecto de la melatonina aplicada como tratamiento precosecha en diferentes frutas y hortalizas. Fuente: elaboración propia.

Tratamientos precosecha con melatonina				
Fruto	[μ M]	Aplicación	Efectos	Referencia
 Mandarina	100	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ peso de los frutos ↑ concentración de ácido ascórbico 	(Mollaei y Rastegar, 2024)
 Pimiento	100	Pulverización foliar Riego	<ul style="list-style-type: none"> ↑ concentración de clorofilas ↑ actividad enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) 	(Nasiri et al., 2024)
 Pera	100	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ sólidos solubles totales ↑ resistencia de la corteza ↓ acidez 	(Zhao et al., 2023)
 Cereza	300	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ rendimiento del cultivo ↑ sólidos solubles totales y acidez titulable ↓ % frutos podridos y/o rajados 	(Carrión-Antolí et al., 2022)
 Albaricoque	100	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ contenido de compuestos fenólicos ↓ maduración del fruto ↓ daños por frío 	(Medina-Santamaría et al., 2021)
 Frambuesa	100	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ enzimas: ascorbato peroxidasa, catalasa, etc. ↑ ácido ascórbico ↓ pérdida de peso 	(Shah et al., 2024)
 Albahaca	400	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↓ daños por frío 	(Albornoz et al., 2023)
 Arándanos	50 100	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ sólidos solubles totales y flavonoides ↑ enzimas antioxidantes: catalasa, etc. 	(Shah et al., 2023)
 Tomate	100	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ resistencia frente <i>Botrytis cinerea</i> 	(Li et al., 2022)
 Limón	100	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↓ pérdidas de peso ↑ contenido de compuestos fenólicos 	(Badiche et al., 2023)



Tabla 3: Revisión bibliográfica del efecto de la melatonina aplicada como tratamiento poscosecha en diferentes frutas y hortalizas. Fuente: elaboración propia.

Tratamientos poscosecha con melatonina				
Fruto	[μ M]	Aplicación	Efectos	Referencia
 Kiwi	100	Baño Tiempo: 30 min.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ polifenoles y actividad antioxidante ↓ ablandamiento y acumulación de malondialdeído 	(Wang et al., 2019)
 Mango	1000	Inmersión Tiempo: 10 min.	<ul style="list-style-type: none"> ↑ firmeza ↑ ácido ascórbico y actividad de las enzimas catalasa y peroxidasa 	(Rastegar et al., 2020a)
 Papaya	400	Inmersión Tiempo: 2 horas	<ul style="list-style-type: none"> ↑ actividad antioxidante ↑ enzimas: quitinasa, fenilalanina amonio liasa (PAL) ↓ ablandamiento e incidencia por antracnosis 	(Fan et al., 2022a)
 Arándanos	50	Pulverización	<ul style="list-style-type: none"> ↓ especies reactivas de oxígeno ↓ peroxidación lipídica de membrana ↑ actividad ascorbato peroxidasa 	(Shang et al., 2021)
 Plátano	200-500	Baño Tiempo: 2 horas	<ul style="list-style-type: none"> ↓ proceso de maduración del fruto 	(Hu et al., 2017)
 Guayaba	600	Baño Tiempo: 2 horas	<ul style="list-style-type: none"> ↓ ablandamiento e incidencia por antracnosis ↓ daño oxidativo ↑ enzimas: ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa 	(Fan et al., 2022b)
 Manzana	1000	Pulverización	<ul style="list-style-type: none"> ↓ producción de etileno ↓ pérdida de peso ↑ enzimas: peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa 	(Onik et al., 2021)
 Melocotón	100	Inmersión Tiempo: 10 min.	<ul style="list-style-type: none"> ↓ pérdida de peso e incidencia a podredumbres ↓ tasa de respiración ↓ actividad lipoxigenasa y contenido de malondialdeído 	(Gao et al., 2016)
 Ciruela	1000	Inmersión Tiempo: 90 min.	<ul style="list-style-type: none"> ↓ pérdida de peso ↑ enzimas: ascorbato peroxidasa ↑ polifenoles totales y actividad antioxidante 	(Bal, 2019)
 Fresa	100	Inmersión Tiempo: 5 min.	<ul style="list-style-type: none"> ↓ pérdida de peso y retraso de deterioro del fruto ↓ acumulación peróxido de hidrógeno y malondialdeído ↑ contenido de fenoles y melatonina endógena 	(Liu et al., 2018)



1.12.2 Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El GABA, un aminoácido no proteico, fue inicialmente identificado en el tejido del tubérculo de la patata en 1949 (Steward et al., 1949). Posteriormente, se ha descrito una variedad de funciones asociadas al GABA en sistemas de microorganismos, animales y plantas (Ueno, 2000). En sistemas animales, se ha establecido que el GABA es un neurotransmisor inhibitorio esencial en la modulación del sistema nervioso central (Berl y Waelsch, 1958; Ben-Ari, 2002). Además, se ha propuesto que el GABA desempeña un papel importante como compuesto bioactivo con efectos promotores de la salud (Sanders, 1998). En el contexto vegetal, el GABA regula múltiples procesos fisiológicos, incluyendo la homeostasis del pH citosólico, la modulación de los flujos de carbono en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT), el metabolismo del nitrógeno, la protección antioxidante frente al estrés oxidativo, la defensa contra herbívoros y la señalización celular (Shelp et al., 2012). Uno de los aspectos más importantes del GABA en las plantas es su participación en la respuesta al estrés. Ante condiciones adversas, como la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas y el estrés oxidativo, los niveles de GABA aumentan rápidamente dentro de los tejidos vegetales. Este incremento se asocia con la capacidad de la planta para adaptarse a dichas condiciones, promoviendo mecanismos de defensa y permitiendo que los procesos fisiológicos sigan adelante, incluso en situaciones críticas (Kinnersley y Turano, 2000). El papel del GABA en este sentido es clave para la homeostasis celular y la protección contra el daño oxidativo, ayudando a la planta a sobrevivir en entornos hostiles (Ramesh et al., 2015).

Además de su función en la respuesta al estrés, el GABA está profundamente implicado en el metabolismo del carbono y el nitrógeno, dos elementos fundamentales para el crecimiento y la maduración de las plantas. Este compuesto actúa como una molécula de señalización que regula la producción de energía y la asignación de recursos, facilitando un uso eficiente de las reservas energéticas durante las etapas cruciales de la maduración (Fait et al., 2008). Dado que la demanda metabólica aumenta considerablemente en este proceso de estrés, el GABA contribuye a optimizar la conversión de nutrientes y el balance energético, aspectos esenciales para la formación y calidad final de los frutos y otros órganos vegetativos.



Otra función importante del GABA es su influencia en el control del crecimiento celular. A través de la regulación de la elongación celular, el GABA interviene en el tamaño y forma de los tejidos y órganos de la planta (Shelp et al., 1999). Durante la maduración, este proceso es especialmente relevante en frutas, flores y hojas, ya que determina el desarrollo estructural y la preparación de los tejidos para funciones reproductivas o de almacenamiento. Por lo tanto, la capacidad del GABA para controlar el crecimiento celular tiene implicaciones directas en la eficiencia del ciclo de vida de las plantas, favoreciendo el desarrollo óptimo de sus componentes estructurales. El GABA también juega un papel central en los procesos de señalización y desarrollo en las plantas. Actúa como una molécula de señalización en diversos procesos, como la germinación de semillas, el crecimiento de las raíces y la floración (Ramesh et al., 2015). Durante la maduración de los órganos reproductivos, los niveles de GABA fluctúan, modulando la tasa de crecimiento y el momento de la maduración (Bouché y Fromm, 2004). Este control en la temporalidad del desarrollo es crítico, ya que asegura que la planta maximice sus recursos y optimice su rendimiento reproductivo, ajustándose a las condiciones ambientales y fisiológicas internas.

1.11.2.1 Biosíntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA) en las plantas

En las plantas, el GABA se produce principalmente a través de una ruta metabólica especializada conocida como la derivación del GABA. Esta vía metabólica, que es una alternativa al CAT, permite la conversión de glutamato a succinato mediante una serie de reacciones catalizadas por tres enzimas clave. El primer paso de la derivación del GABA implica la descarboxilación del glutamato a GABA, una reacción irreversible catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), que requiere piridoxal fosfato (PLP) como cofactor. Este proceso es fundamental ya que elimina el grupo carboxilo del glutamato, generando GABA y CO_2 como subproducto. A continuación, el GABA es transaminado a semialdehído succínico (SSA) en una reacción catalizada por la enzima GABA transaminasa (GABA-T), que puede utilizar como aceptores de amino tanto el piruvato (en cuyo caso se forma alanina como coproducto) como el α -cetoglutarato (formando glutamato). Es importante destacar que esta conversión es reversible, lo que permite que el GABA actúe como intermediario metabólico en varias condiciones fisiológicas.



Finalmente, el SSA es oxidado irreversiblemente a succinato por la acción de la succínico semialdehído deshidrogenasa (SSADH). Este paso asegura que el succinato ingrese al CAT, contribuyendo a la producción de energía en la célula (Figura 9). Además, esta última reacción cierra la ruta del GABA, permitiendo la integración del carbono derivado del glutamato en el metabolismo central a través del ciclo de Krebs. Este sistema juega un papel crucial no solo en la homeostasis del GABA y del glutamato, sino también en la regulación del estrés oxidativo, la señalización celular y la respuesta a factores ambientales. La naturaleza de las reacciones catalizadas por las enzimas de la derivación del GABA, con pasos tanto irreversibles como reversibles, permite una regulación dinámica y una modulación adaptativa de esta vía en función de las demandas metabólicas de la planta (Bouché y Fromm, 2004). Este mecanismo metabólico también se ha relacionado con la respuesta al estrés abiótico anteriormente mencionado, incluyendo condiciones como el estrés hídrico, la salinidad y la deficiencia de nutrientes, debido a la capacidad del GABA para actuar como una molécula señalizadora en las células vegetales.

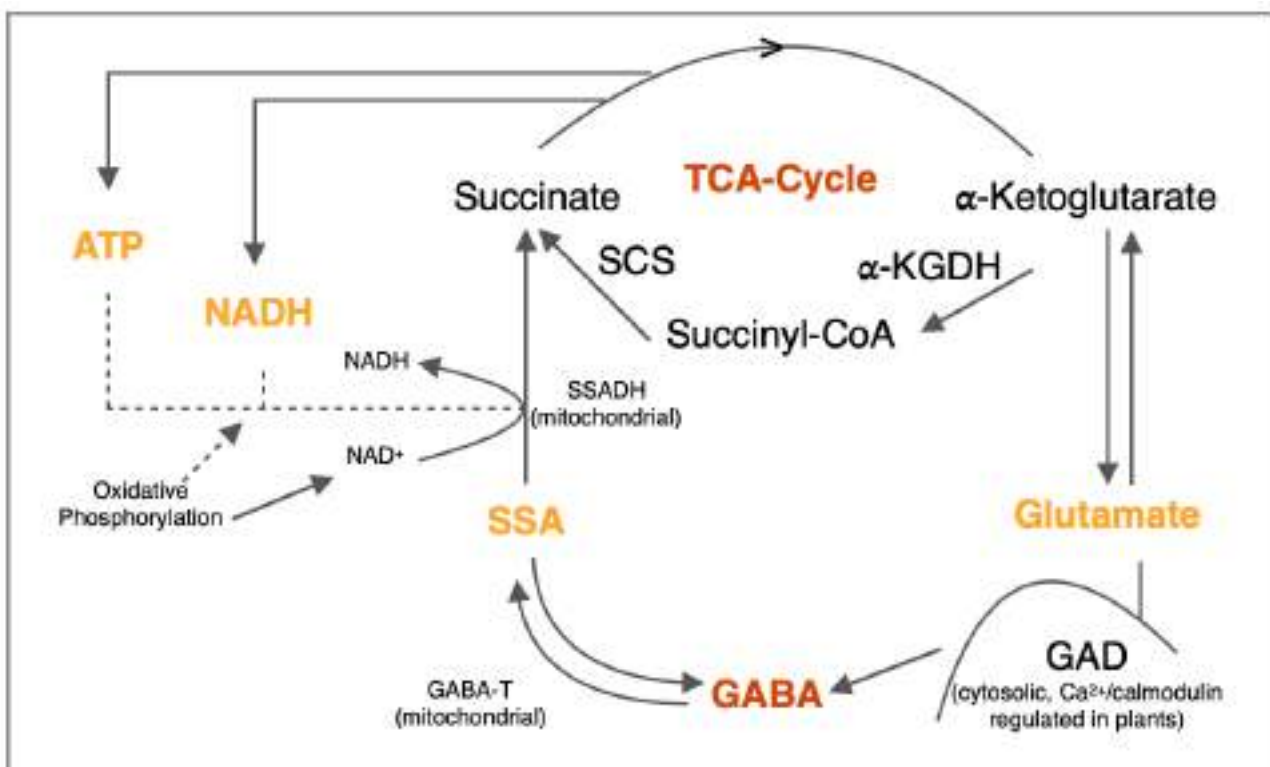


Figura 10: Vía metabólica del ácido γ -aminobutírico (GABA). Fuente: Imagen adaptada de Bouché y Fromm, (2004).



1.11.2.2 Efectos del ácido γ -aminobutírico (GABA) en los frutos

El GABA ha demostrado ser un modulador clave en la mejora de los atributos organolépticos y nutricionales de los frutos, gracias a su capacidad para regular procesos metabólicos relacionados con el almacenamiento de azúcares y la síntesis de compuestos secundarios. Esto impacta directamente en la calidad del fruto, influyendo en características esenciales como el sabor, la textura y el contenido nutricional (Fait et al., 2008). La relevancia de este efecto se refleja en la agricultura y la industria alimentaria, donde la calidad del fruto es un factor determinante para el éxito comercial.

Durante las etapas finales de la maduración, los cambios metabólicos en las células vegetales tienden a alterar el pH, y el GABA desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de este equilibrio, garantizando así un entorno adecuado para las reacciones bioquímicas necesarias (Shelp et al., 1999). Este control del pH es fundamental para preservar la integridad funcional de las células y asegurar una maduración óptima, lo que repercute positivamente en la calidad fisiológica del fruto.

El creciente interés en el GABA dentro del ámbito de la fisiología poscosecha ha permitido entender mejor su papel en la regulación del metabolismo vegetal (Shang et al., 2011; Li et al., 2021b). En concreto, el GABA regula el crecimiento celular mediante la modulación de transportadores aniónicos en las plantas, lo que afecta el balance iónico celular y, en consecuencia, la turgencia y expansión celular (Ramesh et al., 2015). Este proceso es particularmente crítico en frutas como el tomate y el plátano, donde un crecimiento adecuado depende de una correcta regulación de estos transportadores (Bown y Shelp, 1997; Fait et al., 2008). En el caso del tomate, se ha observado que una mayor acumulación de GABA durante la maduración está asociada con un incremento en el tamaño celular y una mejora en los atributos organolépticos, como el sabor y la textura (Forde y Lea, 2007; Li et al., 2021b). De forma similar, en el plátano, el GABA contribuye a la regulación del equilibrio osmótico, promoviendo un desarrollo celular adecuado durante la maduración (Bose et al., 2014). Además, el GABA actúa como una reserva importante de carbono y nitrógeno, siendo fundamental en situaciones de estrés ambiental, como sequía o bajas temperaturas. En estas condiciones, el metabolismo del



GABA se activa como una estrategia adaptativa, lo que permite a la célula vegetal mantener su homeostasis y reducir el daño causado por estos factores adversos (Kinnersley y Turano, 2000; Renault et al., 2010). Esta respuesta adaptativa es crucial en frutas expuestas a variaciones climáticas extremas, ya que contribuye a preservar la integridad tisular y favorece una recuperación más rápida tras el estrés (Shelp et al., 1999; Ramesh et al., 2015; Bouché y Fromm, 2004). En otros frutos como en uvas y cítricos, el GABA estabiliza el pH celular y regula el flujo iónico a través de las membranas, protegiendo las células de daños irreversibles causados por fluctuaciones en el entorno (Renault et al., 2010; Li et al., 2021b). Además, los niveles de GABA tienden a aumentar en respuesta a infecciones fúngicas, lo que sugiere que desempeña un papel crucial en las defensas bióticas de las plantas (Shang et al., 2011). En frutos como las fresas y las manzanas se ha propuesto que el GABA podría estar involucrado en la regulación de compuestos fenólicos, esenciales para las respuestas antioxidantes y la mejora de la calidad nutracéutica (Li et al., 2021b).

Más allá de su impacto durante el desarrollo y la respuesta al estrés, el GABA tiene un papel clave en la calidad poscosecha. Su manejo adecuado durante esta etapa ha demostrado ser una estrategia eficaz para prolongar la vida útil y mejorar las características organolépticas de los frutos. En melocotones, por ejemplo, el tratamiento exógeno con GABA ha reducido significativamente el deterioro, mejorando la firmeza y disminuyendo la pérdida de peso durante el almacenamiento (Shang et al., 2011). En frutas tropicales como el plátano y la piña, el GABA ha demostrado reducir el oscurecimiento de la piel y preservar los compuestos antioxidantes durante el almacenamiento a bajas temperaturas, lo que subraya su potencial como herramienta eficaz para mejorar la calidad y prolongar la vida útil en el mercado global (Bose et al., 2014). Además, su aplicación en el melocotón redujo los daños por frío durante el almacenamiento a bajas temperaturas, preservando la integridad estructural del fruto y extendiendo su vida útil (Shang et al., 2011).

Su capacidad para incrementar la resistencia a condiciones adversas y su impacto positivo en la firmeza y calidad sensorial de los frutos sugieren un gran potencial para futuras investigaciones y aplicaciones comerciales en el manejo poscosecha (Shelp et al.,



1999; Ramesh et al., 2015). Las Tablas 4 y 5 presentan diversos ejemplos del uso del GABA como tratamiento, tanto en precosecha como en la de poscosecha, aplicados en distintas frutas y hortalizas.

Tabla 4: Revisión bibliográfica de los efectos del GABA aplicado como tratamiento precosecha en diferentes especies vegetales. Fuente: elaboración propia.









Tratamientos precosecha con GABA				
Fruto	[μ M]	Aplicación	Efectos	Referencia
 Cereza	50000	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ firmeza, acidez y sólidos solubles totales ↑ concentración de antocianinas ↑ actividad enzimas antioxidantes 	(Carrión-Antolí et al., 2024)
 Arroz	4000	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ tolerancia a la salinidad del suelo 	(Feng et al., 2023)
 Manzana	1000	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ tolerancia a la sequía ↑ firmeza del fruto 	(Cheng et al., 2023)
 Pimiento	2000	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ crecimiento de la planta y peso del fruto ↑ concentración de clorofilas ↑ sólidos solubles totales 	(Iqbal et al., 2023)
 Naranja	10000	Riego	<ul style="list-style-type: none"> ↑ aminoácidos (L-glutamina, L-alanina, etc.) ↑ concentración de GABA endógeno 	(Hijaz et al., 2018)
 Tomate	5000	Riegos	<ul style="list-style-type: none"> ↑ resistencia al estrés salino 	(Wu et al., 2020b)
 Rosa	60000	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ actividad enzimas antioxidantes 	(Ehsanimehr et al., 2024)
 Limón	100000	Pulverización foliar	<ul style="list-style-type: none"> ↑ tamaño de los frutos ↑ rendimiento de la cosecha 	(Badiche et al., 2024)



Tabla 5: Revisión bibliográfica de los efectos del GABA aplicado como tratamiento poscosecha en diferentes especies vegetales. Fuente: elaboración propia.

Tratamientos poscosecha con GABA				
Fruto	[μ M]	Aplicación	Efectos	Referencia
 Melocotón	100	Inmersión Tiempo: 20 min.	↓ daños por frío	(Zhou et al., 2022)
 Mango	200	Inmersión Tiempo: 5 min.	↑ firmeza ↑ ácido ascórbico y polifenoles totales ↑ actividad antioxidante	(Rastegar et al., 2020b)
 Tomate	100	Inmersión Tiempo: 20 min.	↑ resistencia frente a <i>Alternaria alternata</i>	(Yang et al., 2017)
 Nispero	5000	Inmersión Tiempo: 10 min.	↑ flavonoides totales ↑ carotenoides ↓ pérdida de peso	(Zhang et al., 2023)
 Oliva	1000	Inmersión Tiempo: 10 min.	↑ concentración clorofilas ↓ pérdidas de peso ↓ daños por frío	(Fan et al., 2022c)
 Fresa	10000	Inmersión Tiempo: 15 min.	↓ pérdida de peso ↑ antocianinas y flavonoides totales	(Zhang et al., 2024)
 Plátano	2000	Inmersión Tiempo: 15 min.	↓ daños por frío ↑ polifenoles totales ↑ actividad antioxidante	(Wang et al., 2014)
 Kiwi	10000	Inmersión Tiempo: 10 min.	↑ firmeza	(Yan et al., 2024)
 Carambola	2500	Inmersión Tiempo: 5 min.	↓ daños por frío ↑ actividad enzimática	(Mekontso et al., 2021)
 Pistacho	10000	Pulverización Tiempo: 3 min.	↓ pérdida de peso ↓ actividad polifenoloxidasa	(Saeedi et al., 2022)



2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

En relación con los problemas de calidad que presenta la granada, y basándose en las estrategias y estudios previos mencionados, se considera fundamental llevar a cabo un estudio sobre los tratamientos pre y poscosecha con elicitores y otras estrategias de conservación en la variedad de granada cv. “Mollar de Elche”. De esta forma se podrían ofrecer soluciones a un problema real que afecta la comercialización de este fruto.

Además, al aumentar la tolerancia al daño por frío y activar los sistemas de defensa antioxidante mediante la aplicación de estos compuestos, será posible reducir las pérdidas de calidad causadas durante el almacenamiento y comercialización poscosecha. Asimismo, se pretende conservar o mejorar las propiedades antioxidantes de los frutos, lo que representará un beneficio adicional para la salud de los consumidores.

Por lo tanto, el **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral es mejorar el color y reducir la presencia de daños por frío en la granada cv. “Mollar de Elche” mediante la aplicación de tratamientos precosecha con melatonina y ácido γ -aminobutírico (GABA). Asimismo, se evaluarán otras estrategias de conservación en poscosecha, como la aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP), jasmonato de metilo (JaMe) y el uso de películas plásticas convencionales y biodegradables, para determinar su efecto en la calidad del fruto. A su vez, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

- I. *Evaluar la influencia de los elicitores en el fruto de granada cv. "Mollar de Elche":* Analizar su efectividad en el rendimiento del cultivo, en la optimización de la coloración y la mitigación de los daños por frío, así como su incidencia en otros parámetros de calidad del fruto.
- II. *Determinar el efecto de estrategias poscosecha basadas en 1-MCP y JaMe:* Estudiar cómo el 1-metilciclopropeno (1-MCP) y el jasmonato de metilo (JaMe) impactan en la calidad física, química y sensorial de la granada durante el almacenamiento.
- III. *Examinar la efectividad de las películas plásticas en la conservación poscosecha:* Evaluar su capacidad para reducir las pérdidas poscosecha, minimizar los daños por frío y mantener la calidad comercial de la granada.



3. MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta parte se detallan las propiedades fundamentales del material vegetal empleado, las condiciones bajo las cuales se realizaron los experimentos, los tratamientos aplicados antes y después de la cosecha, los análisis efectuados y el modelo estadístico utilizado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

3.1 *Material vegetal y diseño experimental*

Los estudios que conforman esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo a lo largo de distintas campañas agrícolas (2019, 2020, 2021 y 2022) utilizando seis cultivares de granada Wonderful, Kingdom, Bigful, Acco, Purple Queen y Mollar de Elche. (Figura 11). Los granados se encontraban localizados en una plantación comercial en Albaterra, al sur de la provincia de Alicante, España, con una separación de 6 x 5 metros. En el cultivo de granada se siguieron prácticas agrícolas convencionales en cuanto a la fertilización, aplicando 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno, 80 kg ha⁻¹ de fósforo y 160 kg ha⁻¹ de potasio (relación N/P/K). El riego se realizó mediante un sistema de goteo con ocho emisores por árbol, cada uno suministrando 4 L/h de agua. El programa de riego se distribuyó de la siguiente manera: dos ciclos de 1 hora por semana en abril, dos ciclos de 2 horas por semana de mayo a septiembre, y un ciclo de 1 hora por semana en octubre. Las condiciones climáticas en el campo de cultivo (UTMX: 694,006.000 UTMY: 4,234,860.000) fueron: un clima mediterráneo semiárido, con temperaturas medias anuales de 18,90, 19,52, 20,01 y 20,06 °C para 2019, 2020, 2021 y 2022 respectivamente; temperaturas máximas en verano, de junio a septiembre, de 30,35, 32,23, 32,89 y 34,40 °C para 2019, 2020, 2021 y 2022 respectivamente; y una precipitación acumulada de 285,43, 233,37, 226,08 y 188,90 mm para 2019, 2020, 2021 y 2022, respectivamente. Durante los experimentos, se llevaron a cabo labores de poda, aclareo, fertilización y riego, siguiendo las prácticas agrícolas convencionales para cada cultivo.

El diseño experimental se estructuró en bloques completamente al azar, ajustando el número de réplicas y árboles según el tratamiento y el año. La recolección de los frutos se efectuó con base en criterios comerciales, tales como el tamaño, el color y el peso.



Los tratamientos empleados en los experimentos de esta tesis doctoral fueron preparados siguiendo un determinado protocolo y bajo unas mismas condiciones. La melatonina y el ácido γ -aminobutírico (GABA) fueron adquiridos de Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, España), y el jasmonato de metilo (JaMe) y el 1-Metilciclopropeno (1-MCP) se adquirieron de Agro-Fresh (Inc., Filadelfia, PA, USA).

Los tratamientos precolección se realizaron en horas tempranas de la mañana y bajo condiciones meteorológicas favorables, asegurando la ausencia de previsión de lluvias o vientos para las siguientes 24 horas, mediante la pulverización foliar. Se realizaron cinco aplicaciones a lo largo del ciclo de desarrollo del fruto (30, 60, 90, 105 y 120 días después de la floración: T1, T2, T3, T4 y T5), siendo el último tratamiento aplicado 3 días antes de la cosecha.

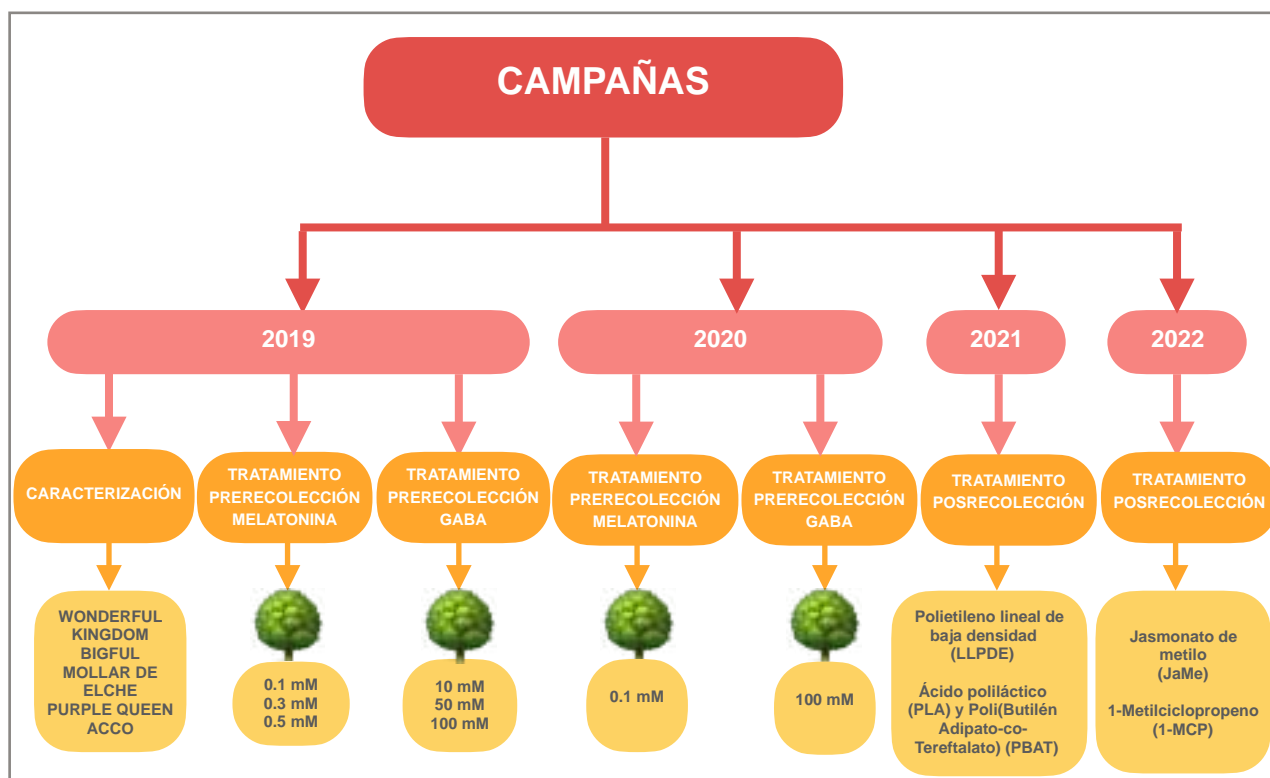


Figura 11: Estudios que conforman la presente Tesis Doctoral durante diferentes campañas agrícolas.



3.1.1 Tratamientos y concentraciones empleados en prerecolección

- Control: los árboles fueron pulverizados con una solución de Tween 20 al 0,1 %.
- Melatonina: Los tratamientos se realizaron durante la campaña de 2019 y 2020 a concentraciones de 0,1, 0,3 y 0,5 mM. Estas concentraciones fueron elegidas de acuerdo con informes previos en los que se evaluó el efecto de la melatonina, aplicada como tratamiento de precosecha, en las propiedades de calidad de otras especies frutales (Liu et al., 2016; Tijero et al., 2019; Abd El-Naby et al., 2019). Para cada una de las concentraciones se seleccionaron un total de 9 árboles organizados en 3 bloques de 3 árboles. Se aplicaron tres litros de la solución por cada árbol (que contenían 0,1 % de Tween 20) mediante pulverización foliar.
- Acido γ -aminobutírico (GABA): Los tratamientos se realizaron durante la campaña de 2019 a concentraciones 10, 50 y 100 mM, siguiendo estudios previos. Basándose en el experimento llevado a cabo en la temporada 2019 en el fruto de granada, se volvió a repetir el experimento en la temporada 2020 con la concentración de 100 mM, ya que obtuvo los mejores resultados en términos de rendimiento y características de calidad del fruto. Al igual que con el tratamiento de melatonina, para cada una de las concentraciones se seleccionaron un total de 9 árboles organizados en 3 bloques de 3 árboles y se aplicaron tres litros de la solución por cada árbol (que contenían 0,1 % de Tween 20) mediante pulverización foliar.

3.1.2 Tratamientos y concentraciones empleados en posrecolección

- Jasmonato de metilo (JaMe): el tratamiento se realizó en la campaña 2022 con la concentración de 0,01 mM en fase de vapor. Se seleccionó esta concentración en base a otros estudios preliminares, donde se consiguió mejorar los parámetros de calidad del fruto (García-Pastor et al., 2020a). La aplicación del JaMe se llevó a cabo aplicando la concentración descrita sobre un papel de filtro colocado en el interior de un recipiente de 130 litros con los frutos y cerrado de forma hermética durante 24 horas a 20 °C.



- 1-Metilciclopropeno (1-MCP): el tratamiento se realizó en la campaña 2022 con la concentración de 1000 nL L⁻¹. Esta concentración se seleccionó en base a otros estudios donde se consiguió mejorar los parámetros de calidad de otros frutos (Li et al., 2016). La aplicación del tratamiento con 1-MCP se llevó a cabo combinando tabletas disponibles comercialmente con una solución activadora colocadas en el interior de un recipiente hermético de 130 litros con las granadas durante 24 horas a 20 °C.
- Envasado de los frutos; LLPDE, PLA-PBAT: el tratamiento se realizó en la campaña 2021. Las películas plásticas empleadas fueron: polietileno lineal de baja densidad (LLPDE), ácido poliláctico (PLA) y Poli(Butilén Adipato-co-Tereftalato) (PBAT). La técnica de envasado consistió en envolver cada fruto con una lámina plástica de 25 x 25 cm, ajustándola sobre la piel de la granada, empezando por la zona del cáliz y cerrando en el área del pedúnculo mediante un giro en el plástico. Se utilizó cinta adhesiva en el punto de cierre para asegurar que no se abriera. El plástico quedaba en contacto directo con la superficie del fruto, actuando como una "segunda piel". Los frutos envasados se colocaron en cajas alimentarias con el cáliz orientado hacia arriba. Las características de los plásticos empleados son las siguientes (Tabla 6).

Tabla 6: Composición, tasa de transmisión de CO₂, O₂ y vapor de agua de las películas plásticas empleadas para el envasado de los frutos.

	Polietileno lineal de baja densidad (LLPDE)	Ácido poliláctico (PLA) y Poli(Butilén Adipato-co-Tereftalato) (PBAT)
Composición	100 %	5 % PLA - 95 % PBAT
Tasa de transmisión de CO ₂ (cm ³ m ⁻² d ⁻¹ Pa ⁻¹) (23 °C, 0 % H.R.)	5,2 x 10 ⁻¹	6,0 x 10 ⁻¹
Tasa de transmisión de O ₂ (cm ³ m ⁻² d ⁻¹ Pa ⁻¹) (23 °C, 0 % H.R.)	8,0 x 10 ⁻²	5,5 x 10 ⁻²
Tasa de transmisión de vapor de agua (g m ⁻² d ⁻¹ Pa ⁻¹) (38 °C, 90 % H.R.)	4,0 x 10 ⁻⁴	3,0 x 10 ⁻²



3.1.3 Almacenamiento y conservación de los frutos

Independientemente del tratamiento al que fueron sometidos, todos los frutos se almacenaron en poscosecha en una cámara frigorífica configurada a una temperatura de 2 o 10 °C y una humedad relativa del 85 %. Para garantizar la seguridad y la estabilidad de las muestras, se utilizaron cajas de plástico específicamente diseñadas para el almacenamiento de alimentos.

En cada caja se colocaron 15 o 30 frutos, según el experimento, organizados en tres réplicas. Cada repetición constaba de cinco frutos, cuidadosamente separados entre sí por una capa de papel de filtro de laboratorio, lo que evitó el contacto directo entre repeticiones y minimizó posibles interacciones entre los frutos de cada réplica.

Para asegurar la homogeneidad de las condiciones de almacenamiento, las cajas se colocaron estratégicamente dentro de la cámara frigorífica, evitando ubicarlas en áreas de exposición directa al flujo de aire del ventilador. Esta disposición buscó prevenir la influencia de corrientes de aire frío sobre los frutos, que podrían causar deshidratación o variaciones en las condiciones de temperatura y humedad de estos, garantizando así la uniformidad del entorno de almacenamiento para todos los tratamientos.

3.2 Rendimiento del cultivo: kg por árbol y número de frutos por árbol

Debido a que los frutos en un mismo árbol no maduran de manera uniforme, es decir, algunos frutos alcanzan su punto óptimo de maduración antes que otros, en algunas campañas se realizaron dos cosechas en lugar de una sola. Estas cosechas se llevaron a cabo con un intervalo de 15 o 20 días con el objetivo de maximizar la calidad y cantidad de frutos recolectados. En cada una de estas fechas de recolección, se registraron dos variables clave: el peso total de los frutos recogidos por árbol (en kilogramos) y el número de frutos cosechados por árbol.

3.3 Pérdida de peso

El peso de los frutos fue registrado tanto en el momento de la cosecha como tras cada período de almacenamiento. La pérdida de peso se calculó y se expresó en forma de



porcentaje (%) en relación con el peso inicial de los frutos empleando la siguiente fórmula: Pérdida de peso (%) = $((\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial}) \times 100$.

3.4 Tasa de respiración y concentración de CO₂ y O₂ en el interior de los frutos

Para medir la tasa de respiración de los frutos, cada lote fue herméticamente sellado durante 60 minutos en un recipiente de 4,5 litros. Se extrajo una muestra de 1 mL de la atmósfera interna del recipiente y se inyectó en un cromatógrafo de gases Shimadzu TM 14A (Kyoto, Japón), equipado con un detector de conductividad térmica, siguiendo el procedimiento descrito por Sayyari et al. (2011). Los resultados fueron expresados en mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹. Para las granadas envasadas en las películas plásticas, la muestra se obtuvo insertando la jeringa en el espacio existente en el cáliz del fruto, extrayendo la atmósfera interna y posteriormente, se inyectó en el mismo cromatógrafo previamente mencionado. Los resultados de la concentración de CO₂ y O₂ fueron expresados en kPa.

3.5 Color de la corteza externa, interna y de los arilos

El color externo de los frutos de granada se evaluó midiendo en seis puntos distribuidos uniformemente alrededor del perímetro ecuatorial de cada fruto. Para estas mediciones, se utilizó el sistema de color CIE Lab con un colorímetro (CRC200, Minolta Camera Co., Tokio, Japón), que permite obtener valores precisos de los parámetros de color. Para determinar el color interno de la corteza, se siguió un procedimiento similar al de la corteza externa, pero tras dividir cada granada en dos mitades y retirar cuidadosamente los arilos. El color de los arilos también se midió después de cortar la granada en dos mitades, asegurando así una evaluación uniforme y precisa. Los valores obtenidos para cada medición se expresaron en términos de los parámetros CIE L^* , a^* y b^* , que describen la luminosidad y los componentes de color en el espacio CIE Lab. Además, se calculó el ángulo hue^* , mediante la fórmula $\arctg(b^*/a^*)$, para ofrecer una representación adicional del color en términos de tonalidad.



3.6 Firmeza

La firmeza del fruto se evaluó en cada fruto, midiendo la fuerza requerida para alcanzar una deformación del 5 %, empleando un Analizador de Textura TX-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, Reino Unido). Los resultados se expresaron como la relación entre la fuerza aplicada para lograr el porcentaje de deformación y la distancia recorrida por el dispositivo, proporcionando una medida precisa de la resistencia del fruto ante la compresión.

3.7 Índice de daños por frío

El índice de daños por frío se evaluó de forma individual en cada fruto, tanto en la corteza externa como la corteza interna, basada en el porcentaje de la superficie de la corteza afectada por síntomas de deshidratación, pardeamiento y/o picado, siguiendo el método descrito por García-Pastor et al. (2020a) (Figura 12). Para ello, se utilizó una escala hedónica de 5 puntos: 1 (sin síntomas), 2 (1-10 %), 3 (11-30 %), 4 (31-50 %) y 5 (> 50 %). El índice de daños por frío se calculó con la siguiente fórmula: $(\sum (\text{valor de la escala hedónica}) \times (\text{número de frutos con la puntuación correspondiente})) / \text{número total de frutos de la muestra}$.

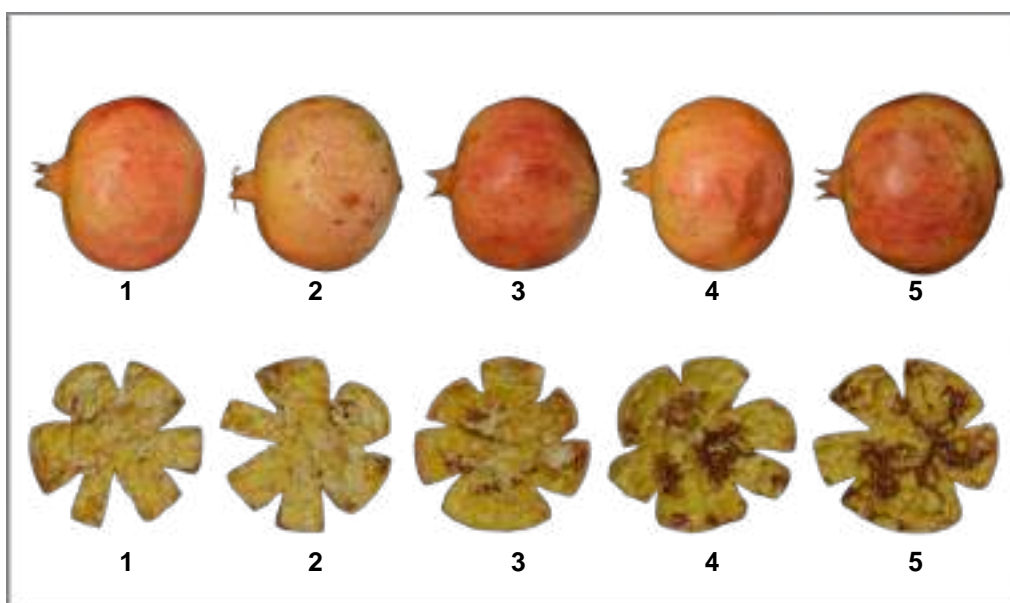


Figura 12: Escala hedónica de 5 puntos, donde 1 (sin síntomas), 2 (1-10 %), 3 (11-30 %), 4 (31-50 %) y 5 (> 50 %). Fuente: Imagen adapta de García-Pastor et al. (2020a).



3.8 Toma de muestras para las siguientes determinaciones analíticas

Para las determinaciones que requerían muestras de la corteza interna, corteza externa o arilos, se tomaron muestras de los cinco frutos de cada repetición, garantizando con ello que las mediciones representaran de manera precisa la variabilidad natural entre los frutos dentro de cada grupo experimental. De esta forma se obtiene una media más representativa, reduciendo la influencia de posibles variaciones individuales y proporcionando una evaluación más fiable de las características de cada tratamiento o condición experimental.

3.9 Fuga de electrolitos

La permeabilidad de la membrana en la corteza de la granada se determinó utilizando el método descrito por Yuan et al. (2023) para evaluar la fuga de electrolitos. Se extrajeron un total de 45 discos (15 discos por réplica), con un diámetro de 0,5 o 1 centímetros (según el experimento) de la corteza de las granadas de cada tratamiento. Los discos fueron sometidos a tres enjuagues consecutivos de 3 minutos con agua desionizada para eliminar los electrolitos liberados tras el corte de los discos. Posteriormente, se sumergieron en 50 mL de agua desionizada a temperatura ambiente, manteniéndolos bajo agitación constante durante 4 horas. Tras este período, se midió la conductividad eléctrica inicial (C1) de las soluciones a 20 °C utilizando un conductímetro calibrado. Las muestras se congelaron durante 24 horas y posteriormente fueron sometidas a un tratamiento térmico a 121 °C durante 15 minutos en una autoclave, para inducir la liberación completa de los electrolitos retenidos. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente (20 °C), se evaluó la conductividad eléctrica final (C2). La fuga de electrolitos se calculó mediante la siguiente fórmula: $(C1/C2) \times 100$.

3.10 Contenido de malondialdehído (MDA)

El contenido de malondialdehído (MDA) en el tejido de la corteza de la granada se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Zhang et al. (2019b). Para ello, se procesó una muestra de 2,5 g mediante trituración en un mortero, añadiendo 10 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. A continuación, el extracto fue centrifugado a 4 °C



y 10,000 g durante 20 minutos, y se obtuvieron los sobrenadantes. Se tomaron 2 mL de estos sobrenadantes y se le añadió 6 mL de ácido tiobarbitúrico (ATB) al 0,67 %, utilizando un vortex para asegurar una homogenización adecuada en un tubo de ensayo. Posteriormente, los tubos fueron sometidos a un tratamiento térmico en un baño de agua a 95 °C durante 20 minutos. Tras este período, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midieron las absorbancias a 450, 532 y 600 nm utilizando un espectrofotómetro (1900 UV/Vis, Shimadzu, Kyoto, Japón). Cada análisis se realizó por duplicado, y el contenido de MDA se expresó en $\mu\text{mol kg}^{-1}$, siguiendo los cálculos propuestos por Zhang et al. (2019b).

3.11 Sólidos solubles totales, acidez titulable e índice de madurez

Aproximadamente 50 gramos de arilos fueron exprimidos con una tela de algodón, y el jugo se utilizó para cuantificar los sólidos solubles totales y la acidez titulable por duplicado. Los sólidos solubles totales se determinaron utilizando un refractómetro digital Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokio, Japón) a 20 °C. Un mililitro del zumo se diluyó en 25 mL de agua destilada y se utilizó para medir la acidez titulable mediante titulación automática (785 DMP Titrimo, Metrohm) con 0,1 N de NaOH hasta alcanzar un pH de 8,1. El índice de madurez se determinó mediante la siguiente fórmula: sólidos solubles totales/ acidez titulable.

3.12 Contenido de ácidos orgánicos y azúcares

Se realizó la cuantificación de los ácidos orgánicos y azúcares por duplicado en cada réplica ($n=3$) empleando un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) perteneciente a la serie Hewlett-Packard 1100, siguiendo el protocolo descrito por García-Pastor et al. (2020b). El sistema de elución utilizó un flujo isocrático con ácido fosfórico al 0,1 % a una velocidad constante de 0,5 mL/min. Los compuestos fueron separados mediante una columna Supelco (Supelcogel C-610H, 30 cm x 7,8 mm, Supelco Park, Bellefonte, PA, USA). La detección de los ácidos orgánicos se realizó mediante absorbancia a 210 nm, mientras que los azúcares fueron detectados utilizando un refractómetro. La cuantificación se llevó a cabo a partir de curvas estándar elaboradas



con ácidos orgánicos y azúcares puros, y los resultados se expresaron como g/L de zumo.

3.13 Composición mineral

La composición mineral se midió por duplicado en 0,25 g de corteza deshidratada obtenida de una mezcla de 10 frutos de cada réplica. Cada muestra fue digerida utilizando un digestor por microondas (CEM Mars One) con HNO₃ al 1 %. Después de la digestión de las muestras, se ajustaron a un volumen de 50 mL con agua destilada y se tomaron alícuotas para determinar los macro y microelementos mediante espectrometría de masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) (Shimadzu ICPMS-2030). La cuantificación de minerales se realizó utilizando curvas estándar para Ca, Cu, Fe, K, Mn, Na y Zn. Los resultados se expresaron en g kg⁻¹ en base a peso seco.

3.14 Cuantificación de polifenoles y antocianinas totales

La extracción de los polifenoles totales se llevó a cabo homogeneizando 10 g de arilos o de corteza de granada con 30 mL de una solución extractora compuesta por 80 % de agua destilada y 20 % de metanol, junto con 2 mM NaF (para inhibir la actividad de la polifenoloxidasas y evitar la degradación de los polifenoles). Este proceso se realizó durante 30 segundos, utilizando un homogeneizador Ultraturrax (modelo T18-basic, IKA, Berlín, Alemania). Posteriormente, los extractos fueron sometidos a centrifugación a 10,000 g durante 10 minutos a 4 °C. El contenido total de polifenoles en el sobrenadante se midió por duplicado siguiendo el método descrito por García-Pastor et al. (2020b). Para ello, se añadieron 50 µL del extracto a 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, previamente diluido en agua destilada (1:10). La mezcla se mantuvo a 20 °C durante 2 minutos, tras lo cual se añadieron 2 mL de Na₂CO₃, agitando vigorosamente con un vortex. La muestra se incubó en un baño de agua a 50 °C durante 20 minutos. Finalmente, se registró la absorbancia a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (modelo UV-1900i, Shimadzu, Duisburg, Alemania). La concentración total de polifenoles se calculó empleando una curva de calibración obtenida previamente con ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso fresco.



Para la extracción de antocianinas totales, se homogeneizaron 10 g de arilos de granada con 30 mL de una solución compuesta por 19 % de agua destilada, 80 % de metanol y 1 % de ácido fórmico. Los extractos obtenidos se sometieron a centrifugación a 10,000 g durante 10 minutos a 4 °C. La concentración total de antocianinas se determinó por duplicado en el sobrenadante, registrando la absorbancia a 520 nm mediante un espectrofotómetro UV-Vis (modelo UV-1900i, Shimadzu, Duisburg, Alemania). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de cianidina 3-glucósido por 100 g de peso fresco, calculados según la fórmula: $(Ab \times D \times V \times 100 \times 449,2)/(W \times 23,900)$. Donde, Ab es la absorbancia, D el factor de dilución, V el volumen del extracto, 449,2 corresponde al peso molecular de la cianidina 3-glucósido, W es el peso de la muestra, y 23,900 es el coeficiente de absorción molar ($L\ cm^{-1}\ mol^{-1}$) de dicha antocianina.

3.15 Determinación y cuantificación de antocianinas individuales

Los extractos obtenidos en la extracción de las antocianinas totales se utilizaron también para la cuantificación de antocianinas individuales, tras filtrarse a través de un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 μm (Millex HV13, Millipore, Bedford Industries, Burlington, MA, USA). Posteriormente, se inyectaron 20 μL de los extractos filtrados en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agilent, Santa Clara, CA, USA, serie 1200-Infinity), equipado con un cartucho de protección C18 (4,0 \times 3,0 mm) de Phenomenex (Macclesfield, Reino Unido) y una columna Luna C18 (25 cm de longitud, 0,46 cm de diámetro interno, y tamaño de partícula de 5 μm , también de Phenomenex). Se emplearon dos fases móviles: fase A compuesta por una mezcla de agua y ácido fórmico (95:5 % v/v) y fase B, compuesta por acetonitrilo, con un flujo de 1 mL min^{-1} bajo las condiciones de gradiente previamente descritas por García-Pastor et al. (2020b).

Los cromatogramas se registraron a una longitud de onda de 520 nm, y la cuantificación de las antocianinas se realizó mediante curvas de calibración generadas con estándares de pelargonidina 3-O-glucósido, cianidina 3,5-O-di-glucósido y cianidina 3-O-glucósido, adquiridos en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). La cuantificación de delfinidina 3-O-glucósido se realizó utilizando equivalentes de cianidina 3-O-glucósido. Los resultados fueron expresados como mg por 100 g en peso fresco.



3.16 Cuantificación de la actividad total antioxidante

La actividad total antioxidante hidrofílica (AAT-H) se cuantificó siguiendo el método descrito por Serrano et al. (2005). Para ello, se homogeneizaron 5 g de arilos de cada muestra en 10 mL de tampón fosfato de 50 mM (pH = 7,8) y se centrifugaron a 15,000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se empleó para la determinación de la actividad antioxidante hidrofílica mediante un sistema enzimático compuesto por 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), la enzima peroxidasa y peróxido de hidrógeno como sustrato oxidante, generando radicales ABTS⁺, que se midieron a 730 nm. La disminución en la absorbancia, medida tras 60 segundos de añadir el extracto de granada, se utilizó para cuantificar la actividad antioxidante mediante comparación con una curva de calibración elaborada con trolox ((R)-(+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) (0-20 nmol) de Sigma (Madrid, España). Los resultados se expresaron como mg kg⁻¹ de equivalentes de trolox.

3.17 Análisis estadístico

Las variables dependientes cuantificadas en los diferentes experimentos fueron analizadas mediante Análisis de Varianza (ANOVA), utilizando el software SPSS en sus versiones 11.0, 20 y 28 para Windows (IBM, Chicago, IL, USA; Armonk, NY, USA). Cuando se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), las medias se compararon mediante la prueba de Tukey. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar (SE). En algunos experimentos, se empleó la prueba t de Student para detectar diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados, así como entre las primeras y segundas cosechas. Adicionalmente, se calcularon coeficientes de correlación de Pearson para evaluar la relación entre variables dependientes, como los índices de daños por frío interno y externo, y otros parámetros tanto en la cosecha como tras el almacenamiento. Estas correlaciones se sometieron a una prueba de significancia bilateral para su verificación. Asimismo, en ciertos estudios se realizaron regresiones no lineales entre el índice de daños por frío y los ácidos orgánicos.



▶ 4. PUBLICACIONES



4.1 Publicación I

Relationship among Sugars, Organic Acids, Mineral Composition, and Chilling Injury Sensitivity on Six Pomegranate Cultivars Stored at 2°C

José Manuel Lorente-Mento, Alberto Carrión-Antolí,
Fabián Guillén, María Serrano, Daniel Valero y Domingo
Martínez-Romero.

Foods, 12(7), 1364 (2023)

<https://doi.org/10.3390/foods12071364>





Article

Relationship among Sugars, Organic Acids, Mineral Composition, and Chilling Injury Sensitivity on Six Pomegranate Cultivars Stored at 2 °C

José Manuel Lorente-Mento ¹, Alberto Carrión-Antolí ² , Fabián Guillén ² , María Serrano ¹ , Daniel Valero ²  and Domingo Martínez-Romero ^{2,*} 

¹ Department of Applied Biology, EPSO, CIAGRO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

² Department of Food Technology, EPSO, CIAGRO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

* Correspondence: dmromero@umh.es

Abstract: Pomegranate is a sensitive fruit to chilling injury (CI) during storage at temperatures below 7 °C. However, sensitivity of pomegranate to CI is dependent on cultivar and exposure times to low temperatures. In this work, the sensitivity to CI of six pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) ‘Wonderful’, ‘Kingdom’, ‘Bigful’, ‘Acco’, ‘Purple Queen’, and ‘Mollar de Elche’, was evaluated after 30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C. Among cultivars, there was a great variability in the sensitivity to the appearance of CI symptoms. ‘Kingdom’ cultivar was the most CI sensitive and ‘Mollar de Elche’ cultivar was the least sensitive cultivar. CI symptoms were greater in the internal part of the skin than in the external part, although no correlation was found between ion leakage (IL) and CI severity after cold storage. However, both, external and internal CI index were correlated with the IL at harvest, with Pearson correlation of 0.63 and 0.80, respectively. In addition, this variability to CI among cultivars could also be due to composition and tissue structures in arils and peel. The solute content of the arils (anthocyanins, sugars, and organic acids, in particular citric acid), showed high correlations with CI sensitivity, with Pearson correlations (r) of 0.56 for total soluble solids, 0.87 for total acidity, 0.94 for anthocyanins, –0.94 for oxalic acid, 0.87 for citric acid, 0.62 for tartaric acid, –0.91 for malic acid, 0.8 for sucrose, and 0.71 for glucose, which can leak to the inner surface of the peel causing browning reactions. In addition, the high peel Ca/K ratio could play an important role on increasing fruit tolerance to CI, since it was negatively correlated with the internal and external CI indexes.

Keywords: postharvest; *Punica granatum*; chilling injury; cold storage; sensitive varieties; anthocyanins; physiological disorder



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

Academic Editor: Yun Wang

Received: 1 March 2023

Revised: 17 March 2023

Accepted: 20 March 2023

Published: 23 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is cultivated in different countries with warm and temperate climates. India, China, Iran, Turkey, Afghanistan, USA, Iraq, Pakistan, Syria, and Spain are the main pomegranate producers [1]. In the last years, the area of pomegranate cultivation has continuously increased, mainly due to increased interest of consumers for the beneficial health properties that pomegranate provides due to its bioactive compounds, with antioxidant properties (anthocyanins, fiber, etc.), as well as nutrients and minerals [2]. The Mediterranean weather is the most suitable for obtaining pomegranate fruits of adequate quality [3]. ‘Mollar de Elche’ and ‘Wonderful’ are two of the most widely cultivated pomegranate cultivars around the world. They have significantly different agronomic requirements and physico-chemical characteristics. ‘Wonderful’, for instance, is known for its intense red color in peel and arils and it is particularly popular among pomegranate consumers. On the other hand, ‘Mollar de Elche’ has high quality



desirable traits, including soft seeds and sweet aril taste, although the skin and aril colors are pale red [4].

However, pomegranate fruit is very sensitive to chilling injury (CI) during postharvest storage, and thus CI limits cold storage and commercialization. Usually, these damages appear after storage at temperatures below 5–7 °C [5]. There is a great varietal difference to CI, the threshold storage temperature for the appearance of CI symptoms being 5 °C for less sensitive cultivars and 7 °C for the most sensitive ones. For example, the ‘Ganesh’ cultivar is more sensitive to CI than ‘Wonderful’ and the threshold storage temperature is lower in the latter [6]. Accordingly, it is known that the appearance of CI in ‘Wonderful’ occurred at higher temperature (<7 °C) than in ‘Mollar de Elche’ cultivar (<5 °C), the latter being more resistant to suffer from CI [2]. This difference in sensitivity limits the storage temperature of some cultivars, reduces their post-harvest shelf life, and prevents quarantine treatments at low temperatures (~1 °C) to avoid the appearance of the fruit fly (*Ceratitis capitata*) and thus to be able to market them to countries free of this insect [7]. The occurrence of CI in the pomegranate fruit can differ from the internal to the external surface of fruit peel, always being greater on the internal surface [8]. Therefore, the consumer can accept fruit with a good external visual appearance, but with a large amount of internal damage.

Some factors linked to the sensitivity to CI are the harvest date, with the earliest cultivars being more sensitive than the late ones, as well as the maturity stage of the fruit at harvest [7]. Different postharvest strategies have been developed to reduce CI, such as the application of shock treatments with high temperatures [9] and adaptation to cold storage through treatments with low-temperature conditioning [7], as well as the use of edible coatings with carboxymethyl cellulose or carnauba wax [10], modified atmosphere packaging [11], or treatments using elicitors such as salicylic, oxalic, jasmonic acid and its derivatives [2,12], as well as methyl jasmonate [13], among others.

Endogenous aspects are linked to chilling injury, such as transcriptomic changes [6] and different gene expressions. Nian et al. [14] found that cold shocks to papayas before storage reduced the occurrence of CI due to an increase in antioxidant activity and related gene expression. CI tolerance is favored by metabolic pathways related to carbohydrates, phenols, and phenylpropanoids and there is a genotype-dependent adaptation to CI [15]. However, these works did not provide information about the metabolites involved in the CI damage symptoms. In this sense, in other plant species, the relationship has been reported between the content in particular metabolites and the sensitivity to CI, as in the case of carotenoids in mandarins [16], fatty acid composition in pineapple [17], or sugars and organic acids in cherry tomato [18]. The fatty acid fraction of the pomegranate peel stored at chilling temperatures has been the most analyzed factor [8,9]. These authors indicated that in fruit suffering from CI the ratio of polyunsaturated/saturated fatty acids (PUFA/SFA) decreased during storage. Furthermore, the low CI susceptibility of pomegranates was determined by the relationship between phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and (polyphenol oxidase) PPO activity [19]. However, there is no work evaluating the sensitivity to chilling injury of different pomegranate varieties in terms of their metabolites after storage at low temperatures.

The objective of this work was to assess the relationship between the content and the profile of sugars, organic acids, total anthocyanins, and minerals on the appearance of CI in six pomegranate cultivars after being stored at 2 °C for 30 d plus 2 d at 20 °C. This storage temperature was chosen to ensure that all pomegranate cultivars were under chilling conditions and could show different CI damage degree after one month of storage depending on their sensitivity. In addition, an in vitro test of skin sensitivity to internal CI was performed by using citric acid solution and pomegranate juice.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design

To carry out this work, fruit from six cultivars of pomegranate (*Punica granatum* L.) were used, which were grown in the same commercial farm located at Albaterra (Ali-



cante, Spain). Fruits without visual defects were harvested in 2019 ('Purple Queen'—4th September; 'Acco' and 'Bigful'—September 10th; 'Wonderful', 'Kingdom' and 'Mollar de Elche'—11th October) at the proper ripening stage for each cultivar, according to the following commercial criteria: sizes from 60 to 130 mm in diameter, fully cream-colored husk for 'Mollar de Elche' cultivar, and fully red coloured husk for the remaining cultivars (Table 1). Pomegranate trees were grown under similar standard agronomic practices and weather conditions. Pomegranate fruit were transported to the laboratory where fruits free of damage and physiological disorders were selected. For each cultivar, two batches of 3 replicates of 10 fruit were made. The first batch was used to measure fruit properties at harvest and the second one was stored for 30 d at 2 °C and 90% RH plus 2 d at 20 °C. In each fruit, the following parameters were measured: weight loss, external peel color, firmness of the whole fruit, CI on the external and internal peel, ion leakage (IL) and minerals in the skin at the end of the experiment. In addition, the total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), total anthocyanins, and individual organic acids and sugars were measured in pomegranate arils.

Table 1. Characteristic of pomegranate cultivars at harvest.

	Wonderful	Kingdom	Bigful	Acco	Purple Queen	Mollar	
Diameter (mm)	105.80 ± 10.67	99.40 ± 9.10	90.11 ± 1.11	81.16 ± 1.78	79.19 ± 1.08	112.79 ± 3.02	
Weight (g)	423.50 ± 14.53	433.71 ± 14.35	333.26 ± 6.49	311.57 ± 6.20	255.05 ± 3.99	435.07 ± 13.11	
Color	L	51.94 ± 2.33	52.36 ± 1.75	54.38 ± 0.94	52.88 ± 0.77	52.49 ± 0.78	70.17 ± 1.93
	a	40.55 ± 2.42	41.61 ± 2.22	47.73 ± 0.95	48.68 ± 0.90	45.97 ± 0.91	16.11 ± 1.74
	b	26.33 ± 0.68	27.93 ± 0.51	26.61 ± 0.49	27.18 ± 0.40	26.60 ± 0.51	37.92 ± 0.61

Data are the mean ± SE of 3 replicates of 10 fruit.

A second experiment was carried out to determine if there was a direct effect of the juice of the pomegranate arils and the appearance of internal browning of the husk. According to results of the 2019 year, in 2020, a CI sensitivity test on the inner surface of pomegranate peel was performed by using 20 fruit of 'Wonderful' and 'Mollar de Elche' (the most and lest CI sensitive cultivars). Each pomegranate fruit was cut into two parts through its equatorial plane and one of the halves had its arils removed. Subsequently and every 3 days, treatments were applied to the skins of the pomegranates by immersion for 25 min in the following solutions: distilled water, 1.5% citric acid, and fresh juices obtained from 'Bigful' and 'Mollar de Elche' (cultivars with the highest–lowest anthocyanins and high–low TA content in their juice respectively). After these treatments, pomegranate peels were placed in a dark cold room at 2 °C and 95% RH for 15 d, and then, the internal damage of the peels of the two pomegranate cultivars was evaluated.

2.2. CI Index

The CI index was evaluated individually for each pomegranate. This index was based on the percentage of peel surface affected by CI symptoms (dehydration, browning and pitting). A 5-point hedonic reference scale was used to quantify the external and internal CI index of pomegranate peel: 1 (no damage), 2 (0–10%), 3 (11–30%), 4 (31–50%), and 5 (>50%).

2.3. Fruit Quality Parameters

Weight loss was calculated as a ratio of the difference of weight of each fruit at harvest and at the end of the experiment and the weight of each fruit at harvest. Results were expressed as percentage of weight loss (%).

Fruit firmness was determined according to Lorente-Mento et al. [5] by using a TX-XT2i Texture Analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK). The force to deform the equatorial fruit diameter by 5% was calculated. Firmness results were expressed as the force-deformation ratio (N m^{-1}).



CIELAB color space parameters (L^* , a^* , b^*) were measured on external peel using a colorimeter CR200 (Konica Minolta, Japan) [12].

TSS, TA, and the determination of organic acids and sugars were measured according to Sayyari et al. [12]. Arils from 10 fruits were mixed to obtain a homogenous sample of each replicate, in which the following parameters were measured. About 25 g of arils from each sample was squeezed and filtered through a cotton cloth and the juice used to quantify TSS and TA in duplicate. TSS was determined by using a digital refractometer, Atago PR-101 (Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan), at 20 °C, and expressed as %. One mL of the juice was diluted in 25 mL of distilled H₂O and used to measure titratable acidity (TA) by automatic titration (785 DMP Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland) with 0.1 N NaOH up to pH 8.1, and results were expressed as g citric acid equivalent L⁻¹ of juice.

Organic acids and sugars were quantified in duplicate in each sample on a Hewlett-Packard 1100 series High Performance Liquid Chromatography (HPLC) according to Garcia-Pastor et al. [20]. The elution system consisted of 0.1% phosphoric acid running isocratically at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Organic acids and sugars were eluted through a Supelco column (Supelcogel C-610H, 30 cm × 7.8 mm, Supelco Park, Bellefonte, PA, USA). Organic acids were detected by absorbance at 210 nm, and sugars by a refractive index detector. For the quantification, standard curves of organic acids and pure sugars were used. The results were expressed as g L⁻¹ of juice.

Total anthocyanins were extracted and measured according to Lorente-Mento et al. [5]. For each sample, 20 g of arils was homogenized with methanol/formic acid/water (80:1:19, v/v/v) and centrifuged at 10,000 × g for 10 min. Total anthocyanin concentration was determined, by reading the absorbance at 520 nm. The results were expressed as 10–3 g L⁻¹ of cyanidin 3-glucoside equivalent (cyn 3-glu, molar absorption coefficient of 26,900 L cm⁻¹ mol⁻¹ and molecular weight of 449.2 g mol⁻¹).

2.4. Peel Mineral Composition

Mineral composition was measured in duplicate in 0.25 g of dehydrated peel obtained from a mixture of 10 fruits of each replicate. Each sample was digested using a microwave digester (CEM Mars One) using 1% HNO₃. After digestion of the samples, they were made up to 50 mL with distilled water and aliquots were taken to determine the macro- and microelements using an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) (Shimadzu icpms-2030). Mineral quantification was carried out using standard curves for Ca, Cu, Fe, K, Mn, Na, and Zn. The results were expressed as g kg⁻¹ on dry weight basis.

2.5. Statistical Analysis

The dependent variables quantified were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) (SPSS software version 11.0 for Windows, IBM, Chicago, IL, USA). When the differences were significant, the means were separated by Tukey test, with differences being considered significant at $p < 0.05$. In addition, Pearson correlation between external and internal peel CI and dependent variables at harvest were performed. Pearson correlations among dependent variables of fruit stored 30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C were also calculated. A bilateral significance test of the correlation coefficient was performed. In addition, non-linear regression was performed between CI and organic acids. All analyses were achieved with SPSS software version 11.0 for Windows.

3. Results and Discussion

All pomegranate cultivars showed CI symptoms after 30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C, although significant differences were observed among cultivars (Figure 1). 'Kingdom' and 'Wonderful' cultivars showed the highest internal and external CI index, followed by 'Acco' and 'Bigful' and finally, the least sensitive cultivars were 'Purple Queen' and 'Mollar de Elche'.

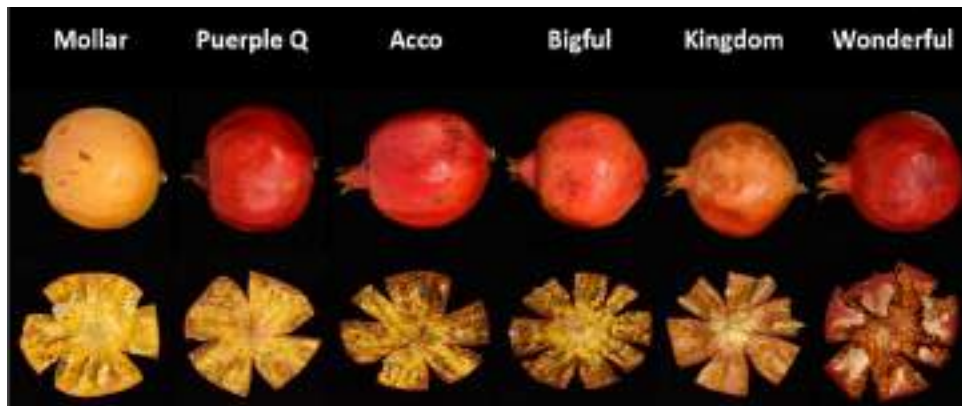


Figure 1. Symptoms of chilling injury on external and internal surface of skin in pomegranate cultivar after storage for 30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C.

In addition, CI on the inner peel surface was higher than on the outer one for all cultivars (Figure 1)—always keeping the proportionality of the internal and external damage in each cultivar—and they were highly correlated ($r = 0.93$) (Figure 2 and Table 2). Kashash et al. [15] identified several metabolic pathways that were up-regulated in pomegranate fruits exhibiting tolerance to cold temperatures. These pathways included activation of transcripts involved in jasmonic acid and ethylene hormone biosynthesis and signaling, stress-related transcription factors, calcium and mitogen-activated protein kinase signaling, starch degradation, galactinol and raffinose biosynthesis, lipid metabolism, phenol biosynthesis, and heat-shock proteins.

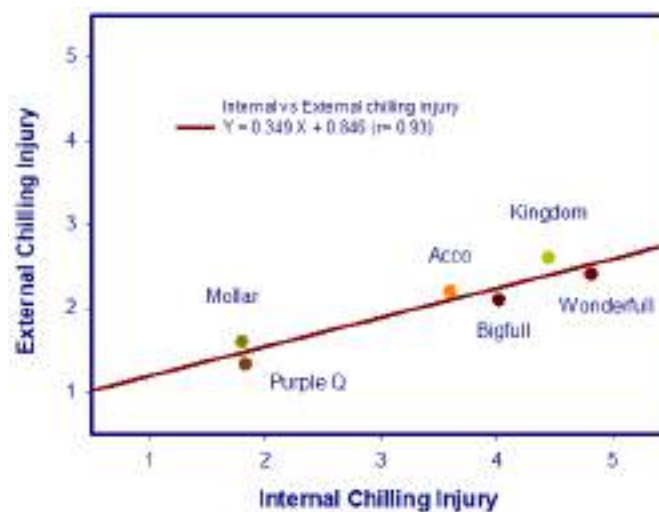


Figure 2. Correlation between internal and external chilling injury of six pomegranate cultivars after storage for 30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C.



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



Table 2. Pearson correlation between dependent variables of fruit after storage for 30 d at 2 °C plus 20 d at 20 °C.

	TSS	TA	Ext D	Int D	IL	WL	Firm.	ACNs	Oxalic	Citric	Tartaric	Malic	Ascorbic	Succinic	Fumaric	Sucr.	Gluc.	Fruct.	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn	ΣMin.	
TA	0.76 ***	-																										
Ext D	0.68 ***	0.84 ***	-																									
Int D	0.56 **	0.87 ***	0.93 ***	-																								
IL	-0.54 ***	-0.09	0.05	0.07	-																							
WL	-0.7 ***	-0.43 **	-0.28	-0.18	0.36 *	-																						
Firm.	0.47 **	0.33 *	0.5 **	0.49 *	0.09 ***	-0.63 **	-																					
ACNs	0.39 *	0.80 ***	0.85 ***	0.94 ***	0.27	-0.1	0.26	-																				
Oxalic	-0.36 ***	-0.74 ***	-0.88 ***	-0.94 ***	-0.26	0.01	-0.41 *	-0.94 ***	-																			
Citric	0.82 ***	0.95 ***	0.87 ***	0.87 ***	-0.25	-0.4	0.47 *	0.84 ***	-0.73 ***	-																		
Tartaric	0.71 ***	0.75 ***	0.59 **	0.62 ***	-0.35 **	-0.55 **	0.50 *	0.57 **	-0.45 *	0.75 ***	-																	
Malic	-0.62 ***	-0.91 ***	-0.84 ***	-0.91 ***	0.06	0.19	-0.29	-0.94 ***	0.81 ***	-0.94 ***	-0.68 ***	-																
Ascorbic	-0.67 ***	-0.24	-0.02	0.10	0.60 **	0.74 ***	-0.38	0.21	-0.33	-0.24	0.01	-																
Succinic	-0.85 ***	-0.58 **	-0.34 **	-0.28 **	0.56 **	0.75 ***	-0.52 **	-0.18 **	0.03	-0.59 **	-0.7 ***	0.38 ***	0.87 ***	-														
Fumaric	-0.31	-0.01	0.19	0.24	0.51 *	0.36	-0.02	0.27	-0.39	-0.02	-0.16	-0.19	0.64 ***	0.53 **	-													
Sucr.	-0.48 *	-0.83 ***	-0.67 ***	-0.8 ***	0.04	0.07	-0.05	-0.9 ***	0.72 ***	-0.86 ***	-0.6 **	0.94 ***	-0.05	0.32	-0.12	-												
Gluc.	0.8 ***	0.78 ***	0.75 ***	0.71 ***	-0.29 *	-0.42 **	0.59 **	0.56 **	-0.51 *	0.83 ***	0.64 ***	-0.72 ***	-0.33	-0.54 **	-0.06	-0.51 **	-											
Fruct.	0.74 ***	0.51 *	0.48 *	0.38 *	-0.42 *	-0.53 **	0.62 ***	0.17	-0.15	0.56 **	0.49 **	-0.37 *	-0.52 *	-0.56 **	-0.19	-0.13 **	0.90 ***	-										
Ca	0.01	-0.06	0.05	0.12	0.03	-0.27	0.41	-0.07	-0.01	-0.11	0.10	0.03	-0.03	-0.06	0.18	0.22	0.11	0.21	-									
Cu	0.36	0.57 **	0.70 ***	0.58 **	0.01	-0.02	0.17	0.63 **	-0.65 **	0.58 *	0.19	-0.53 *	0.16	-0.02	-0.09	-0.48	0.43	0.19	-0.32	-								



Table 2. *Cont.*

	TSS	TA	Ext D	Int D	IL	WL	Firm.	ACNs	Oxalic	Citric	Tartaric	Malic	Ascorbic	Succinic	Fumaric	Sucr.	Gluc.	Fruct.	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn	ΣMin.	
Fe	-0.17	0.10	0.42	0.35	0.53	0.39	0.09	0.37	-0.54	0.06	-0.09	-0.17	0.51 *	0.52	0.28	-0.05	0.03	-0.15	-0.15	0.55	-	-	-	-	-	-	-	-
K	0.87 ***	0.81 ***	0.71 ***	0.66 **	-0.51 *	-0.42 **	0.60 **	0.51 *	-0.48 *	0.80 ***	0.69 **	-0.63 **	-0.39 **	-0.65 **	-0.15 *	-0.51 *	0.84 ***	0.74 ***	0.08	0.42	-0.07	-	-	-	-	-	-	-
Mg	0.01	-0.09	-0.04	0.02	0.049	-0.47 *	0.45	-0.13	0.08	-0.12	0.16	0.09	-0.19	-0.16	-0.01	0.24	0.02	0.14	0.87 ***	-0.37	-0.2	-0.06	-	-	-	-	-	-
Mn	-0.42	-0.06	0.26	0.32	0.70	0.38	0.18	0.29	-0.48	-0.13	-0.13	-0.07	0.70	0.56 *	0.61 **	0.01	-0.15	-0.3	0.44	0.1	0.64 **	-0.21	0.33	-	-	-	-	-
Na	-0.05	0.08	0.33	0.18	0.21	0.30	-0.11	0.24	-0.25	0.10	-0.13	-0.15	0.30	0.25	-0.04	-0.07	0.10	-0.03	-0.21	0.49 **	0.54 **	-0.09	-0.29	0.20	-	-	-	-
Zn	0.10	0.33	0.44	0.40	0.01	0.46	-0.17	0.45	-0.47	0.31	0.08	-0.34	0.28	0.16	-0.02	-0.36	0.24	0.03	-0.45	0.67 **	0.54 **	0.31	-0.68 **	0.10	0.48 *	-	-	-
ΣMin.	0.83 ***	0.78 ***	0.76 ***	0.69 ***	-0.44	-0.42 **	0.66 **	0.51 *	-0.51 *	0.76 ***	0.67 **	-0.62 **	-0.33 **	-0.6 **	-0.11 **	-0.4	0.85 ***	0.76 ***	0.29	0.42	-0.01	0.96 ***	0.11	-0.06	0.04	0.26	-	-
Ca/K	-0.84 ***	-0.77 ***	-0.69 ***	-0.66 **	0.48 *	0.46 *	-0.66 **	-0.61 **	0.46 *	-0.74 ***	-0.69 **	0.59 **	0.38	0.64 ***	0.1	0.39	-0.83 ***	-0.76 ***	-0.29	-0.34	0.1	-0.97 ***	-0.13	0.11	0.13	-0.19 ***	-0.98 ***	

Red letters show the correlation between external and internal CI indexes and dependent variables. TSS: Total Soluble Solids, TA: Titratable Acidity, Ext D or Int D: external or internal peel CI index, IL: Ion Leakage, WL: Weight Loss, ACNs: Anthocyanins, Firm.: Firmness, Sucr.: Sucrose, Gluc.: Glucose, Fruct.: Fructose, ΣMin.: Mineral Sum. *** Significant difference at $p < 0.001$. ** Significant difference at $p < 0.01$. * Significant difference at $p < 0.05$.



IL increased during storage in fruit peel for all cultivars. However, IL was not related to the CI sensitivity of cultivars. That is, the IL in pomegranate peel after storage was not correlated with internal ($r = 0.07$) or external ($r = 0.05$) CI indexes (Figure 3). On the contrary, the IL of the freshly harvested fruit (d 0) had a high positive correlation with the internal ($r = 0.80$) and external ($r = 0.63$) CI indexes in the peel after storage (Figure 3 and Table 2). Therefore, the IL of the peel of freshly harvested pomegranates could serve as an indicator of the state of the cell membranes and, in turn, predict the sensitivity of the fruit to suffer CI. On the other hand, the fatty acid composition of cell membranes of pomegranate peel was reported to change during storage at chilling temperatures, leading to a decrease in PUFA/SFA [9]. However, to date no pomegranate varietal comparative study has been carried out, in which CI symptoms have not been correlated with any increased IL or fatty acid composition.

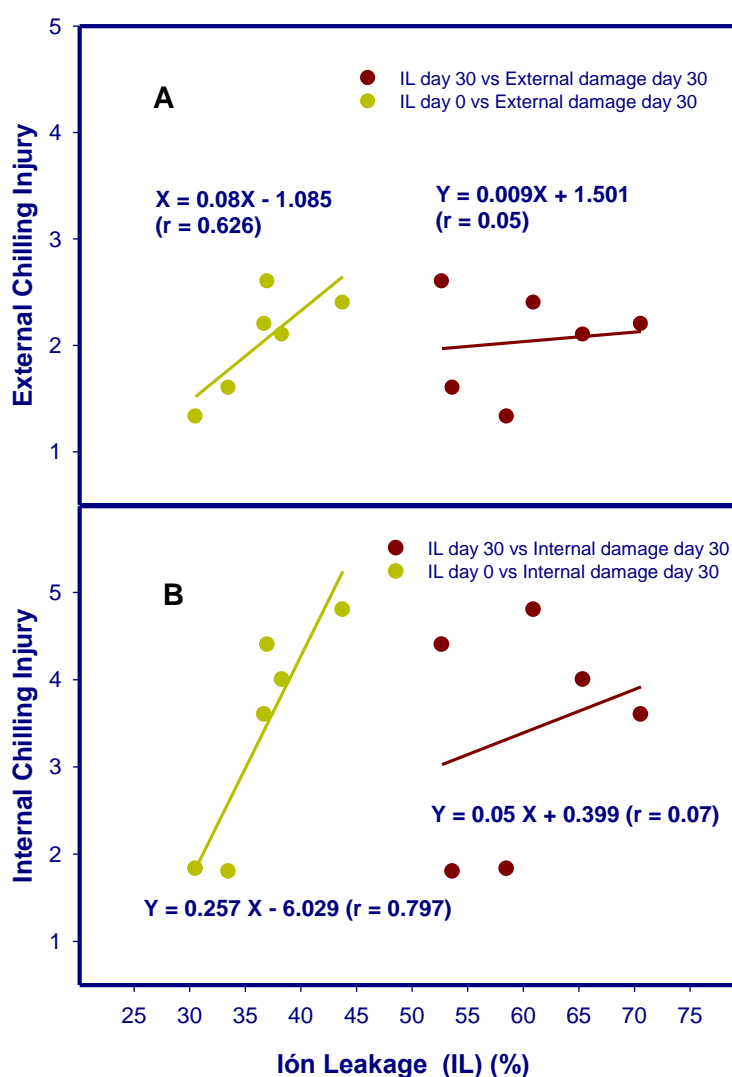


Figure 3. Correlation between external (A) and internal (B) chilling injury in pomegranate peels of different cultivars and ion leakage at harvest (green circle) and after storage for 30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C (red circle).



The degree of weight loss in pomegranate fruits differs between cultivars, particularly when comparing their storage under different ambient conditions and temperatures. Factors that have a significant impact on moisture loss include fruit size, respiration rate, fruit peel–aril ratio, moisture content, and thickness of the peel [21]. These authors demonstrated that the moisture loss was significantly higher in medium-sized ‘Wonderful’ fruit compared to small-sized ‘Acco’ fruit. In our experiment, fruit weight loss ranged between $9.34 \pm 0.56\%$ for ‘Wonderful’ cultivar to $19.07 \pm 1.09\%$ for the ‘Bigful’ at the end of storage (Figure 4A). In this regard, the cultivars that showed the highest weight loss were not those that exhibited the most sensitivity to CI. Liu et al. [22] obtained similar results, since ‘Jingpitian’ and ‘Lishanhong’ pomegranate cultivars had the least weight loss and showed the highest CI symptoms when stored at 4°C for 90 days, while ‘Tunisia soft seed’ cultivar showed high weight losses but very low incidence of CI. These authors attributed the weight losses of the pomegranates to the husk thickness. In addition, cultivars showing the highest weight loss also showed the lowest firmness, which was $\sim 30\%$ lower after 30 d of storage at 2°C plus 2 d at 20°C for ‘Acco’ and ‘Bigful’ cultivars (Figure 4B). Thus, a negative correlation ($r = -0.63$) was found between weight loss and firmness at the end of storage (Table 2). However, internal or external CI in pomegranate peel was not correlated to weight loss or firmness (Table 2). On the contrary when considering changes during storage in a particular cultivar, the increased weight and firmness losses during the storage were related to CI symptoms in pomegranate peel as reported for pomegranate ‘Mollar de Elche’ [5,8].

On the other hand, total aril anthocyanin content at harvest was different among the studied cultivars. The highest concentration was found in ‘Bigful’, ‘Wonderful’, and ‘Kingdom’ in concentrations of $0.22\text{--}0.20\text{ g L}^{-1}$, followed by ‘Acco’ ($0.168 \pm 0.004\text{ g L}^{-1}$) and ‘Purple Queen’ ($0.089 \pm 0.001\text{ g L}^{-1}$), while ‘Mollar de Elche’ had very low anthocyanin content ($0.010 \pm 0.001\text{ g L}^{-1}$) (Figure 4C). For all cultivars, the anthocyanin concentration increased up to $\sim 25\%$ during 30 d of storage at 2°C plus 2 d at 20°C (Figure 4C). Different papers have shown that anthocyanin content in pomegranate arils increased during cold storage [23] even if fruit are stored under chilling temperatures of 2°C [12,24], as a consequence of an increased activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and UDPglucose, flavonoid-3-O glucosyltransferase (GT), which are key enzymes in the phenolic and anthocyanin biosynthetic pathways [23].

Anthocyanin content in the arils at harvest had a high correlation with cultivar sensitivity to CI (external damage $r = 0.75$ and internal damage $r = 0.89$) (Table 3) as well as at the end of storage (external damage $r = 0.85$ and internal damage $r = 0.94$) (Table 2). Thus, the cultivars most sensitive to CI were those that had higher anthocyanin content at harvest and at the end of storage.

Table 3. Pearson correlation between dependent variables of fruit at harvest and external and internal damage of fruit storage for 30 d at 2°C plus 20 d at 20°C .

		Pomegranate Variables at Harvest													
30 d at 2°C	TSS	TA	ILd0	Firm.	ACNs	Oxalic	Citric	Tartaric	Malic	Ascorbic	Succinic	Fumaric	Sucr.	Gluc.	Fruct.
Ext D	0.64 ***	0.91 ***	0.63 ***	-0.004	0.75 ***	-0.91 ***	0.90 ***	0.34	-0.84 ***	-0.02	-0.20	0.04	-0.59 **	0.11	-0.06
Int D	0.59 **	0.91 ***	0.80 ***	-0.001	0.89 ***	-0.92 ***	0.89 ***	0.31	-0.90 ***	0.06	-0.19	0.13	-0.66 ***	0.05	-0.12
ILd30	-0.39 *	-0.02	0.16	0.17	0.42 *	-0.25	-0.19	-0.50 *	0.13	0.60 **	0.58 *	0.58 *	0.28	-0.56 *	-0.58 *

Ext D or Int D: external or internal damage on peel, ILd0: Ion Leakage d 0, ILd30: Ion Leakage d 30, TSS: Total Soluble Solids, TA: Titratable Acidity, ACNs: Anthocyanins, Firm: Firmness, Sucr: Sucrose, Gluc: Glucose, Fruct: Fructose. *** Significant difference at $p < 0.001$. ** Significant difference at $p < 0.01$. * Significant difference at $p < 0.05$.

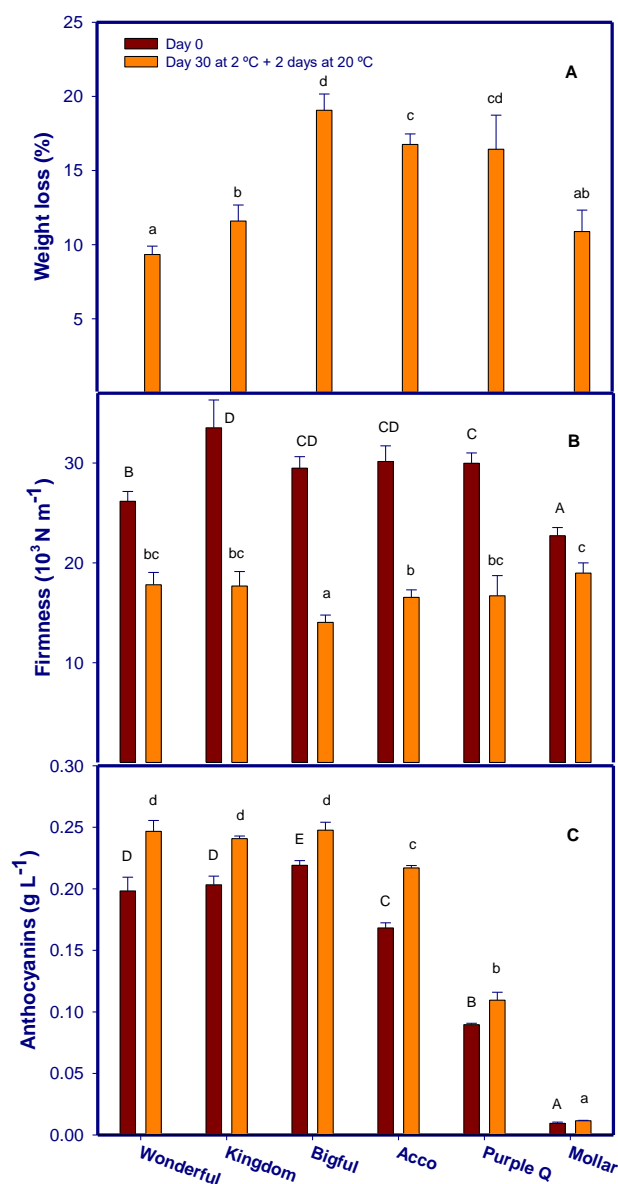


Figure 4. Weight loss (A), firmness of whole fruit (B) and total anthocyanins (C) of pomegranate cultivars at harvest (red bar) and after storage for 30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C (orange bar). Different tailored letters show significant differences ($p < 0.05$) between data at harvest. Different lowercase letters show significant differences ($p < 0.05$) between data after storage for 30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C. Data are the mean \pm S.E. of determinations made in 3 replicates of 10 fruit.

TSS content (Table 4) at harvest was in the range 13.28–16.10% in the different cultivars. ‘Mollar de Elche’, ‘Kingdom’, and ‘Wonderful’ cultivars showed the highest (>15), TSS concentration at harvest, 15.83 ± 0.72 , $16.10 \pm 0.13\%$, and $16.03 \pm 0.16\%$ respectively, ‘Acco’ and ‘Bigful’ had a TSS content of $14.23 \pm 0.18\%$ and $14.18 \pm 0.15\%$, respectively, while ‘Purple Queen’ had $13.28 \pm 0.09\%$ of TSS. During storage, TSS did not change in ‘Mollar de Elche’, ‘Kingdom’, ‘Wonderful’, and ‘Bigful’ cultivars, while in ‘Acco’ and ‘Purple Queen’ it decreased. Sucrose, glucose, and fructose were the three sugars identified in all cultivars (Table 4). Sucrose concentration was lower than 0.7 g L^{-1} (accounting for 1% of total sugars),



while glucose and fructose were found at much higher concentrations, $\sim 50 \text{ g L}^{-1}$ (each one accounting for $\sim 49.0\%$ of total sugar content). Glucose and fructose concentrations were within the range of values reported here in other pomegranate cultivars [2,5,25]. Sucrose concentration decreased in CI sensitive cultivars ('Kingdom' and 'Wonderful'), while increases occurred in less sensitive cultivars ('Bigful', 'Acco', 'Purple Queen', and 'Mollar de Elche'). Glucose and fructose decreased in all cultivars, except for 'Kingdom' and 'Acco' cultivars, in which no changes were observed (Table 4). In this sense, sucrose, at the end of storage, was negatively correlated with internal ($r = -0.8$) and external ($r = -0.67$) CI of pomegranate cultivars, while glucose concentration at the end of the experiment was positively correlated with internal ($r = 0.71$) and external ($r = 0.75$) CI indexes (Table 2). The accumulation of sugars (sucrose, glucose, or fructose) has been considered as a mechanism for protecting cell membranes and stabilizing macromolecular structures against CI [26,27]. However, in our case, only sucrose accumulated in the arils of the most tolerant pomegranate cultivars to CI, while glucose and fructose decreased or did not change with respect to the initial concentration. Thus, sucrose could be the most important sugar accounting for increasing CI tolerance in pomegranate cultivars.

TA of aril juice was different among cultivars (Table 4). The most acidic cultivars were 'Kingdom' and 'Wonderful' with TA higher than 12 g L^{-1} , while 'Acco' and 'Bigful' cultivars had TA close to 7 g L^{-1} . Finally, 'Purple Queen' and 'Mollar de Elche' cultivars had TA lower than 4 g L^{-1} . Overall, among the cultivars chosen in this manuscript, those with the highest acidity, 'Kingdom' and 'Wonderful', were more sensitive to CI, than the low acidic cultivars, 'Purple Queen' and 'Mollar de Elche'. According to Pearson correlations (Tables 2 and 3), fruit TA at harvest was highly correlated ($r = 0.91$) with internal and external CI indexes, while fruit TA after 30 d at 2°C plus 2 d at 20°C of storage was adjusted to $r = 0.87$ for internal damage and $r = 0.84$ for external CI. In addition, no significant changes were observed in TA during storage for any of the cultivars (Table 4). In agreement with these results, Liu et al. [22] showed that pomegranate cultivars that were more susceptible to CI exhibited the highest TA over 90 days of storage at 4°C . However, a more extensive study would be needed with a greater number of varieties and different cultivation conditions to assess if this relationship is general for all pomegranate cultivars.

Oxalic, citric, tartaric, malic, ascorbic, succinic, and fumaric organic acids were detected in all pomegranate cultivars (Table 4). Citric acid was the main organic acid in 'Kingdom', 'Wonderful', 'Bigful', and 'Acco' varieties in concentrations of 11.8, 9.7, 5.7, and 5.3 g L^{-1} , respectively, which accounted for 84.7, 83.3, 62.3, and 60.7% of total organic acids, respectively. However, the citric acid concentration in 'Purple Queen' was of a similar fraction to ascorbic acid and were 34.8 and 30.2 % of total organic acid content, respectively. Finally, malic and citric acids were the main organic acids in 'Mollar de Elche' each one accounting for 30.7 and 27.9% (1.0 and 1.5 g L^{-1}). The other organic acids were $<20\%$ of the total organic acids in all cultivars.

Citric acid was the predominant organic acid in the more sensitive cultivars to CI. However, citric, malic, or ascorbic acids were in a low concentration and in a similar fraction in the less sensitive cultivars to CI. In addition, in the most CI sensitive cultivars malic acid was degraded during cold storage. However, in the less CI sensitive cultivars to CI ('Acco' and 'Mollar de Elche'), malic acid did not change during storage. On the other hand, the concentration of oxalic acid was higher and increased during storage in the cultivars more resistant to CI. According to the Pearson correlations (Tables 2 and 3), the malic and oxalic acid concentrations, both at harvest and at the end of storage, exhibited high negative correlations ($r > -0.8$) with external and internal CI damage. However, citric acid concentrations, both at harvest and at the end of storage, showed high positive correlations ($r \sim 0.9$) with external and internal CI. In this sense, CI of the peel internal surface had high positive correlations by means of exponential type curves of the maximums with the citric acid concentrations, both at the time of harvest ($y = 4.65 \times (1 - \exp(-3.85 \times x))$ $r = 0.98$) and at the end of storage ($y = 4.56 \times (1 - \exp(-3.82 \times x))$ $r = 0.96$) (Figure 5).



Table 4. Total soluble solids, titratable acidity (TA), organic acid and sugar contents in aril juice of different pomegranate cultivars.

Time and Temp.	Cultivar	TSS (%)	TA (g L ⁻¹)	Oxalic (10 ⁻³ g L ⁻¹)	Citric (g L ⁻¹)	Tartaric (10 ⁻³ g L ⁻¹)	Malic (g L ⁻¹)	Ascorbic (g L ⁻¹)	Succinic (g L ⁻¹)	Fumaric (10 ⁻³ g L ⁻¹)	Sucrose (g L ⁻¹)	Glucose (g L ⁻¹)	Fructose (g L ⁻¹)	
30 d at 2 °C plus 2 d at 20 °C	Wonderful	16.10 ± 0.13	12.1 ± 0.3 cA	3.8 ± 0.5 aA	9.7 ± 0.2 dA	21.0 ± 1.8 bA	0.63 ± 0.04 aA	0.77 ± 0.01 aA	0.5 ± 0.09 aA	0 aA	0.31 ± 0.01 aA	50.9 ± 0.15 abA	49.4 ± 1.4 abA	
	Kingdom	16.03 ± 0.16	13.8 ± 1.2 dA	5.6 ± 0.1 aA	11.8 ± 0.3 eA	40.3 ± 3.1 bA	0.60 ± 0.01 aA	0.92 ± 0.01 aA	0.45 ± 0.09 aA	0 aA	0.29 ± 0.01 aA	49.2 ± 0.7 abA	47.7 ± 0.6 abA	
	Bigful	14.23 ± 0.18	7.3 ± 0.1 bA	4.6 ± 0.1 aA	5.4 ± 0.1 bA	0 aA	0.73 ± 0.02 bA	1.69 ± 0.03 cA	0.81 ± 0.03 bA	79.6 ± 4.8 bA	0.44 ± 0.06 bA	48.5 ± 1.0 abA	47.3 ± 1.0 abA	
	Acco	14.18 ± 0.15	7.1 ± 0.4 bA	3.4 ± 0.2 aA	6.0 ± 0.2 cA	0 aA	0.57 ± 0.03 aA	1.97 ± 0.12 cA	1.13 ± 0.02 bA	132.2 ± 5.6 dA	0.40 ± 0.13 bA	44.4 ± 0.3 aA	42.9 ± 0.4 aA	
	Purple Q	13.28 ± 0.09	3.9 ± 0.2 aA	5.7 ± 0.3 cA	1.5 ± 0.4 aA	0 aA	0.86 ± 0.02 cA	1.31 ± 0.01 bA	0.49 ± 0.02 aA	101.2 ± 0.6 cA	0.53 ± 0.01 cA	44.1 ± 0.9 abA	44.7 ± 1.1 abA	
	Mollar	15.83 ± 0.72	3.6 ± 0.2 aA	4.1 ± 0.1 bA	0.9 ± 0.1 aA	45.6 ± 0.12 cA	1.00 ± 0.15 cA	0.67 ± 0.02 aA	0.59 ± 0.02 aA	0 aA	0 aA	0.66 ± 0.03 dA	51.4 ± 1.3 bA	53.4 ± 1.1 bA
	Wonderful	15.78 ± 0.04	13.4 ± 1.1 cA	3.5 ± 0.2 aA	10.7 ± 0.3 cA	6.5 ± 2.1 bB	0 aB	0.79 ± 0.02 aA	0.05 ± 0.01 aB	48.4 ± 1.8 bB	0 aB	48.2 ± 0.3 bcB	46.7 ± 0.4 abB	
	Kingdom	16.30 ± 0.12	15.7 ± 1.1 dA	5.7 ± 0.1 aA	12.7 ± 0.1 dA	5.0 ± 3.8 abB	0 aB	0.95 ± 0.05 abA	0.09 ± 0.01 aB	57.5 ± 2.6 cB	0 aB	49.5 ± 1.3 cA	48.1 ± 1.1 bA	
	Bigful	14.13 ± 0.10	7.5 ± 0.1 bA	5.7 ± 0.1 aA	4.6 ± 0.2 bA	8.1 ± 5.7 abB	0.47 ± 0.04 bB	1.66 ± 0.09 cA	1.17 ± 0.2 dB	84.1 ± 5.7 dB	0.59 ± 0.04 bB	46.2 ± 0.7 abcB	45.6 ± 0.7 abB	
	Acco	13.82 ± 0.06	6.9 ± 0.1 bA	5.1 ± 0.5 aA	4.5 ± 0.1 bA	6.2 ± 4.3 abB	0.49 ± 0.02 bB	1.69 ± 0.08 cB	1.27 ± 0.1 dB	88.3 ± 1.7 dB	0.58 ± 0.05 bB	43.8 ± 0.4 abA	43.3 ± 0.3 aA	
	Purple Q	12.08 ± 0.07	3.9 ± 0.6 aA	22.2 ± 6.5 bA	1.9 ± 0.6 aA	1.7 ± 1.1 aB	0.56 ± 0.12 cB	1.12 ± 0.22 bA	0.85 ± 0.02 cB	52.8 ± 1.5 cB	0.59 ± 0.09 cB	35.3 ± 3.5 aB	35.7 ± 7.1 aB	
	Mollar	14.92 ± 0.23	3.6 ± 0.1 aA	34.6 ± 0.1 bA	0.9 ± 0.1 aA	8.4 ± 3.0 abB	1.08 ± 0.02 dA	0.65 ± 0.01 aB	0.44 ± 0.01 bB	40.0 ± 5.4 aB	1.43 ± 0.02 cB	44.6 ± 0.7 abB	47.1 ± 0.7 abB	

Data are the mean ± SE of 3 replicates of 10 fruit. Different tailored letters show significant differences ($p < 0.05$) between data at harvest and after storage for each cultivar and dependent variable. Different lowercase letters show significant differences ($p < 0.05$) among cultivars for each dependent variable and storage time.

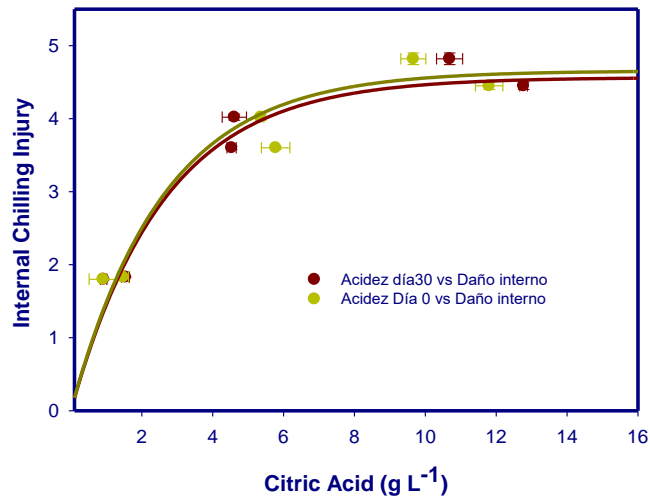


Figure 5. Nonlinear correlations between internal chilling injury on internal peel surface and citric acid concentration in juices at harvest (green circle) or and after storage (red circle). Data are the mean \pm S.E. of determinations made in 3 replicates of 10 fruit.

Juice leakage from the arils could lead to the internal peel CI being manifested by browning spots. In fact, Fawole et al. [28] and Ramezani et al. [29] reported that the leakage or loss of juice from the arils is due to integrity loss of the aril cell membranes which leads to increases in membrane permeability. Organic acids develop an important role in regulating osmotic pressure, pH homeostasis, and stress resistance in fruit cells [30]. The permeability loss and fluidity change of cell membranes, including plasmatic and organelles membranes, such as tonoplast, are a consequence of CI. The increase in permeability of all cell membranes leads to the leakage of solutes such as protons or protonated forms of organic acids, towards the cell wall [31]. The high concentrations of sugars, organic acids, and inorganic ions inside the vacuole generate high osmotic pressure that leads to a strong negative water potential [32]. Accordingly, 'Wonderful' and 'Kingdom', with higher content of organic acids and other solutes such as anthocyanins would have higher osmotic pressure and lower water potential than less CI sensitive cultivars. Consequently, the aril cell membranes of CI susceptible cultivars, with a higher internal pressure in the vacuoles, would have a greater leakage of solutes through both the tonoplast and the plasmalemma leading quickly to contact with placental tissue and the internal peel surface of pomegranates, since arils are composed of a single layer of parenchymatic cells between the seed and its surface [33]. On the other hand, the oxalic acid role on defense mechanisms against biotic and abiotic stress of the fruit has been studied, and one of these effects is increase of the antioxidant systems as has been reported in lemon fruit [34]. In addition, treatments with oxalic acid have improved fruit quality at harvest [20] and during postharvest and have reduced chilling injury pomegranate [35]. In this sense, the accumulation of oxalic acid in 'Mollar de Elche' and 'Purple Queen' cultivars after 30 d of storage at 2 °C plus 2 d at 20 °C could reduce their CI sensitivity.

Regarding mineral composition in the peel of pomegranates, K (14.1–7.7 g kg⁻¹) and Ca (3.6–2.7 g kg⁻¹) were the major elements, both accounting for approximately ~98% of the total quantified minerals (Table 5). Na (0.72–0.17 g kg⁻¹) and Mg (0.53–0.32 g kg⁻¹) accounted for ~1% of the total minerals, while Cu, Fe, Mn, and Zn were found at much lower concentration (<0.014 g kg⁻¹).


Table 5. Mineral contents in pomegranate peel after storage at 2 °C plus 20 d at 20 °C.

Cultivar	Ca (g kg ⁻¹)	Cu (10 ⁻³ g kg ⁻¹)	Fe (10 ⁻³ g kg ⁻¹)	K (g kg ⁻¹)	Mg (g kg ⁻¹)	Mn (10 ⁻³ g kg ⁻¹)	Na (g kg ⁻¹)	Zn (10 ⁻³ g kg ⁻¹)	Σ Minerals (g kg ⁻¹)	Ca/K
Wonderful	3.2 ± 0.1 b	3.1 ± 0.4 b	4.7 ± 0.5 c	12.8 ± 0.7 b	0.53 ± 0.02 a	5.4 ± 0.3 c	0.26 ± 0.09 ab	9.4 ± 1.4 bc	16.8 ± 0.8 a	0.24 ± 0.01 d
Kingdom	2.6 ± 0.1 c	4.0 ± 0.4 a	6.0 ± 1.2 bc	14.1 ± 0.3 c	0.32 ± 0.02 d	3.7 ± 0.1 e	0.57 ± 0.06 c	13.8 ± 2.4 a	17.6 ± 0.6 a	0.18 ± 0.03 e
Bigful	3.4 ± 0.3 ba	2.7 ± 0.2 b	7.8 ± 1.8 b	10.6 ± 0.2 b	0.40 ± 0.03 c	6.9 ± 0.4 b	0.47 ± 0.06 bc	13.5 ± 2.5 a	14.9 ± 0.6 b	0.32 ± 0.01 c
Acco	3.1 ± 0.2 b	3.8 ± 0.6 a	10.2 ± 2 a	9.1 ± 0.8 d	0.44 ± 0.01 c	7.7 ± 0.5 a	0.72 ± 0.14 c	11.6 ± 1.2 ab	13.3 ± 0.5 bcd	0.34 ± 0.01 bc
Purple Q	2.7 ± 0.4 cb	2.3 ± 0.4 cb	3.7 ± 0.5 d	7.7 ± 0.7 e	0.35 ± 0.05 dc	3.9 ± 0.4 de	0.38 ± 0.09 b	10.6 ± 1.7 ab	11.2 ± 0.9 d	0.35 ± 0.1 ab
Mollar	3.6 ± 0.1 a	2.1 ± 0.1 c	3.9 ± 0.4 cd	9.8 ± 0.5 d	0.50 ± 0.02 b	4.4 ± 0.3 b	0.17 ± 0.03 a	7.3 ± 0.6 c	14.0 ± 0.6 c	0.37 ± 0.01 a

Data are the mean ± SE of 3 replicates of 10 fruit. Different letters show significant differences ($p < 0.05$) among cultivars for each dependent variable.

The sum of total mineral was positively correlated with the sensitivity of the pomegranates to CI ($r = 0.76$ for the external damage and $r = 0.69$ for the internal damage). Thus, the 'Wonderful' and 'Kingdom' cultivars had a total mineral content close to 17 g kg⁻¹ while the remaining cultivars had a content lower than 15 g kg⁻¹. Potassium was the only mineral that was positively correlated with external ($r = 0.71$) and internal ($r = 0.66$) CI damage. The remaining quantified minerals were not correlated with CI symptoms.

There is extensive information on calcium levels in fruit and the occurrence of CI in several fruit species [36] and even in pomegranate [29]. In the present experiment, all the analyzed cultivars were grown in the same field and under the same cultivation system while the concentration of calcium in the skin was similar in all cultivars and did not correlate with the appearance of CI ($r = 0.1$) (Table 3). However, according to Pearson correlation, the Ca/K ratio was negatively correlated with the sensitivity of the pomegranate cultivars to CI ($r = -0.69$ for external damage and $r = -0.66$ for internal damage). The balance between calcium and potassium (Ca/K) is considered to be a good indicator of sensitivity to biotic and abiotic disorder in plant tissues [37]. Several works have shown that a low ratio of Ca/K concentration is related to a high incidence of various disorders such as bitter pit in apple [38], appearance of water-soaked in peaches [39], and water-core in pears and apples [40]. In addition, the Ca/K ratio has been postulated as a good indicator to ensure post-harvest fruit quality [41]. High concentrations of K can have antagonist effects to Ca in vegetable tissues leading to increased tissue sensitivity to disease and disorder incidence [42]. K and Mg compete with Ca for binding sites at the cell wall and plasma membrane, which can negatively affect membrane stability and increase susceptibility to Ca deficiency disorders [43,44].

According to the CI sensitivity test (Figure 6), citric acid and water treatments of 'Mollar de Elche' and 'Wonderful' peels led to a similar internal damage appearance of both cultivars. In both cases, only the browning related to the physical breakage of the tissues during manual peeling occurred. However, the inner surface of the pomegranate peel treated with 'Bigful' pomegranate juice caused a strong browning, while the pomegranates treated with 'Mollar de Elche' pomegranate juice were only slightly browned.

Molla et al. [45] reported that in pomegranate suffering from CI, aril red color decreased, peel tissue became spongy, and cell membrane permeability increased. In this sense, the juices from the damaged arils could leak onto the white tissues of the peel and stimulate the browning reactions. Accordingly, Liu et al. [22] showed that 'Jingpitan' and 'Lishanhong' cultivars, which are susceptible to CI, displayed notable browning and changes in husk microstructure during storage at 4 °C for 90 d, showing widening of microcracks, obstruction of lenticels, and disintegration of the external wax layer.

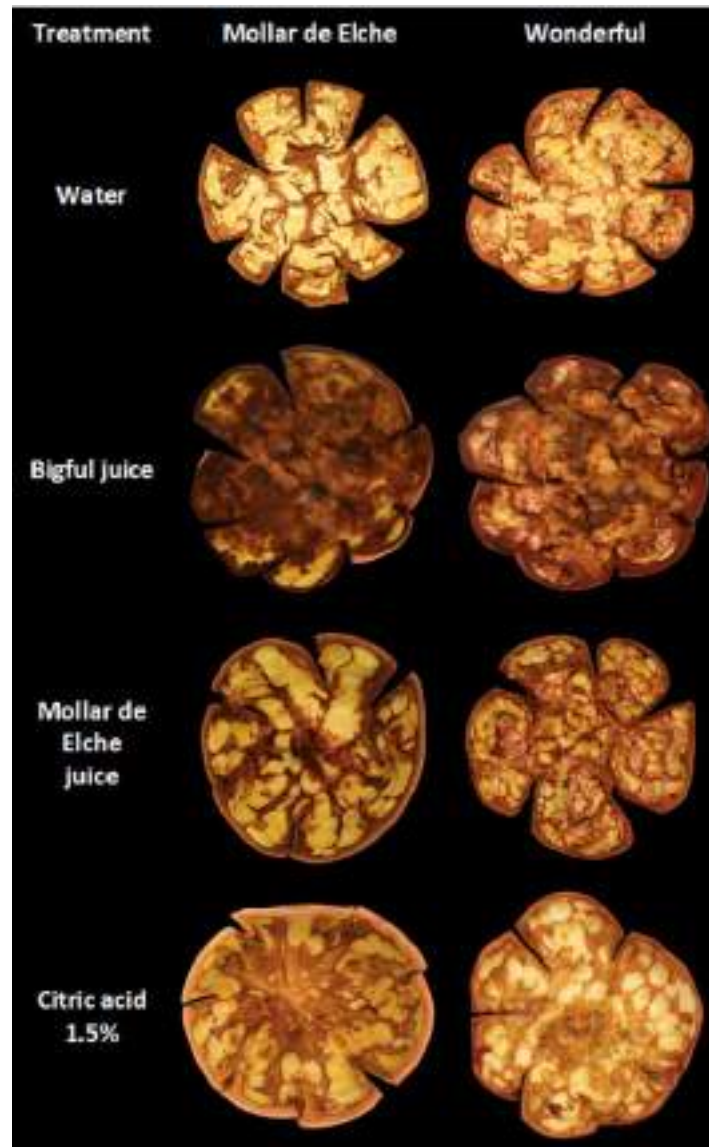


Figure 6. Internal aspect of 'Wonderful' and 'Mollar de Elche' peels treated with water, 'Bigful' or 'Mollar de Elche' juices, and citric acid at 1.5%, after 15 d at 2 °C.

As shown in Figure 6, citric acid did not induce browning of the internal surface of pomegranate peel. The high polyphenol (anthocyanin) concentration of 'Bigful' juice would interact with the internal peel surface and carpel tissues leading to browning, while 'Mollar de Elche' juice which has low anthocyanin concentration, did not cause such high browning. In addition, polyphenols and flavonoids, apart from anthocyanins, would also migrate towards the inner peel surface reaching the cell skin and leading to browning by PPO enzyme which has a high activity in peel tissues [46]. On the other hand, it should be added that the peel of the cultivars more sensitive to cold damage showed a greater electrolyte leakage at the time of harvest, which would facilitate the enzymatic browning reactions of phenolics coming from the arils by peel polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), or anthocyanase [47].



4. Conclusions

From the obtained results we can conclude that there is great variability in the sensitivity to the appearance of CI among the different cultivars of pomegranates. 'Kingdom' cultivar showed the highest CI index while the least sensitive was 'Mollar de Elche'. This variability is not only due to changes in cell membrane permeability, but also to the solute content in the vacuoles (anthocyanins, sugars, and organic acids, in particular citric acid) which can migrate to the inner surface of the peel causing browning reactions. In other words, cultivars with a high content of organic acids, sugars, and anthocyanins in their arils, a low ratio of Ca/K in their peel, and high membrane permeability at harvest would be the most susceptible to CI damage during storage.

Author Contributions: Conceptualization, D.M.-R., D.V. and M.S.; methodology, J.M.L.-M., A.C.-A. and F.G.; software, J.M.L.-M. and A.C.-A.; validation, D.M.-R., D.V. and M.S.; formal analysis, D.M.-R., F.G., M.S. and D.V.; investigation, D.M.-R., F.G., J.M.L.-M.; A.C.-A., D.V. and M.S.; resources, D.V. and M.S.; data curation, D.M.-R.; writing—original draft preparation, D.M.-R.; writing—review and editing, D.V. and M.S.; visualization, D.M.-R. and M.S.; supervision, D.M.-R., D.V., F.G. and M.S.; project administration, D.V. and M.S.; funding acquisition, D.V. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the RTI2018-09966-B-100 Project and the European Commission with FEDER funds and the Generalitat Valenciana through the PROMETEO2021/NAC/00075 project. The ICP-MS equipment (Shi-madzu icpms-2030) was founded by the aid EQC2018-004170-P financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and FEDER funds.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: The authors thank the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and Miguel Hernández University for the PhD-scholarships of Carrión-Antolí and Lorente-Mento, respectively and to Ildefonso Riquelme for providing fruit samples for the experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Melgarejo, P.; Melgarejo-Sánchez, P.; Martínez, J.J.; Hernández, F.; Legua, P.; Martínez, R. The pomegranate tree in the world: New cultivars and uses. *Acta Hort.* **2013**, *1089*, 327–332.
- Pareek, S.; Valero, D.; Serrano, M. Postharvest biology and technology of pomegranate. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 2360–2379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lorente-Mento, J.M.; Guillén, F.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Valverde, J.M.; Valero, D.; Serrano, M. Melatonin treatment to pomegranate trees enhances fruit bioactive compounds and quality traits at harvest and during postharvest storage. *Antioxidants* **2021**, *10*, 820. [[CrossRef](#)]
- Tinebra, I.; Scuderi, D.; Sortino, G.; Mazzaglia, A.; Farina, V. Pomegranate cultivation in mediterranean climate: Plant adaptation and fruit quality of 'mollar de elche' and 'wonderful' cultivars. *Agronomy* **2021**, *11*, 156. [[CrossRef](#)]
- Passafiume, R.; Perrone, A.; Sortino, G.; Gianguzzi, G.; Saletta, F.; Gentile, C.; Farina, V. Chemical-physical characteristics, polyphenolic content and total antioxidant activity of three Italian-grown pomegranate cultivars. *NFS J.* **2019**, *16*, 9–14. [[CrossRef](#)]
- Kashash, Y.; Doron-Faigenboim, A.; Bar-Ya'akov, I.; Hatib, K.; Beja, R.; Trainin, T.; Holland, D.; Porat, R. Diversity among pomegranate varieties in chilling tolerance and transcriptome responses to cold storage. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *67*, 760–771. [[CrossRef](#)]
- Kashash, Y.; Mayuoni-Kirshenbaum, L.; Goldenberg, L.; Choi, H.J.; Porat, R. Effects of harvest date and low-temperature conditioning on chilling tolerance of 'Wonderful' pomegranate fruit. *Sci. Hort.* **2016**, *209*, 286–292. [[CrossRef](#)]
- García-Pastor, M.E.; Serrano, M.; Guillén, F.; Zapata, P.J.; Valero, D. 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 Biol. Technol.* **2020**, *167*, 111226. [[CrossRef](#)]
- Mirdehghan, S.H.; Rahemi, M.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Valverde, J.M.; Zapata, P.J.; Serrano, M.; Valero, D. Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: Role of polyamines. *Postharvest Biol. Technol.* **2019**, *44*, 19–25. [[CrossRef](#)]
- Nazoori, F.; Mollai, S.; Sobhani, F.; Mirdehghan, S.H.; Sahhafi, S.R. Carboxymethyl cellulose and carnauba wax treatments kept the pomegranate fruit (*Punica granatum* L.) quality during cold storage via improving enzymatic defense system and bioactive compounds. *Sci. Hort.* **2023**, *309*, 111645. [[CrossRef](#)]
- Artés, F.; Villaescusa, R.; Tudela, J.A. Modified atmosphere packaging of pomegranate. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 1112–1116. [[CrossRef](#)]



12. Sayyari, M.; Castillo, S.; Valero, D.; Díaz-Mula, H.M.; Serrano, M. Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biol. Technol.* **2011**, *60*, 136–142. [[CrossRef](#)]
13. El-Beltagi, H.S.; Al-Otaibi, H.H.; Ali, M.R. A new approach for extending shelf-life of pomegranate arils with combined application of salicylic acid and methyl jasmonate. *Hortic.* **2023**, *9*, 225. [[CrossRef](#)]
14. Nian, Y.; Wang, N.; Li, R.; Shao, Y.; Li, W. Cold shock treatment alleviates chilling injury in papaya fruit during storage by improving antioxidant capacity and related gene expression. *Sci. Hortic.* **2022**, *294*, 110784. [[CrossRef](#)]
15. Kashash, Y.; Holland, D.; Porat, R. Molecular mechanisms involved in postharvest chilling tolerance of pomegranate fruit. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 5617–5623. [[CrossRef](#)]
16. Rey, F.; Zacarías, L.; Rodrigo, M.J. Carotenoids, vitamin C, and antioxidant capacity in the peel of mandarin fruit in relation to the susceptibility to chilling injury during postharvest cold storage. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1296. [[CrossRef](#)]
17. Nukuntornprakit, O.A.; Chanjirakul, K.; van Doorn, W.G.; Siriphanich, J. Chilling injury in pineapple fruit: Fatty acid composition and antioxidant metabolism. *Postharvest Biol. Technol.* **2015**, *99*, 20–26. [[CrossRef](#)]
18. Gomez, P.; Ferrer, M.Á.; Fernández-Trujillo, J.P.; Calderón, A.; Artés, F.; Egea-Cortines, M.; Weiss, J. Structural changes, chemical composition and antioxidant activity of cherry tomato fruits (cv. Micro-Tom) stored under optimal and chilling conditions. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 1543–1551. [[CrossRef](#)]
19. Jannatizadeh, A. Exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in pomegranate fruit during cold storage. *Sci. Hortic.* **2019**, *246*, 544–549. [[CrossRef](#)]
20. Garcia-Pastor, M.E.; Giménez, M.J.; Valverde, J.M.; Guillén, F.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Serrano, M.; Valero, D.; Zapata, P.J. Preharvest application of oxalic acid improved pomegranate fruit yield, quality, and bioactive compounds at harvest in a concentration-dependent manner. *Agronomy* **2020**, *10*, 1522. [[CrossRef](#)]
21. Miguel, G.; Fontes, C.; Antunes, D.; Neves, A.; Martins, D. Anthocyanin concentration of “Assaria” pomegranate fruits during different cold storage conditions. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *2004*, 338–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Liu, Q.; Guo, X.; Du, J.; Guo, Y.; Guo, X.; Kou, L. Comparative analysis of husk microstructure, fruit quality and concentrations of bioactive compounds of different pomegranate cultivars during low temperature storage. *Food Biosci.* **2023**, *52*, 102400. [[CrossRef](#)]
23. Lufu, R.; Ambaw, A.; Opara, U.L. Determination of moisture loss of pomegranate cultivars under cold and shelf storage conditions and control strategies. *Sustain. Food Technol.* **2023**, *1*, 79–91. [[CrossRef](#)]
24. Mirdehghan, S.H.; Rahemi, M.; Serrano, M.; Guillén, F.; Martínez-Romero, D.; Valero, D. The application of polyamines by pressure or immersion as a tool to maintain functional properties in stored pomegranate arils. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 755–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tezcan, F.; Gültekin-Özgülven, M.; Diken, T.; Özçelik, B.; Erim, F.B. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem.* **2009**, *115*, 873–877. [[CrossRef](#)]
26. Bustamante, C.A.; Monti, L.L.; Gabilondo, J.; Scossa, F.; Valentini, G.; Budde, C.O.; Lara, M.V.; Fermie, A.R.; Drincovich, M.F. Differential metabolic rearrangements after cold storage are correlated with chilling injury resistance of peach fruits. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sevillano, L.; Sanchez-Ballesta, M.T.; Romojaro, F.; Flores, F.B. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 555–573. [[CrossRef](#)]
28. Fawole, O.A.; Atukuri, J.; Arendse, E.; Opara, U.O. Postharvest physiological responses of pomegranate fruit (cv. Wonderful) to exogenous putrescine treatment and effects on physico-chemical and phytochemical properties. *Food Sci. Hum. Wellness.* **2020**, *9*, 146–161. [[CrossRef](#)]
29. Ramezani, A.; Rahemi, M.; Maftoun, M.; Bahman, K.; Eshghi, S.; Safizadeh, M.R.; Tavallali, V. The ameliorative effects of spermidine and calcium chloride on chilling injury in pomegranate fruits after long-term storage. *Fruits* **2010**, *65*, 169–178. [[CrossRef](#)]
30. Huang, X.Y.; Wang, C.K.; Zhao, Y.W.; Sun, C.H.; Hu, D.G. Mechanisms and regulation of organic acid accumulation in plant vacuoles. *Hortic. Res.* **2021**, *8*, 227. [[CrossRef](#)]
31. Vallarino, J.G.; Osorio, S. Organic acids. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*; Yahia, E.M., Carrillo-Lopez, A., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 207–224.
32. Shiratake, K.; Martinoia, E. Transporters in fruit vacuoles. *Plant Biotech.* **2007**, *24*, 127–133. [[CrossRef](#)]
33. Cui, S.M.; Sasada, Y.; Sato, H.; Nii, N. Cell structure and sugar and acid contents in the arils of developing pomegranate fruit. *Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **2004**, *73*, 241–243. [[CrossRef](#)]
34. Serna-Escolano, V.; Giménez, M.J.; Castillo, S.; Valverde, J.M.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Serrano, M.; Valero, D.; Zapata, P.J. Preharvest treatment with oxalic acid improves postharvest storage of lemon fruit by stimulation of the antioxidant system and phenolic content. *Antioxidants* **2021**, *10*, 963. [[CrossRef](#)]
35. Sayyari, M.; Valero, D.; Babalar, M.; Kalantari, S.; Zapata, P.J.; Serrano, M. Prestorage oxalic acid treatment maintained visual quality, bioactive compounds, and antioxidant potential of pomegranate after long-term storage at 2 °C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6804–6808. [[CrossRef](#)]
36. Zhang, W.; Jiang, H.; Cao, J.; Jiang, W. Advances in biochemical mechanisms and control technologies to treat chilling injury in postharvest fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *113*, 355–365. [[CrossRef](#)]



37. Ramírez-Gil, J.G.; Henao-Rojas, J.C.; Morales-Osorio, J.G. Postharvest diseases and disorders in avocado cv. Hass and their relationship to preharvest management practices. *Heliyon* **2021**, *7*, e05905. [[CrossRef](#)]
38. Ferguson, I.B.; Watkins, C.B. Crop load affects mineral concentrations and incidence of bitter pit in Cox's Orange Pippin' apple fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1992**, *117*, 373–376. [[CrossRef](#)]
39. Yamane, T.; Hayama, H.; Mitani, N.; Inoue, H.; Kusaba, S. Contribution of several fruit quality factors and mineral elements to water-soaked brown flesh disorder in peaches. *Sci. Hortic.* **2020**, *272*, 109523. [[CrossRef](#)]
40. Itai, A. Watercore in fruits. In *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants*; Kochetov, A., Ed.; Springer: Tokyo, Japan, 2015; pp. 127–145.
41. Doryanizadeh, M.; Ghasemnezhad, M.; Sabouri, A. Estimation of postharvest quality of "Red Delicious" apple fruits based on fruit nutrient elements composition. *J. Agric. Sci.* **2017**, *9*, 164–173. [[CrossRef](#)]
42. Everett, K.R.; Boyd, L.M.; Pak, H.A.; Cutting, J.G.M. Calcium, fungicide sprays and canopy density influence postharvest rots of avocado. *Australas. Plant Pathol.* **2007**, *36*, 22–31. [[CrossRef](#)]
43. Wang, Y.; Zhang, X.; Wang, Y.; Yang, S.; Qu, H. The changes of intracellular calcium concentration and distribution in the hard end pear (*Pyrus pyrifolia* cv. 'Whangkeumbae') fruit. *Cell Calcium.* **2018**, *71*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. De Freitas, S.T.; Mitcham, E.J. Factors involved in fruit calcium deficiency disorders. In *Horticultural Reviews*; Janick, J., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2012; Volume 40, pp. 107–146.
45. Molla, S.M.H.; Rastegar, S.; Omran, V.G.; Khademi, O. Ameliorative effect of melatonin against storage chilling injury in pomegranate husk and arils through promoting the antioxidant system. *Sci. Hortic.* **2022**, *295*, 110889. [[CrossRef](#)]
46. Mishra, V.; Kaplan, Y.; Ginzberg, I. Mitigating chilling injury of pomegranate fruit skin. *Sci. Hortic.* **2022**, *304*, 111329. [[CrossRef](#)]
47. Jiang, Y.; Duan, X.; Joyce, D.; Zhang, Z.; Li, J. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chem.* **2004**, *88*, 443–446. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



4.2 Publicación II

Melatonin Treatment to Pomegranate Trees Enhances Fruit Bioactive Compounds and Quality Traits at Harvest and during Postharvest Storage

José M. Lorente-Mento, Fabián Guillén, Salvador Castillo, Domingo Martínez-Romero, Juan M. Valverde, Daniel Valero, y María Serrano.

Antioxidants, 10(5), 820 (2021)

<https://doi.org/10.3390/antiox10060820>





Article

Melatonin Treatment to Pomegranate Trees Enhances Fruit Bioactive Compounds and Quality Traits at Harvest and during Postharvest Storage

José M. Lorente-Mento ¹, Fabián Guillén ², Salvador Castillo ², Domingo Martínez-Romero ²,
Juan M. Valverde ², Daniel Valero ² and María Serrano ^{1,*}

¹ Department of Applied Biology, EPSO, University Miguel Hernández. Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain; jlorente@umh.es

² Department of Food Technology, EPSO, University Miguel Hernández. Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain; fabian.guillen@umh.es (F.G.); scastillo@umh.es (S.C.); dmromero@umh.es (D.M.-R.); jm.valverde@umh.es (J.M.V.); daniel.valero@umh.es (D.V.)

* Correspondence: m.serrano@umh.es; Tel.: +34-96-674-9616



Citation: Lorente-Mento, J.M.; Guillén, F.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Valverde, J.M.; Valero, D.; Serrano, M. Melatonin Treatment to Pomegranate Trees Enhances Fruit Bioactive Compounds and Quality Traits at Harvest and during Postharvest Storage. *Antioxidants* **2021**, *10*, 820. <https://doi.org/10.3390/antiox10060820>

Academic Editor:
Alessandra Napolitano

Received: 16 April 2021
Accepted: 18 May 2021
Published: 21 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The effect of melatonin pomegranate tree treatments on fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity at harvest and during storage at 10 °C for 60 days was assayed in two consecutive years, 2019 and 2020. In the first year, trees were treated with 0.1, 0.3 and 0.5 mM of melatonin along the developmental fruit growth cycle, and results showed that bioactive compounds (total phenolics and total and individual anthocyanins) and antioxidant activity at harvest were higher in fruits from melatonin-treated trees than in controls. Other fruit quality parameters, such as firmness, total soluble solids and aril red colour, were also increased as a consequence of melatonin treatment. In fruit from control trees, firmness and acidity levels decreased during storage, while increases occurred on total soluble solids, leading to fruit quality reductions. These changes were delayed, and even maintenance of total acidity was observed, in fruit from melatonin-treated trees with respect to controls, resulting in a fruit shelf-life increase. Moreover, concentration of phenolics and anthocyanins and antioxidant activity were maintained at higher levels in treated than in control fruits during the whole storage period. In general, all the mentioned effects were found at the highest level with the 0.1 mM melatonin dose, and then it was selected for repeating the experiment in the second year and results of the first year were confirmed. Thus, 0.1 mM melatonin treatment could be a useful tool to enhance aril content on bioactive compounds with antioxidant activity and health beneficial effects and to improve quality traits of pomegranate fruit, at harvest and during postharvest storage.

Keywords: *Punica granatum* L.; antioxidants; anthocyanins; phenolics; firmness; colour

1. Introduction

Pomegranate is an ancient edible fruit, originated in the Middle East area nowadays occupied by Iran and Afghanistan, and from this area, it was spread to other countries. Spain is the major producer and exporting country of pomegranate fruit in the European Union, with a cultivated area of 5716 ha and a production of 75,673 t in 2018 [1]. Arils are the edible portion of pomegranate fruit, which consist of around 70–80% juice and 30–20% seed, depending on cultivar. Aril colour, sugar and acid content and the presence of small and soft seeds, together with fruit size and external appearance, are the main attributes responsible for fruit quality [2,3]. In addition, pomegranate was considered, from ancient times, to have medicinal properties to treat heart pain, leucorrhoea, sterility, lung diseases, febrifuge or cholera, as reported by Hippocrates in the 4th century B.C. [3]. These and other health beneficial effects against several diseases, such as atherosclerosis, inflammatory and infective-mediated diseases, Alzheimer, diabetes, infarct brain ischemia



and several types of cancer, have been scientifically proven recently and attributed to its content of anthocyanins and other phenolic compounds [4–10]. Anthocyanins are the pigments responsible for skin and aril colour and in both tissues, increases occur during maturation [11]. The major anthocyanins in arils are cyanidin 3-glucoside (cyn 3-gluc) and delphinidin 3-glucoside (delp 3-gluc), followed by delphinidin 3,5-diglucoside (delp 3,5-di-gluc), cyaniding 3,5-di-glucoside (cyn 3,5-di-gluc) or pelargonidin 3-glucoside (pelg 3-gluc), depending on cultivar [11–13]. On the contrary, aril total phenolic concentration decreases abruptly in the initial stages of fruit development, and thereafter, the decrease is very small [11,12]. However, phenolic concentration in mature fruit, as well as anthocyanin concentration, is different depending on cultivar [11,12,14–16].

‘Mollar de Elche’ is the most cultivated pomegranate cultivar in Spain, which is very appreciated by consumers since its arils have high concentration of sugars, low acidity and small and soft seeds that can be easily eaten [17,18]. However, the anthocyanin content in skin and flesh of ‘Mollar de Elche’ cultivar is not high as compared with other worldwide-known cultivars, such as ‘Wonderful’, and its arils are slightly red-coloured and the skin has a cream-pink colour [2,19,20]. This low colouration of skin and arils makes it difficult for this cultivar to reach international markets. Research has been performed in the last years, aimed to solve this problem. Thus, water restrictions applied in summer, during the linear phase of fruit growth, have been reported to increase aril anthocyanin content [21]. Similar effects have been reported by treatments with methyl jasmonate [13] or salicylates [16] during on-tree pomegranate fruit development. On the other hand, pomegranate exhibits important quality losses during postharvest storage. The most important changes are fruit water and firmness losses and reduction in aril acidity, which lead to reduction of fruit acceptability in terms of freshness, juiciness and taste [2,3].

Melatonin was identified in 1995 in angiosperms plant species, and nowadays, it is considered as a plant growth regulator with effects in a wide range of plant physiological processes, including alleviation of the oxidative damages caused by different biotic and abiotic stresses and root and seed development [22,23]. In addition, recent reports have shown a role of melatonin on fruit ripening, although most of them have been focused on postharvest treatments [24,25]. Thus, 0.5 mM melatonin dipping treatment for 1 h delayed the ripening process in ‘Guifei’ mangoes throughout inhibition of ethylene and ABA biosynthesis [26]. Accordingly, melatonin postharvest treatment inhibited ethylene production and delayed ripening in banana fruit [27], which were dose-dependent in the range of 0.05 to 0.5 mM. Similar results have been reported in peaches and nectarines [28,29]. In tomato fruit, postharvest treatment with melatonin at 50 μ M increased anthocyanin content. This effect was positively correlated to fruit ripening but negatively related to fruit senescence, since the proteins related with senescence were downregulated while anti-senescent proteins, such as catalase and peroxidase, increased in treated fruit [30]. However, postharvest fruit treatments have legal restrictions and consumers’ concerns. Thus, research about preharvest treatments with effect on fruit quality properties at harvest and during storage is needed.

In this sense, the effect of melatonin applied as preharvest treatment on fruit ripening process and quality traits has been evaluated in very few papers, showing different effects depending on fruit species, concentration, or application time. Thus, 0.1 and 0.01 mM of melatonin applied at pit-hardening inhibited ripening in sweet cherry fruits [31]. On the contrary, irrigation of tomato plant with 0.1 mM of melatonin increased sugar content and lycopene concentration in fruits, showing a positive effect on fruit ripening [32]. In apricot, foliar spray melatonin treatment increased yield and fruit weight, although no effect on on-tree ripening was observed [33]. In addition, increased apricot quality parameters at harvest and maintenance during storage have been found as a consequence of melatonin tree treatment during fruit development [34]. However, to the best of our knowledge, no literature is available regarding the effect of preharvest melatonin treatment of pomegranate trees on fruit quality properties at harvest and during storage, which has been the main



objective of this paper, with special interest in bioactive compounds, such as anthocyanins and phenolics, and antioxidant activity.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Experimental Design

Pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Mollar de Elche) trees, 12 and 13 years-old, were used for 2019 and 2020 experiments respectively, grown in the same commercial plot located at Elche (Alicante, Spain) and under similar agronomic practices for both years. Climatic conditions in the crop field (UTMX: 694,006.000 UTM Y: 4,234,860.000) were: a semi-arid Mediterranean climate, with mean annual temperatures of 18.90 and 19.52 °C for 2019 and 2020, respectively; maximum temperatures in summer, from June to September, of 30.35 and 32.23 for 2019 and 2020, respectively; an accumulated rainfall of 285.43 and 233.37 mm for 2019 and 2020, respectively. In 2019, 3 blocks of 3 trees were selected for each treatment: control (distilled water) and melatonin (purchased from Sigma, Sigma-Aldrich, Madrid) at 0.1, 0.3 and 0.5 mM. These concentrations were chosen according to previous reports in which the effect of melatonin, applied as preharvest treatment, on quality properties of other fruit species was assayed [31–34]. Two litres per tree of freshly prepared solutions (containing 0.1% Tween 20) were applied to pomegranate trees with a mechanical mist sprayer, which was enough to wet the entire tree canopy. Five treatments were applied during the fruit growth cycle (30, 60, 90, 105 and 120 days after full blossom: T1, T2, T3, T4 and T5), with the last treatment being applied 3 days before harvesting. Fruit were harvested at commercial maturity stage, based on the characteristic fruit size, skin colour and soluble solids content (14–15 °Brix) of this cultivar. From each treatment and replicate, 15 pomegranate fruit, homogeneous in size and colour and without visual defects, were selected, grouped at random in lots of 5 fruits and transported to the laboratory in 2 h for storage at 10 °C and 80% RH. After 0, 30 and 60 days, one lot of each treatment and replicate was taken at random and used for the following analytical measures: firmness of the whole fruit, skin colour and colour, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), total phenolics and anthocyanins, individual anthocyanins and hydrophilic total antioxidant activity (H-TAA) in the arils. In 2020, the 0.1 mM concentration was chosen, since it gave the best results in terms of fruit quality parameters and content on bioactive compounds. Treatments were performed on 3 replicates of 3 trees which were different from those used in the 2019 experiment but grown in the same commercial plot. Treatments and storage conditions were similar to 2019, although samples during storage were taken at shorter intervals, after 0, 15, 30, 45 and 60 days of storage. Thus, from each treatment and replicate, 25 pomegranate fruit were selected, grouped in lots of five fruit, and one lot from each replicate and treatment was taken for each sampling date during storage for analytical measures.

2.2. Fruit Quality Parameters

Fruit firmness was determined in each individual fruit of each replicate by using a TX-XT2i Texture Analyser (Stable Microsystems, Godalming, UK) interfaced to a personal computer. A flat steel plate was mounted on the machine which measured the fruit equatorial diameter and applied a force that achieved a 5% deformation of the fruit diameter. Firmness results were expressed as the force-deformation ratio (N mm^{-1}). Skin colour was measured on three points of the equatorial fruit perimeter by using a Minolta colorimeter (CRC200, Minolta Camera Co., Kantō, Tokio, Japan) and colour was expressed as Hue ($\arctg \frac{b^*}{a^*}$) according the CIELab coordinates. Pomegranate fruit were cut in two halves, and again, three colour readings were taken in the arils of each fruit to measure internal colour as Hue. Arils from the five fruit of each replicate and treatment were taken and combined to obtain a homogeneous sample in which the following parameters were measured. About 50 g of arils were squeezed through a cotton cloth and the juice used to quantify TSS and TA in duplicate. TSS was determined by using a digital refractometer, Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan), at 20 °C, and expressed as g kg^{-1} . One mL of the juice was diluted



in 25 mL of distilled H₂O and used to measure titratable acidity (TA) by automatic titration (785 DMP Titrino, Metrohm) with 0.1 N NaOH up to pH 8.1, and results were expressed as g kg⁻¹ malic acid equivalent.

2.3. Total Phenolics and Total and Individual Anthocyanins Quantification

To perform phenolic extraction, 5 g of arils from each replicate were homogenised with 10 mL of water:methanol (2:8) containing 2 mM NaF (to inactivate polyphenol oxidase activity and prevent phenolic degradation) for 30 s in a homogeniser (Ultraturrax, T18 basic, IKA, Berlin, Germany). The extracts were centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min at 4 °C and the supernatant was used to quantify, in duplicate, total phenolic content using the Folin–Ciocalteu reagent, as described by García-Pastor et al. [13]. Results were expressed as mg gallic acid equivalent kg⁻¹. Anthocyanins were extracted by homogenising 5 g of arils from each replicate with 15 mL of methanol/formic acid/water (25:1:24, *v/v/v*) and then, the extracts were centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min at 4 °C. Total anthocyanin concentration was determined, in duplicate, in the supernatant by reading absorbance at 520 nm, as previously reported [13], and results were expressed as mg kg⁻¹ of cyanidin 3-glucoside equivalent (cyn 3-glu, molar absorption coefficient of 26,900 L cm⁻¹ mol⁻¹ and molecular weight of 449.2 g mol⁻¹). For individual anthocyanin quantification, these extracts were filtered through a 0.45 μm PVDF filter (Millex HV13, Millipore, Bedford, MA, USA), and then, two samples of 20 μL of each extract were injected into an HPLC system (Agilent HPLC 1200 Infinity series) working with the chromatographic conditions previously reported [16]. Chromatograms were recorded at 520 nm and quantification was performed by using calibration curves carried out with cyanidin 3-*O*-glucoside (cyn 3-glu), cyanidin 3,5-*O*-di-glucoside (cyn 3,5-*O*-di-glu), pelargonidin 3-*O*-glucoside (plg 3-glu) and delphinidin 3-*O*-glucoside (dlp 3-glu), purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Results were expressed as mg kg⁻¹.

Hydrophilic total antioxidant activity (H-TAA) was quantified according to Serano et al. [35]. Briefly, 5 g of arils from each sample were homogenised in 10 mL of 50 mM phosphate buffer, pH = 7.8, and centrifuged at 15,000 × *g* for 15 min at 4 °C. The supernatant was used for H-TAA determination by using the enzymatic system composed of 2,20-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), horse radish peroxidase enzyme (HRP) and hydrogen peroxide as its oxidant substrate, in which ABTS⁺ radicals are generated and monitored at 730 nm. The decrease in absorbance after 60 s of adding the pomegranate extract was calculated and used to quantify H-TAA by comparison with a calibration curve performed with trolox ((R)-(+)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-croman-2-carboxylic acid) (0–20 nmol) from Sigma (Madrid, Spain), and results are expressed as mg kg⁻¹ trolox equivalent (TE).

2.4. Statistical Analyses

For both experimental years, a factorial design with melatonin treatments and storage time with triplicate samples (*n* = 3) was performed. Analysis of variance (ANOVA) was performed by using the SPSS software version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and means were compared by Tukey's test. Differences at *p* < 0.05 were considered significant. Data are represented as means ± standard error (SE).

3. Results

3.1. Effect of Preharvest Melatonin Treatment on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity

Anthocyanin concentration in fruit from control trees at harvest, in the 2019 experiment, was 95.2 ± 7.1 mg kg⁻¹, and significantly higher (*p* < 0.05) in the arils of pomegranates from melatonin-treated trees, at 150–170 mg kg⁻¹. An increase in total anthocyanin content was found in arils of all pomegranate fruit during the first 30 days of storage and a decreasing trend was observed thereafter. However, total anthocyanin concentration was maintained at higher levels in arils of pomegranates from treated trees during the whole storage period, with the highest concentration being found for 0.1 mM



melatonin treatment (Figure 1A). Similar trends in total anthocyanin concentration were observed in the 2020 experiment, although significantly higher ($p < 0.05$) values were found in arils of pomegranate from melatonin-treated trees than in controls, at harvest and during storage (Figure 1B). Four individual anthocyanins were identified and quantified, at harvest, in pomegranate arils in 2019 and 2020 experiments, and similar profile was found in fruits from control and treated trees, the major anthocyanin being cyn 3-gluc, followed by dlp 3-gluc, cyn 3,5-di-gluc and plg 3-gluc (Figure 2). Concentrations of these anthocyanins were significantly ($p < 0.05$) enhanced by preharvest melatonin treatments, and in general, the major effect was observed for the 0.1 mM dose in the 2019 experiment, with 1.7-, 1.2-, 2.4- and 1.9-fold increases for cyn 3-gluc, dlp 3-gluc, cyn 3,5-di-gluc and plg 3-gluc, respectively (Figure 2A). However, for dlp 3-gluc, the highest increase was recorded for the 0.3 mM dose. These increases on individual anthocyanin concentrations at harvest as a consequence of preharvest melatonin treatments were confirmed in the 2020 experiment, in which a 0.1 mM dose was applied (Figure 2B).

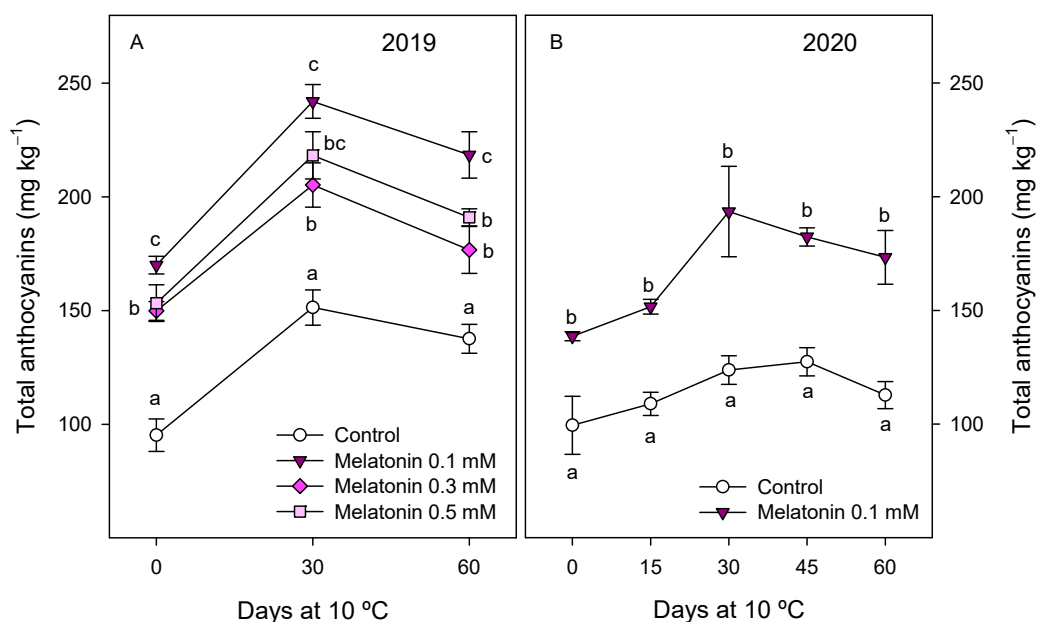


Figure 1. Total anthocyanin concentration in arils of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees during storage at 10 °C in 2019 (A) and 2020 (B) experiments. Data are the mean \pm SE. Different letters (a-c) show significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date.

Total phenolic concentration at harvest in the 2019 experiment was $522.2 \pm 17.8 \text{ mg kg}^{-1}$ in arils of pomegranate from control trees and significantly higher ($p < 0.05$), ca. 650 mg kg^{-1} , in those from melatonin-treated trees, without significant differences among doses. During storage, aril phenolic concentration increased irrespective of treatment, although significantly higher levels were maintained in fruit from melatonin-treated trees with respect to controls (Figure 3A). Similar effects of melatonin preharvest treatments on both phenolic concentration and behaviour during storage were found in the 2020 experiment when the 0.1 mM dose was used (Figure 3B).

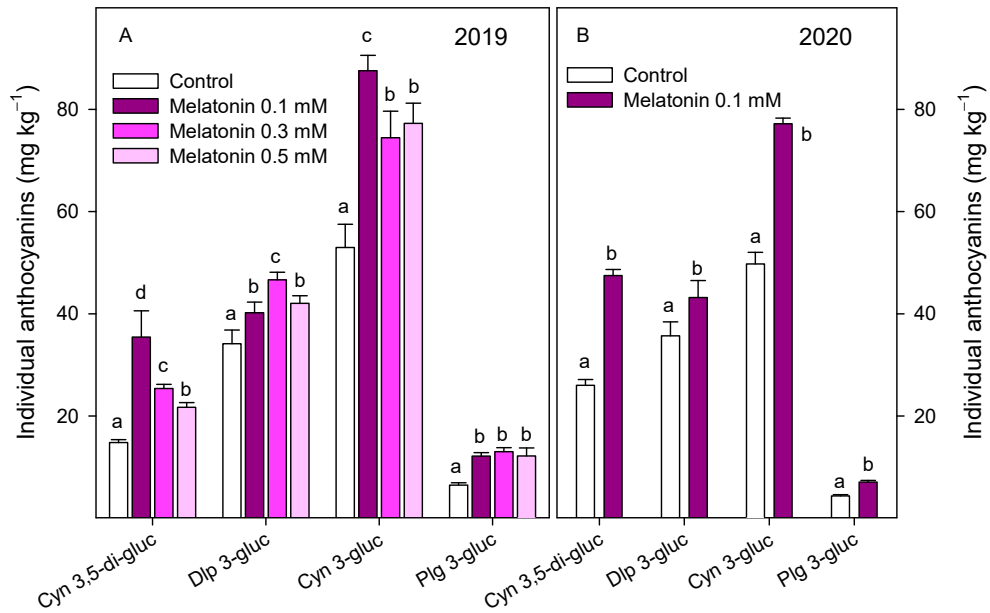


Figure 2. Individual anthocyanin concentration in arils of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees at harvest in 2019 (A) and 2020 (B) experiments. Data are the mean \pm SE. Different letters (a–c) show significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each individual anthocyanin.

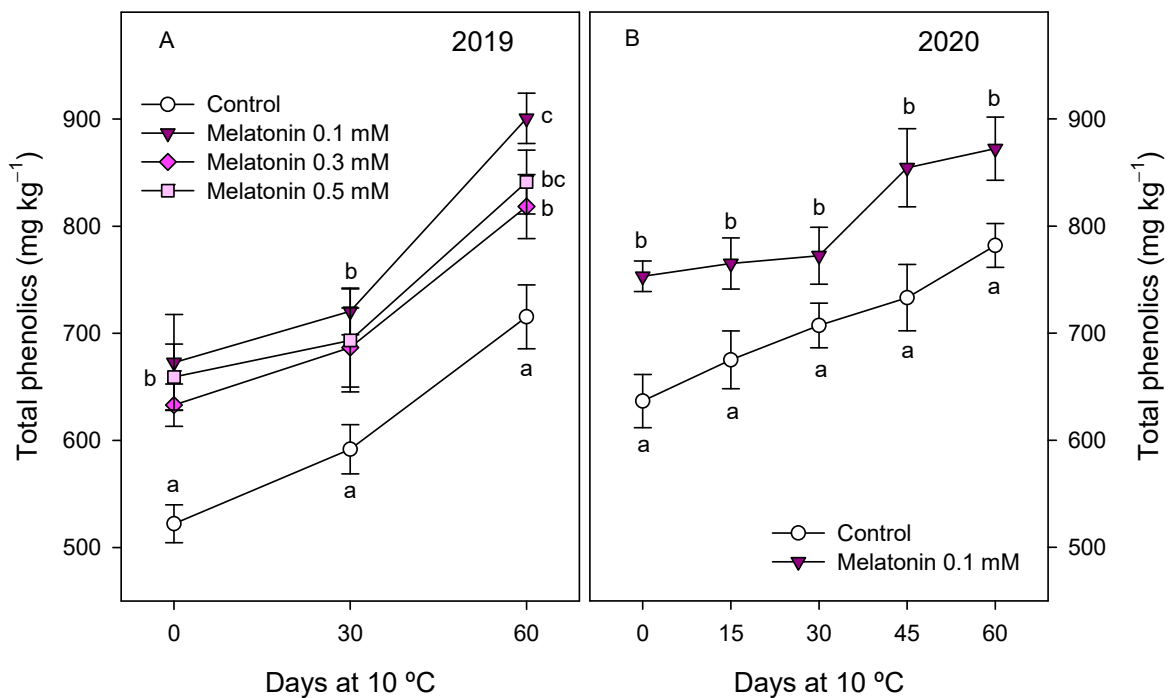


Figure 3. Total phenolic concentration in arils of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees during storage at 10 °C in 2019 (A) and 2020 (B) experiments. Data are the mean \pm SE. Different letters (a–c) show significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date.



H-TAA at harvest was significantly higher ($p < 0.05$) in arils of pomegranate from melatonin-treated trees than in controls, with these increases being ca. 20% for the 0.1 mM dose and ca. 10–12% for the 0.3 and 0.5 mM doses in the 2019 experiment (Figure 4A). Enhanced H-TAA at harvest was also obtained in the 2020 experiment as a consequence of 0.1 mM melatonin treatment (Figure 4B). These values of H-TAA were maintained without significant changes during the first 30 days of storage in arils of pomegranates from control and treated trees, and decreased thereafter, in the 2019 and 2020 experiments (Figure 4). However, it is worth mentioning that higher levels of H-TAA were found for all melatonin treatments in the 2019 experiment (ca. 20% for 0.1 mM melatonin treatment) with respect to controls during the whole storage period (Figure 4A). H-TAA was also enhanced at harvest and maintained at highest levels during storage in fruits from 0.1 mM melatonin-treated trees with respect to controls in the 2020 experiment (Figure 4B).

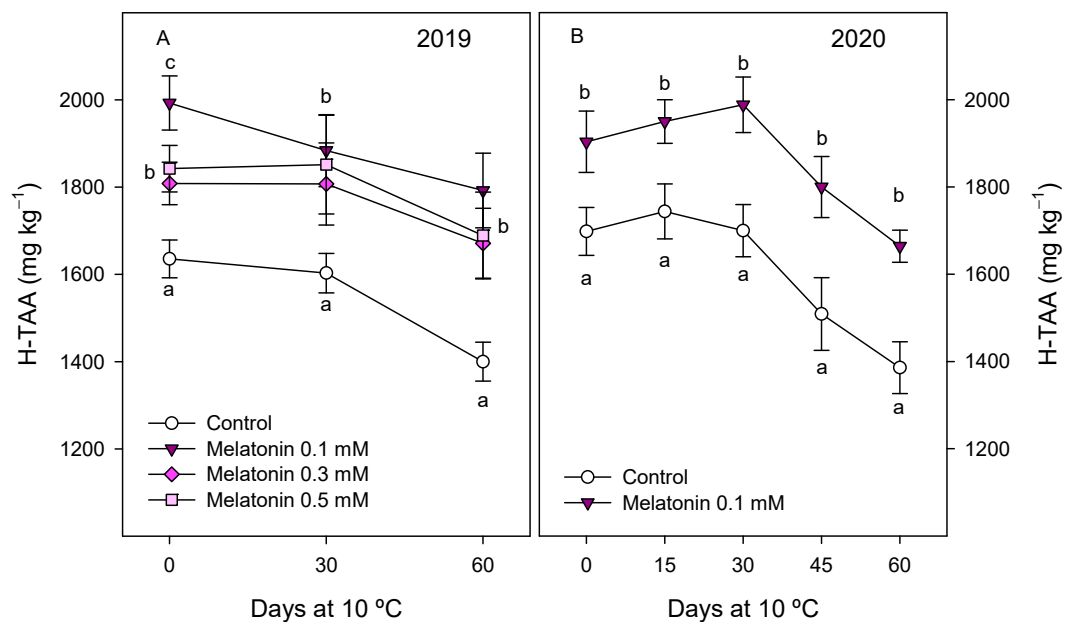


Figure 4. Hydrophilic total antioxidant activity (H-TAA) in arils of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees during storage at 10 °C in 2019 (A) and 2020 (B) experiments. Data are the mean \pm SE. Different letters (a–c) show significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date.

3.2. Effect of Melatonin Treatment on Quality Parameters during Storage

Quality parameters of pomegranate fruit, such as external and internal colour, firmness, TSS and TA, were also affected by melatonin treatments. Thus, skin colour at harvest, expressed as Hue angle, was significantly lower ($p < 0.05$) in fruit from 0.1 mM melatonin-treated trees than in controls in both years, while no significant effect was observed for the 0.3 and 0.5 mM doses (Supplementary Figure S1). However, aril colour was affected by all the melatonin assayed doses, with values of Hue angle at harvest of 45.21 ± 2.38 in fruit from control trees and significantly lower ($p < 0.05$), from 35 to 38, in those from treated trees, without significant differences among melatonin-applied doses (Figure 5A). Lower values of Hue angle in both skin and arils, as a consequence of melatonin treatments, mean a more intense red colour. These results were also observed in the 2020 experiment, that is, significantly lower ($p < 0.05$) Hue values in skin and arils in fruit from treated trees than in controls (Supplementary Figure S1B and Figure 5B). Fruit firmness at harvest was significantly higher ($p < 0.05$), ca. 20%, in fruit from 0.1 and 0.3 mM melatonin-treated trees with respect to controls in 2019, and decreases were observed during storage, especially for



the first 30 days, although it is worth noting that firmness values were maintained at higher levels in melatonin-treated fruit during the whole storage period (Figure 6A). Accordingly, in the 2020 experiment, significantly higher ($p < 0.05$) values of firmness were obtained in fruit from melatonin-treated trees than in controls, and these differences were evident during the whole storage period (Figure 6B).

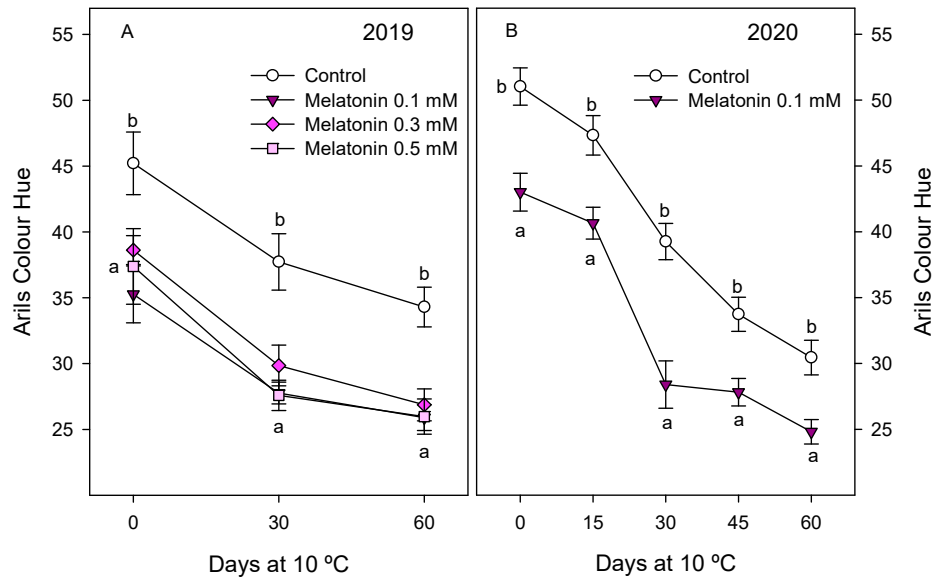


Figure 5. Colour Hue in the arils of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees during storage at 10 °C in 2019 (A) and 2020 (B) experiments. Data are the mean \pm SE. Different letters (a,b) show significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date.

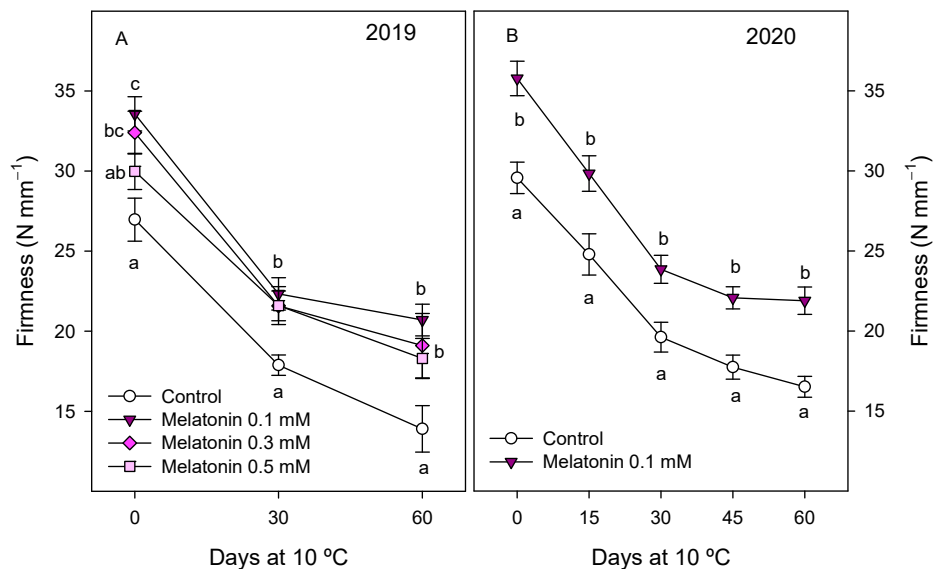


Figure 6. Firmness of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees during storage at 10 °C in 2019 (A) and 2020 (B) experiments. Data are the mean \pm SE. Different letters (a–c) show significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date.



TSS content was 145 and 148 in control fruit in 2019 and 2020 experiments respectively, and 5% higher in fruit from 0.1 mM melatonin-treated trees (in both years), while no significant effect was found in 0.3 and 0.5 mM treatments in 2019. During storage, increase trends in TSS were observed for control and treated fruit, although significantly higher ($p < 0.05$) levels in 0.1 mM melatonin-treated fruit than in controls were evident until the last sampling date (Supplementary Figure S2) for 2019 and 2020 experiments. On the contrary, similar values of TA at harvest were observed in fruit from control and treated trees, but a 20% decrease in TA level occurred in controls during storage, while this decrease was only 2% and 5% in fruit from 0.1 mM melatonin-treated trees for 2019 and 2020, respectively (Supplementary Figure S3).

4. Discussion

Pomegranate fruit have a wide range of bioactive compounds, the most important being phenolics, including anthocyanins, hydrolysable tannins and other complex flavonoids, and ascorbic acid, which are found at high concentrations as compared with other fruits of the Mediterranean diet, although different contents have been reported depending on cultivar, ripening stage, cultural practices and environmental conditions [12,15,19,36]. These bioactive compounds have antioxidant capacity and are responsible for the health beneficial effects attributed to pomegranate fruit consumption [4,6–8,10]. Results of the present experiments show that preharvest melatonin treatments enhanced total phenolic compound and total and individual anthocyanin concentrations at harvest, leading to increases in H-TAA, with these effects being maintained during storage. Thus, preharvest melatonin treatments would improve the pomegranate health beneficial effects for human consumption since phenolic compounds, including anthocyanins, are a wide range of secondary metabolites with preventive effects on a wide range of chronic and age-related diseases, such as hypertension, obesity, diabetes, cardiovascular, neurodegenerative and oncologic diseases [9,37–39]. No previous reports are available in the literature regarding the effect of melatonin treatment on pomegranate bioactive compounds, and little information exists on other fruit species. For instance, 0.1 mM melatonin treatment of tomato plants increased antioxidant compounds, such as lycopene, β -carotene, total phenolics and flavonoids, and antioxidant activity in tomato fruit when plants were grown under acid rain stress conditions [40]. Accordingly, leaves' treatment of sweet cherry trees with 0.05 or 0.1 mM of melatonin improved total phenol, flavanol, anthocyanin and ascorbic concentrations in fruit at harvest [41]. However, the effects of melatonin postharvest treatments on increasing fruit bioactive compounds and antioxidant activity have been addressed in more fruit species. For instance, in 'Santa Rosa' plum, postharvest dipping treatment with 0.1 mM melatonin led to higher ascorbic acid, total phenolics and antioxidant activity levels during storage as compared with controls [42], as well as on strawberry treated with 0.1 or 1 mM of melatonin [43]. In addition, dipping treatment of nectarine fruit with 0.25, 0.5 and 1 mM of melatonin for 30 min and of peach fruit with 0.1 mM for 10 min minimised phenolic losses during storage at 1 °C [29,44]. Accordingly, 0.1 mM melatonin dipping treatment of sweet cherry increased anthocyanin content during storage due to an induced overexpression of two key genes coding for dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase (UFGT), which are enzymes involved in the last steps of anthocyanin biosynthesis [45]. Moreover, specifically in 'Malas Saveh' pomegranate, Aghdam et al. [46] have reported recently that postharvest 0.1 mM melatonin treatment leads to higher content of anthocyanin and phenolics during storage at 4 °C due to higher activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), the first enzyme involved in the phenylpropanoid pathway activity, and increased intracellular NADPH supply.

'Mollar de Elche' pomegranate is very appreciated by consumers due to its high content of sugars and low acidity, which confer a sweet taste, being also very aromatic, although arils have a pale red colour as compared with other cultivars grown in Spain, such as 'White', 'CG8', 'Katirbasi' or 'Wonderful' [14,18], or other Tunisian, Turkish, Croatian or Iranian cultivars [2,12,15,19,20], depreciating its commercial value in international markets



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



which are used to buy more red-coloured cultivars. Results of the present research would contribute to increase the profit of this crop since melatonin-treated fruit had a deeper aril red colour than controls (lower Hue angle) at harvest and during storage, as well as total anthocyanin concentration, showing a stimulation of the anthocyanin biosynthesis by melatonin treatment. Nevertheless, anthocyanin profile was not affected by preharvest melatonin treatment, irrespective of the applied concentration, with cyn 3-gluc being the major anthocyanin, followed by dlp 3-gluc, cyn 3,5-di-gluc and plg 3-gluc, according to previous reports regarding individual anthocyanin concentration of this cultivar [13,14,21]. Anthocyanin profile seems to be similar in all pomegranate cultivars, although their relative proportion of each one is different. Thus, cyn 3-gluc was also reported as the predominant anthocyanin in 'Wonderful' pomegranate [47], while dlp 3-gluc was the major anthocyanin for some Croatian cultivars [12], plg 3,5-di-gluc for Iranian cultivars [48] and cyn 3,5-di-gluc for Tunisian cultivars [49].

H-TAA was higher in arils of fruit from melatonin-treated trees than in controls, at harvest and during storage, the highest effect being observed for the 0.1 mM dose. Antioxidant activity in pomegranate arils, as well as in other fresh fruit species, is mainly due to hydrophilic compounds such as phenolics, including anthocyanins, and ascorbic acid [13,35,36,50]. In agreement with these previous reports, the present results show enhanced concentrations of total phenolics and total and individual anthocyanins at harvest in treated fruit, which could be responsible for the higher H-TAA found in treated than in control fruits. However, during storage, total phenolic concentration increased from 30 to 60 days of storage, while anthocyanin concentration increased from day 0 to day 30 and remained stable thereafter. Thus, the observed reductions in H-TAA from 30 to 60 days of storage should be attributed, apart from phenolics and anthocyanins, to ascorbic acid, an important hydrophilic antioxidant compound which decreases sharply during storage in 'Mollar de Elche' pomegranate fruit [13], as well as in 'Wonderful' [36] and 'Malas Saveh' [51] cultivars.

Fruit firmness, skin and aril colour and aril TSS and TA levels are the main attributes responsible for pomegranate fruit quality [2,3,17]. Then, the higher firmness and TSS and the lower skin and aril Hue angle values found at harvest in pomegranate fruit from melatonin-treated trees with respect to controls show that they had higher-quality attributes than controls. In addition, increases in TSS and decreases in fruit firmness and skin and arils Hue angle show the normal evolution of the 'Mollar de Elche' and other pomegranate cultivars' postharvest ripening process [16,51,52], which were delayed by preharvest melatonin treatments. Moreover, TSS and TA are important quality parameters affecting sweetness and sourness respectively, and contributing to fruit taste. Then, the TSS increase and the reduction in TA in pomegranate arils during storage lead to increment the TSS/TA ratio, which is organoleptically appreciated as over-ripened fruit without the freshness, juiciness and taste required by consumers [2,3,11,16,50]. Thus, taking into account the evolution of all these quality parameters (mainly decreases in fruit firmness and TA in the arils), the maximum storage period at 10 °C of control pomegranate fruit with high quality for consumption in 2019 and 2020 experiments was 30 days, while this period was extended up to 60 days in fruit from all melatonin-treated trees. In fact, fruit firmness and arils TA in fruit from all melatonin-treated trees after 60 days of storage were even higher than in controls after 30 days of storage. In addition, as no significant differences were observed in these parameters among 0.1, 0.3 and 0.5 mM melatonin treatments, the application of the 0.1 mM dose could be enough for practical purposes. No previous reports are available regarding the effects of preharvest melatonin treatments on delaying fruit ripening and maintaining fruit quality attributes during storage for comparative purposes. However, postharvest dipping treatments have been reported to maintain fruit quality traits and extend shelf-life in several fruit species, such as banana, peach, pear, kiwi or strawberry, and even in pomegranate, as recently revised by Ze et al. [53], although the applied dose and time dipping was different for each fruit species. These effects were attributed to a reduced accumulation of reactive oxygen species (ROS) due to increases in the enzymatic



activities and gene expressions of antioxidant enzymes. On the other hand, in climacteric fruit, such as 'Colorado' and 'Mikado' apricot, an effect of 0.1 mM melatonin treatments on delaying the postharvest ripening process at 1 and 8 °C has been observed recently, which was attributed to a reduced ethylene production in both cultivars and both storage temperatures [54]. Similar effects were observed by postharvest melatonin treatments on mangoes [26], banana [27], peaches [28], nectarines [29], apples [55] and pears [56], which were attributed to a reduced expression of genes codifying for ACC-synthase and ACC-oxidase. However, pomegranate is a non-climacteric fruit and ethylene production was very low in all fruit during storage, irrespective of treatments (data not shown). Accordingly, postharvest melatonin treatment also delayed the postharvest ripening process in non-climacteric fruits, such as sweet cherry [29], which was not mediated by reduction in ethylene production.

In addition, we recently found that 0.1 mM melatonin preharvest treatment increased crop yield of pomegranate trees [54], as well as in tomato plants under acid rain [40] or water-deficit stress conditions [57], with these effects being attributed to the ability of melatonin treatment on boosting the stress tolerance of tomato plants, throughout an increase in leaf chlorophyll content and photosynthetic rate. Thus, given the semi-arid climate conditions of Southern Spain, the melatonin treatment could have an additional effect, increasing tree net photosynthesis rate and productivity throughout enhancement of tree tolerance to heat and drought stresses [23,58], and in turn, leading to enhanced economic profit for growers.

5. Conclusions

This is the first report showing that melatonin applied as preharvest treatment has a significant effect on increasing pomegranate fruit quality parameters and their content in bioactive compounds with antioxidant properties at harvest and during postharvest storage at 10 °C, with the best results being found for the 0.1 mM dose. Overall, these results would permit to confirm that melatonin was effective on delaying the postharvest ripening process of pomegranate and extending fruit shelf-life. Thus, melatonin could be a reliable, feasible and cost-effective tool to be used in order to increase pomegranate fruit quality parameters, especially aril colour and antioxidant compounds, at harvest and to maintain them during storage.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10060820/s1>, Figure S1: Skin colour Hue of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees during storage at 10 °C, Figure S2: Total soluble solids (TSS) in arils of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees during storage at 10 °C, Figure S3: Titratable acidity (TA) in arils of pomegranate fruit from control and melatonin-treated trees during storage at 10 °C.

Author Contributions: M.S. and D.V. conceived and designed the work in association with other authors; S.C., D.M.-R. and F.G. performed the field treatments; J.M.L.-M., J.M.V. and F.G. performed most of the analytical determination, in collaboration with the other authors; M.S. and D.V. analysed the data and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation through Project RTI2018-09966-B-100 and the European Commission with FEDER funds.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data availability statement: Data have been addressed in the manuscript and in the Supplementary Material.

Acknowledgments: The authors thank Miguel Hernández University for the PhD scholarship of J.M. Lorente-Mento.



Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- MAGRAMA, 2019. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Available online: https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2019-Avance/CAPITULOS_TOTALES/AE19-C07.pdf (accessed on 12 April 2020).
- Pareek, S.; Valero, D.; Serrano, M. Postharvest biology and technology of pomegranate. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 2360–2369. [[CrossRef](#)]
- Valero, D.; Mirdehghan, S.H.; Sayyari, M.; Serrano, M. Vapor treatments, chilling, storage, and antioxidants in pomegranates. In *Processing and Impact on Active Components in Food*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; pp. 189–196. [[CrossRef](#)]
- Faria, A.; Calhau, C. The bioactivity of pomegranate: Impact on health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 626–634. [[CrossRef](#)]
- Ismail, T.; Sestili, P.K.; Akhtar, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *143*, 397–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Asgary, S.; Keshvari, M.; Sahebkar, A.; Sarrafzadegan, N. Pomegranate consumption and blood pressure: A review. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 1042–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Panth, N.; Manandhar, B.; Paudel, K.R. Anticancer activity of *Punica granatum* (pomegranate): A review. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 568–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Doostkam, A.; Bassiri-Jahromi, S.; Iravani, K. *Punica granatum* with multiple effects in chronic diseases. *Int. J. Fruit Sci.* **2020**, *20*, 471–494. [[CrossRef](#)]
- Mattioli, R.; Francioso, A.; Mosca, L.; Silva, P. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules* **2020**, *25*, 3809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pirzadeh, M.; Caporaso, N.; Rauf, A.; Shariati, M.A.; Yessimbekov, Z.; Khan, M.U.; Imran, M.; Mubarak, M.S. Pomegranate as a source of bioactive constituents: A review on their characterization, properties and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 982–999. [[CrossRef](#)]
- Kulkarni, A.P.; Aradhya, S.M. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chem.* **2005**, *93*, 319–324. [[CrossRef](#)]
- Radunić, M.; Jukić Špika, M.; Goreta Ban, S.; Gadžđ, J.; Díaz-Pérez, J.C.; Maclean, D. Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. *Food Chem.* **2015**, *177*, 53–60. [[CrossRef](#)]
- García-Pastor, M.E.; Serrano, M.; Guillén, F.; Giménez, M.J.; Martínez-Romero, D.; Valero, D.; Zapata, P.J. Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate ‘Mollar de Elche’ at harvest and during postharvest storage. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 145–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mena, P.; Gironés-Vilaplana, A.; Martí, N.; García-Viguera, C. Pomegranate varietal wines: Phytochemical composition and quality parameters. *Food Chem.* **2012**, *133*, 108–115. [[CrossRef](#)]
- Mphahlele, R.R.; Fawole, O.A.; Stander, M.A.; Opara, U.L. Preharvest and postharvest factors influencing bioactive compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.)—A review. *Sci. Hortic.* **2014**, *178*, 114–123. [[CrossRef](#)]
- García-Pastor, M.E.; Zapata, P.J.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Valero, D.; Serrano, M. The effects of salicylic acid and its derivatives on increasing pomegranate fruit quality and bioactive compounds at harvest and during storage. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nuncio-Jáuregui, N.; Calín-Sánchez, A.; Carbonell-Barrachina, A.; Hernández, F. Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. *Sci. Hortic.* **2014**, *165*, 181–189. [[CrossRef](#)]
- Fernandes, L.; Pereira, J.A.; López-Cortés, I.; Salazar, D.; González-Álvarez, J.; Ramalhosa, E. Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 1799–1814. [[CrossRef](#)]
- Li, X.; Wasila, H.; Liu, L.; Yuan, T.; Gao, Z.; Zhao, B.; Ahmad, I. Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food Chem.* **2015**, *175*, 575–584. [[CrossRef](#)]
- Cano-Lamadrid, M.; Galindo, A.; Collado-González, J.; Rodríguez, P.; Cruz, Z.N.; Legua, P.; Burló, F.; Morales, D.; Carbonell-Barrachina, A.; Hernández, F. Influence of deficit irrigation and crop load on the yield and fruit quality in Wonderful and Mollar de Elche pomegranates. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 3098–3108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Laribi, A.I.; Palou, L.; Intrigliolo, D.S.; Nortes, P.A.; Rojas-Argudo, C.; Taberner, V.; Bartual, J.; Pérez-Gago, M.B. Effect of sustained and regulated deficit irrigation on fruit quality of pomegranate cv. ‘Mollar de Elche’ at harvest and during cold storage. *Agric. Water Manag.* **2013**, *125*, 61–70. [[CrossRef](#)]
- Arnao, M.B.; Hernandez-Ruiz, J. Functions of melatonin in plants: A review. *J. Pineal Res.* **2015**, *59*, 133–150. [[CrossRef](#)]
- Arnao, M.B.; Hernandez-Ruiz, J. Melatonin: A New Plant Hormone and/or a Plant Master Regulator? *Trends Plant Sci.* **2019**, *24*, 38–48. [[CrossRef](#)]
- Xu, T.; Chen, Y.; Kang, H. Melatonin is a potential target for improving post-harvest preservation of fruits and vegetables. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1388. [[CrossRef](#)]
- Arnao, M.B.; Hernández-Ruiz, J. Melatonin in flowering, fruit set and fruit ripening. *Plant Reprod.* **2020**, *33*, 77–87. [[CrossRef](#)]



26. Liu, S.; Huang, H.; Huber, D.J.; Pan, Y.; Shi, X.; Zhang, Z. Delay of ripening and softening in 'Guifei' mango fruit by postharvest application of melatonin. *Postharvest Biol. Technol.* **2020**, *163*, 111136. [[CrossRef](#)]
27. Hu, W.; Yang, H.; Tie, W.W.; Yan, Y.; Ding, Z.; Liu, Y.; Wu, C.; Wang, J.; Reiter, R.J.; Tan, D.X.; et al. Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 9987–9994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gao, H.; Zhang, Z.K.; Chai, H.K.; Cheng, N.; Yang, Y.; Wang, D.N. Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *118*, 103–110. [[CrossRef](#)]
29. Bal, E. Effect of melatonin treatments on biochemical quality and postharvest life of nectarines. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 288–295. [[CrossRef](#)]
30. Sun, Q.; Zhang, N.; Wang, J.; Cao, Y.; Li, X.; Zhang, H.; Zhang, L.; Tan, D.X.; Guo, Y.D. A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato. *J. Pineal Res.* **2016**, *61*, 138–153. [[CrossRef](#)]
31. Tijero, V.; Muñoz, P.; Munné-Bosch, S. Melatonin as an inhibitor of sweet cherries ripening in orchard trees. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *140*, 88–95. [[CrossRef](#)]
32. Liu, J.; Zhang, R.; Sun, Y.; Liu, Z.; Jin, W.; Sun, Y. The beneficial effects of exogenous melatonin on tomato fruit properties. *Sci. Hortic.* **2016**, *207*, 14–20. [[CrossRef](#)]
33. Abd El-Naby, S.K.M.A.; Mohamed, A.A.A.; El-Naggar, Y.I.M. Effect of melatonin, GA3 and NAA on vegetative growth, yield and quality of 'Canino' apricot fruits. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **2019**, *18*, 167–174. [[CrossRef](#)]
34. Medina-Santamarina, J.; Zapata, P.J.; Valverde, J.M.; Valero, D.; Serrano, M.; Guillén, F. Melatonin treatment of apricot trees leads to maintenance of fruit quality attributes during storage at chilling and non-chilling temperatures. *Agronomy* **2021**, *11*, 917. [[CrossRef](#)]
35. Serrano, M.; Guillén, F.; Martínez-Romero, D.; Castillo, S.; Valero, D. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2741–2745. [[CrossRef](#)]
36. Boussaa, F.; Zaouay, F.; Burlo-Carbonell, F.; Nuncio-Jáuregui, N.; Gmati, M.; El Arbi, B.; Melgarejo, P.; Hernandez, F.; Mars, M. Combined effects of cropping system and harvest date determine quality and nutritional value of pomegranate fruits (*Punica granatum* L. cv. Gabsi). *Sci. Hortic.* **2019**, *249*, 419–431. [[CrossRef](#)]
37. Sureda, A.; Bibiloni, M.M.; Julibert, A.; Bouzas, C.; Argelich, E.; Llompard, I.; Pons, A.; Tur, J.A. Adherence to the Mediterranean diet and inflammatory markers. *Nutrients* **2018**, *10*, 62. [[CrossRef](#)]
38. Tarangon, E.; Moreno, J.J. Polyphenols and taste 2 receptors. Physiological, pathophysiological and pharmacological implications. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *78*, 114086. [[CrossRef](#)]
39. Luo, J.; Si, H.; Jia, Z.; Liu, D. Dietary anti-aging polyphenols and potential mechanisms. *Antioxidants* **2021**, *10*, 283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Debnath, B.; Hussain, M.; Li, M.; Lu, X.; Sun, Y.; Qiu, D. Exogenous melatonin improves fruit quality features, health promoting antioxidant compounds and yield traits in tomato fruits under acid rain stress. *Molecules* **2018**, *23*, 1868. [[CrossRef](#)]
41. Xia, H.; Shen, Y.; Shen, T.; Wang, X.; Zhang, X.; Hu, P.; Liang, D.; Lin, L.; Deng, H.; Wang, J.; et al. Melatonin accumulation in sweet cherry and its influence on fruit quality and antioxidant properties. *Molecules* **2020**, *25*, 753. [[CrossRef](#)]
42. Bal, E. Physicochemical changes in 'Santa Rosa' plum fruit treated with melatonin during cold storage. *J. Food Meas. Charact.* **2019**, *13*, 1713–1720. [[CrossRef](#)]
43. Liu, C.H.; Zheng, H.H.; Sheng, K.L.; Liu, W.; Zheng, L. Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2018**, *139*, 47–55. [[CrossRef](#)]
44. Gao, H.; Lu, Z.; Yang, Y.; Wang, D.; Yang, T.; Cao, M.; Cao, W. Melatonin treatment reduces chilling injury in peach fruit through its regulation of membrane fatty acid contents and phenolic metabolism. *Food Chem.* **2018**, *245*, 659–666. [[CrossRef](#)]
45. Miranda, S.; Vilches, P.; Suazo, M.; Pávez, L.; García, K.; Méndez, M.A.; González, M.; Meisel, L.-A.; Defilippi, B.G.; del Pozo, T. Melatonin triggers metabolic and gene expression changes leading to improved quality traits of two sweet cherry cultivars during cold storage. *Food Chem.* **2020**, *319*, 126360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Aghdam, M.S.; Luo, Z.; Li, L.; Jannatizadeh, A.; Fard, J.R.; Pirzad, F. Melatonin treatment maintains nutraceutical properties of pomegranate fruits during cold storage. *Food Chem.* **2020**, *303*, 125385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Gil, M.L.; García-Viguera, C.; Artés, F.; Tomás-Barberán, F.A. Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *68*, 77–81. [[CrossRef](#)]
48. Mousavinejad, G.; Emam-Djomeh, Z.; Rezaei, K.; Khodaparast, M.H. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1274–1278. [[CrossRef](#)]
49. Hasnaoui, N.; Mars, M.; Ghaffari, S.; Trifi, M.; Melgarejo, P.; Hernandez, F. Seed and juice characterization of pomegranate fruits grown in Tunisia: Comparison between sour and sweet cultivars revealed interesting properties for prospective industrial applications. *Ind. Crops Prod.* **2011**, *33*, 374–381. [[CrossRef](#)]
50. Valero, D.; Serrano, M. *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010; p. 288. [[CrossRef](#)]
51. Sayyari, M.; Babalar, M.; Kalantari, S.; Serrano, M.; Valero, D. Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *53*, 152–154. [[CrossRef](#)]



52. Sayyari, M.; Aghdam, M.S.; Salehi, F.; Ghanbari, F. Salicyloyl chitosan alleviates chilling injury and maintains antioxidant capacity of pomegranate fruits during cold storage. *Sci. Hort.* **2016**, *211*, 110–117. [[CrossRef](#)]
53. Ze, Y.; Gao, H.; Li, T.; Yang, B.; Jiang, Y. Insights into the roles of melatonin in maintaining quality and extending shelf life of postharvest fruits. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *109*, 569–578. [[CrossRef](#)]
54. Medina-Santamarina, J.; Serrano, M.; Lorente-Mento, J.M.; García-Pastor, M.E.; Zapata, P.J.; Valero, D.; Guillén, F. Melatonin treatment of pomegranate trees increases crop yield and quality parameters at harvest and during storage. *Agronomy* **2021**, *11*, 861. [[CrossRef](#)]
55. Onik, J.C.; Wai, S.C.; Li, A.; Lin, Q.; Sun, Q.; Wang, Z.; Duan, Y. Melatonin treatment reduces ethylene production and maintains fruit quality in apple during postharvest storage. *Food Chem.* **2021**, *337*, 127753. [[CrossRef](#)]
56. Liu, J.; Yang, J.; Zhang, H.; Cong, L.; Zhai, R.; Yang, C.; Wang, Z.; Ma, F.; Xu, L. Melatonin inhibits ethylene synthesis via nitric oxide regulation to delay postharvest senescence in pears. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 2279–2288. [[CrossRef](#)]
57. Ibrahim, M.F.M.; Abd Elbar, O.H.; Farag, R.; Hikal, M.; El-Kelish, A.; El-Yazied, A.A.; Alkahtani, J.; Abd El-Gawad, H.G. Melatonin counteracts drought induced oxidative damage and stimulates growth, productivity and fruit quality properties of tomato plants. *Plants* **2020**, *9*, 1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kołodziejczyk, I.; Posmyk, M.M. Melatonin—A new plant biostimulator? *J. Elem.* **2016**, *21*, 1187–1198. [[CrossRef](#)]



4.3 Publicación III

γ -Aminobutyric acid treatments of pomegranate trees increase crop yield and fruit quality at harvest.

José M. Lorente-Mento, Fabián Guillén, Domingo Martínez-Romero, Alberto Carrión-Antolí, Daniel Valero, y María Serrano

Scientia Horticulturae, 322, 111633 (2024)

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111633>





γ -Aminobutyric acid treatments of pomegranate trees increase crop yield and fruit quality at harvest

José M. Lorente-Mento^a, Fabián Guillén^b, Domingo Martínez-Romero^b, Alberto Carrión-Antoli^b, Daniel Valero^b, María Serrano^{a,*}

^a Department Applied Biology, EPSO-CIAGRO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, Orihuela, Alicante 03312, Spain

^b Department Food Technology, EPSO-CIAGRO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, Orihuela, Alicante 03312, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

GABA
Punica granatum
 Phenolics
 Colour
 Anthocyanins

ABSTRACT

γ -Aminobutyric (GABA) is a non-protein amino acid that has been reported to affect different plant developmental processes, including delay of fruit senescence and maintenance of quality when applied as postharvest treatment. In this experiment, GABA treatments (10, 50 and 100 mM) were applied by foliar spray to 'Mollar de Elche' pomegranate trees at three key points of fruit development. Results showed that GABA treatments increased crop yield in a dose-dependent way, this effect being due to a higher number of fruit harvested per tree. In addition, GABA treatments led to a deeper red colour of pomegranate skin and arils, the highest effects being observed for 100 mM dose. Total phenolic and total anthocyanin concentrations were also increased by GABA treatment, while other quality parameters such as total soluble solids, total acidity or firmness were not affected by treatments. Then, GABA preharvest treatment, applied at 100 mM, could be a useful tool to increase the economic profit of pomegranate crop, since higher yield and fruit with higher colour were obtained, which is an important quality parameter for this cultivar. In addition, aril total phenolics and anthocyanin content were increased, which would lead to enhance the antioxidant properties and health benefits for consumers.

1. Introduction

Pomegranate fruit (*Punica granatum* L.) is very appreciated by consumers due to its high quality attributes, mainly size, shape, skin and aril colour, content of sugars and organic acids and the presence of small and soft seeds in the arils (Pareek et al., 2015; García-Pastor et al., 2020a). The colour of pomegranate fruit increases in both skin and arils during on-tree maturation, due to the accumulation of anthocyanins, the major ones being cyanidin 3-glucoside, followed by delphinidin 3,5-diglucoside and pelargonidin 3-glucoside (García-Pastor et al., 2020c; Melgarejo-Sánchez et al., 2021). Sugars are also accumulated during fruit maturation while decreases occur on acid content and fruit firmness (Nuncio-Jáuregui et al., 2014; Cano-Lamadrid et al., 2018; García-Pastor et al., 2020a, 2020b, 2020c). In addition, the health benefits of pomegranate fruit have been known from ancient times, although scientific evidences supporting them have been reported in the last decade, which are attributed to its content in bioactive compounds with antioxidant activity (Asgary et al., 2017; Panth et al., 2017; Giménez-Bastida et al., 2021; Melgarejo-Sánchez et al., 2021).

'Mollar de Elche' is the most cultivated pomegranate cultivar in Spain. The edible part (arils) have an excellent quality due to its low acidity, high sugar levels and their small and soft seeds that can be easily eaten. However, this cultivar has low content of anthocyanins in both skin and arils, as compared with other worldwide-known cultivars such as 'Wonderful'. 'Mollar de Elche' cultivar has a cream-pink skin colour and sometimes the arils are pink or slightly red-coloured (Nuncio-Jáuregui et al., 2014; Li et al., 2015; Pareek et al., 2015; Cano-Lamadrid et al., 2018; Tozzi et al., 2020). This fact makes it difficult for 'Mollar de Elche' cultivar to reach international markets which are used to redder ones. Thus, whatever treatment that increases skin and aril coloration in 'Mollar de Elche' pomegranate would enhance its economic value in international markets, as well as its antioxidant properties with health beneficial effects, since anthocyanin pigments responsible for aril colour are the major compounds contributing to these properties (Faria and Calhau, 2011; Asgary et al., 2017; Panth et al., 2017). In this sense, water restrictions applied in summer (during the linear phase of fruit growth) have been reported to increase aril anthocyanin content (Bartual et al., 2015), as well as treatment with oxalic acid (García-Pastor

* Corresponding author.

E-mail address: m.serrano@uh.es (M. Serrano).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111633>

Received 12 July 2022; Received in revised form 17 October 2022; Accepted 21 October 2022

Available online 26 October 2022

0304-4238/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



et al., 2020a), methyl jasmonate (García-Pastor et al., 2020b) and salicylates (García-Pastor et al., 2020c) during on-tree pomegranate fruit development.

γ -Aminobutyric (GABA) is a non-protein amino acid that has been reported to affect plant growth and development, having a main role in plant responses to abiotic environmental stresses, such as salinity, drought, heat and cold (Shelp et al., 2017; Li et al., 2021), as well as on increasing plant resistance to diseases (Li et al., 2021; Asgarian et al., 2022). In addition, GABA affects postharvest physiological processes of horticultural commodities, such as delaying senescence and increasing chilling tolerance, leading to quality maintenance during cold storage periods (Shelp et al., 2017; Aghdam et al., 2019; Zhu et al., 2022). For instance, GABA dipping treatment (at 2.5, 5 and 10 mM) reduced chilling injury (CI) and maintained higher phenol, flavonoid and anthocyanin contents on cornelian fruit (Aghdam et al., 2019). On the other hand, Rastegar et al. (2020) reported that 200 μ M GABA post-harvest treatments maintained higher firmness, ascorbic acid, phenols and flavonoids in mango during storage at 15 °C, while no significant effects were observed for total soluble solids (TSS) or titratable acidity (TA). Reduced CI, weight, acidity and firmness losses during cold storage have been also reported in blood orange fruit after dipping treatments with 20 and 40 mM GABA in a dose-dependent way (Habibi et al., 2019, 2020).

Specifically in pomegranate, the literature regarding GABA treatments is scarce. Nazoori et al. (2020) reported that 5, 10 and 15 mM GABA dipping treatments (for 15 min) reduced CI during storage at 4 \pm 1 °C and maintained higher levels of firmness, total phenolic content and antioxidant capacity. CI was also reduced and quality parameters maintained in ‘Malas Saveh’ pomegranate coated with carnauba wax combined with 5 or 10 mM GABA (Nazoori et al., 2022). Similarly, aril treatments of ‘Hicaznar’ pomegranate with GABA led to maintenance of quality traits (Öz et al., 2017). On the other hand, the effects of GABA applied as preharvest treatment on fruit quality parameters has been reported only in a recent paper on apple. In this paper, 40 mM GABA treatments, applied 1 or 2 weeks before harvest to ‘Honeycrisp’ apple trees, reduced soft scald incidence after cold storage by 10-fold compared with control fruits, although no effect was observed when GABA treatment was applied four weeks before harvest (Al Shoffe et al., 2021). However, as far as we know, there is no available literature regarding preharvest GABA treatments on pomegranate and according to the previous literature, we speculated that quality traits and specially the content on anthocyanins could be increased by GABA preharvest treatments. Thus, the objective of the present research was to evaluate the effects of ‘Mollar de Elche’ pomegranate tree treatments with GABA at 10, 50 and 100 mM on crop yield and fruit quality parameters at harvest mainly focused to increase aril colour and anthocyanin content.

2. Material and methods

2.1. Plant material, treatments, experimental design and crop yield

The experiments were performed in a commercial plot of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Mollar de Elche), located at Elche (Alicante, Spain), during 2019 and 2020 years, by using 12 and 13 years-old trees, respectively, planted at 6 \times 5 m, and trained on a single-stem training system. Standard cultural practices for pomegranate growth in Spain were used with respect to fertilization (160/80/160 kg ha⁻¹ nitrogen/phosphorus/potassium, N/P/K ratio) and irrigation by using a drip irrigation system with eight emitters per tree, each delivering 4 L h⁻¹ as follow: two watering cycles of 1 h per week in April, two watering cycles of 2 h per week from May to September and one watering cycle of 1 h per week in October. The electrical conductivity of the irrigation water used was ca. 3 dS m⁻¹. In 2019 experiment, three replicates of 3 trees were used for control and 10, 50 and 100 mM GABA treatments, which were applied after 30, 60, 90, 105 and 120 days of full blossom. For each treatment, 3 L of freshly prepared GABA (purchased from

Sigma, Sigma-Aldrich, Madrid) solutions (containing 0.5% Tween 20) were foliar sprayed with a mechanical mist sprayer and control trees were sprayed with 0.5% Tween 20. Fruit were harvested when reached their commercial maturation stage based on size, external colour and total soluble solid content of ca. 14 °Brix (140 mg L⁻¹). However, the pomegranate fruit development process is heterogeneous in the same tree, some fruit reaching their commercial maturation stage before than others. Thus, two harvests were made, on October 15 and October 29, named as 1st and 2nd harvests, respectively. According to commercial practices, 5 fruit were taken at random from control and treated trees and °Brix of the aril juice were measured in the field by using a hand refractometer. Then, fruit with similar size and colour than those having °Brix close to 14 (140 mg L⁻¹) were harvested at the first harvest date. At the second harvest date all the remaining fruit were harvested. In 2020 experiment, 100 mM concentration was chosen for repeating the experiment because with this concentration the best results were obtained in 2019 experiment. Three replicates of six trees for treated and control treatments and located in the same commercial plot were used and two harvests were performed on October 8 and 21.

In both experiments and for each harvest date, yield per tree (kg tree⁻¹) was measured and the number of fruit harvested from each tree was counted and then, fruit weight was calculated. In 2019 experiment and for each harvesting date, two fruits from each tree were taken at random (after fruit were picked by harvesters according to their size and skin colour and thus, they were homogeneous and representative of each individual tree). Fruit were grouped into three replicates of six fruits, which were transported to laboratory in two h and used to measure quality properties. Similarly, in 2020 experiment, one fruit was taken at random from each tree and transported to laboratory in two h to measure quality parameters in three replicates of six fruits.

2.2. Firmness, colour, total soluble solids, titratable acidity and total anthocyanin and phenolic measures

Fruit firmness was measured independently in each whole fruit by using a TA.XT-plus Texture Analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK) equipped with a flat probe which applied a force to achieve a 5 % fruit diameter deformation. Fruit firmness was expressed as mean \pm SE of the relation between the applied force and the travelled distance (N mm⁻¹). Skin colour was measured at three equidistant points along the equatorial perimeter of each fruit by using a Konica-Minolta colorimeter (CRC400, Minolta Camera Co., Japan) and the CIELab coordinates. Results are the mean \pm SE. Then, each fruit was cut by its equatorial plane and the aril colour was measured on the arils at three equidistant points of the cut internal surface by using the same colorimeter and results are expressed as the mean \pm SE. Thereafter, the manually obtained arils of the six fruit of each replicate were mixed and squeezed by using two layers of cotton fabric to obtain a homogeneous sample of pomegranate juice from each replicate. For each sample, ca. 50 g of arils were squeezed and total soluble solids (TSS) were measured in duplicate in the juice of each sample, by using a digital refractometer (Atago PR-101, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 20 °C. Results (mean \pm SE) were expressed as g L⁻¹. Titratable acidity (TA) was also determined in duplicate in each juice sample, by titration of 1 mL of juice diluted in 25 mL distilled H₂O with 0.1 N NaOH up to pH 8.1 by using a (785 DMP Titrimo, Metrohm), and the results (mean \pm SE) were expressed as g malic acid equivalent L⁻¹.

Total anthocyanins were extracted by homogenizing (for 30 s) 10 g of arils with 30 mL of methanol/formic acid/water (25:1:24, v/v/v) by using a Ultraturrax homogenizer (T18 basic, IKA, Berlin, Germany). After centrifugation of the extracts at 10,000 g for 10 min at 4 °C, total anthocyanin content was quantified in duplicate in the supernatant by reading absorbance at 520 nm in a UV-Vis spectrophotometer (UV-1900i, Shimadzu, Duisburg, Germany), and results were expressed as mg kg⁻¹ of cyaniding 3-glucoside equivalent in a fresh weight basis (molar absorption coefficient of 26,900 L cm⁻¹ mol⁻¹ and molecular weight of



449.2 g mol⁻¹). Total phenolics were extracted in a similar way by stuing 10 g of arils and 30 mL of water:methanol (2:8) containing 2 mM NaF (to inactivate polyphenol oxidase activity and prevent phenolic degradation). The extracts were centrifuged as previously described and total phenolic content was measured in duplicate in the supernatant using the Folin-Ciocalteu reagent as described by García-Pastor et al. (2020b). Results were expressed as mg kg⁻¹ of gallic acid equivalent in a fresh weight basis. For both, total phenolics and total anthocyanins two measures were performed in each sample and results are the mean \pm SE.

2.3. Statistical analysis

For 2019 experiment, analysis of variance (ANOVA) was made (using treatment as the factor) by using the SPSS software version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and means were compared by Tukey's test to find out significant differences among treatments at $P < 0.05$. For 2020 experiment, a Student's t-test was performed in order to detect significant differences between control and treated fruit at $P < 0.05$. Data are represented as mean \pm standard error (SE) of three replicates. In addition, for both experimental years, a Student's t-test was performed to find significant differences between first and second harvest for each treatment at $P < 0.05$

3. Results

3.1. Effects of GABA treatments on crop yield

Total crop yield of pomegranate trees was significantly ($P < 0.05$) increased by GABA treatments in a concentration dependent manner in 2019 experiment, with values of 75.21 ± 5.56 and 113.22 ± 4.69 kg per tree in controls and 100 mM GABA-treated trees, respectively (Fig. 1A). The highest crop yield was obtained in the first harvest date for all pomegranate trees, for which significant ($P < 0.05$) increases were observed due to GABA treatments, while in the second harvest date no significant differences were observed between control and GABA-treated trees. For 2020 experiment, 100 mM GABA treatment led also to increase significantly ($P < 0.05$) total crop yield with respect to

controls, with values of 67.84 ± 4.77 and 51.82 ± 3.88 kg per tree, respectively. However, comparing to each one of the harvest dates, the increases on yield were significant ($P < 0.05$) only for the second harvest (Fig. 1B). The total number of harvested fruit from each tree was also significantly ($P < 0.05$) increased by GABA treatments, in 2019 experiment, from 216.67 ± 7.13 in control trees to 257.70 ± 7.66 in 100 mM GABA-treated ones (Fig. 2A) and from 127.40 ± 6.28 to 164.51 ± 5.95 , respectively, for 2020 experiment (Fig. 2B). Fruit weight of the first harvest date in 2019 experiment was significantly ($P < 0.05$) increased by 10, 50 and 100 mM GABA treatments in a concentration manner, which reached values of 402.3 ± 7.4 , 447.7 ± 11.52 and 464.1 ± 8.9 , respectively, while in controls it was 347.1 ± 12.6 g (Fig. 3A). However, in 2020 experiment, fruit weight was not affected by GABA treatments (Fig. 3B).

3.2. Effects of GABA treatments on pomegranate quality traits

Total soluble solids in juice of pomegranate arils ranged from 150 to 157 g L⁻¹ in 2019 and 2020 experiments and no significant effects of GABA treatments were observed on the first or second harvest dates (Table 1S). Titratable acidity was not affected by GABA treatments, although values decreased from harvest 1 to harvest 2, either in controls as in treated fruits (Table 1S). Similarly, fruit firmness decreased from harvest 1 to harvest 2 without being significantly affected by GABA treatments (Table 1S). Skin and aril colour were measured by CIELab coordinates and the highest differences among treatments and harvest dates were found for a* parameter, which increases from cream to red or pink to red in pomegranate skin and arils, respectively. For pomegranate skin, colour a* at harvest was significantly ($P < 0.05$) enhanced by GABA treatments, the highest effects being observed for 100 mM dose in both harvest dates in 2019 experiments (Fig. 4A) and these results were confirmed in 2020 experiment (Fig. 4B). In addition, increases in colour a* of the fruit skin were found from harvest 1 to harvest 2 either in fruit from control trees as in those from GABA-treated ones (Fig. 4). In a similar way, colour a* parameters of the arils increased from first to second harvest and they were significantly ($P < 0.05$) increased by GABA treatments in a dose-dependent way, for both harvest dates, in

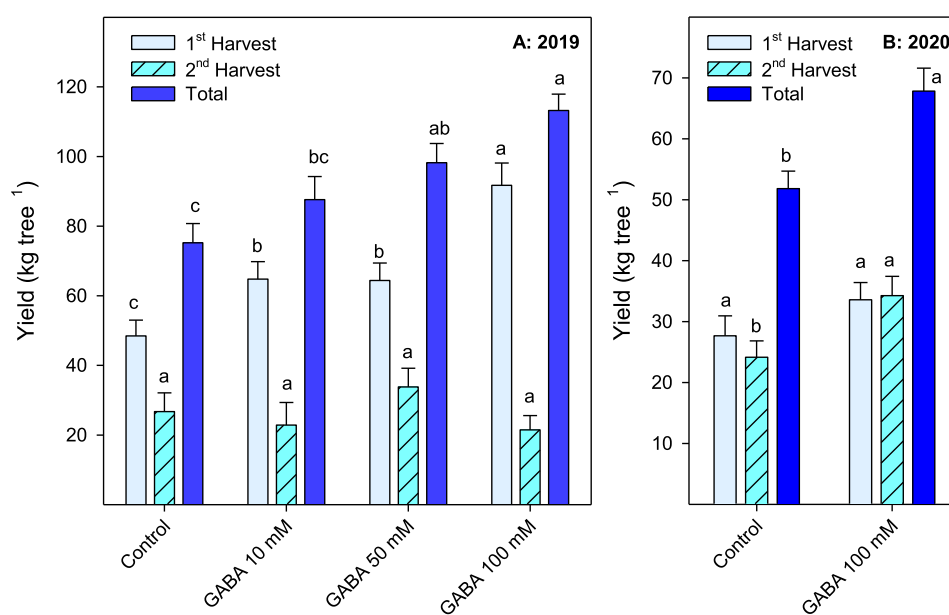


Fig. 1. Pomegranate tree yield (kg tree⁻¹) for the first and second harvest and total yield in 2019 (A) and 2020 (B) experiments as affected by preharvest γ -aminobutyric acid (GABA) treatments. Data are the mean \pm SE of three replicates of three or six trees for 2019 and 2020 experiments, respectively. Different letters show significant differences ($P < 0.05$) among treatments for each harvest or total yield.

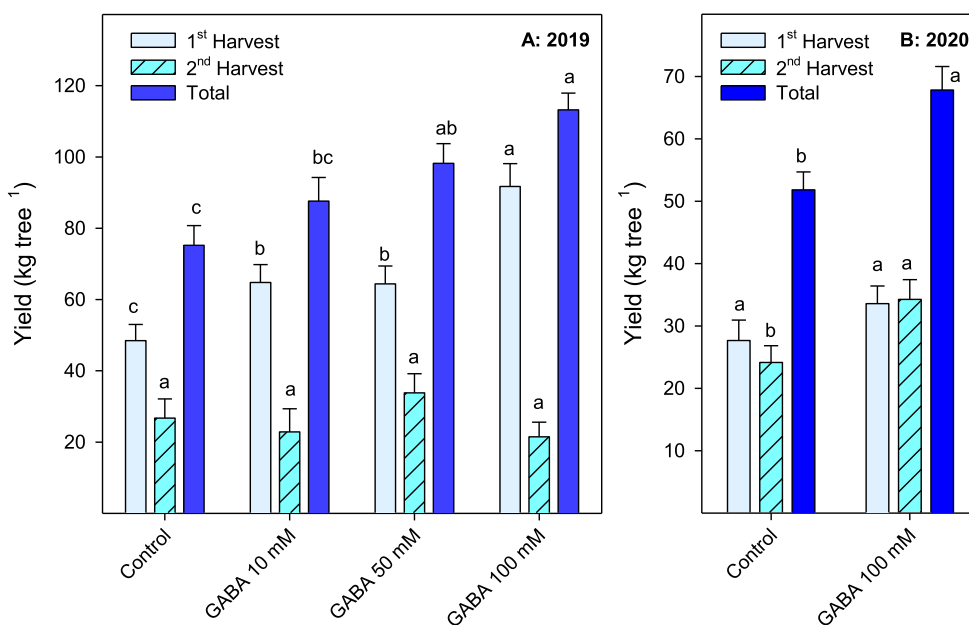


Fig. 2. Number of pomegranate fruit harvested by tree for the first and second harvest and total fruit harvested by tree in 2019 (A) and 2020 (B) experiments as affected by preharvest γ -aminobutyric acid (GABA) treatments. Data are the mean \pm SE of three replicates of three or six trees for 2019 and 2020 experiments, respectively. Different letters show significant differences ($P < 0.05$) among treatments for each harvest or total fruit harvested.

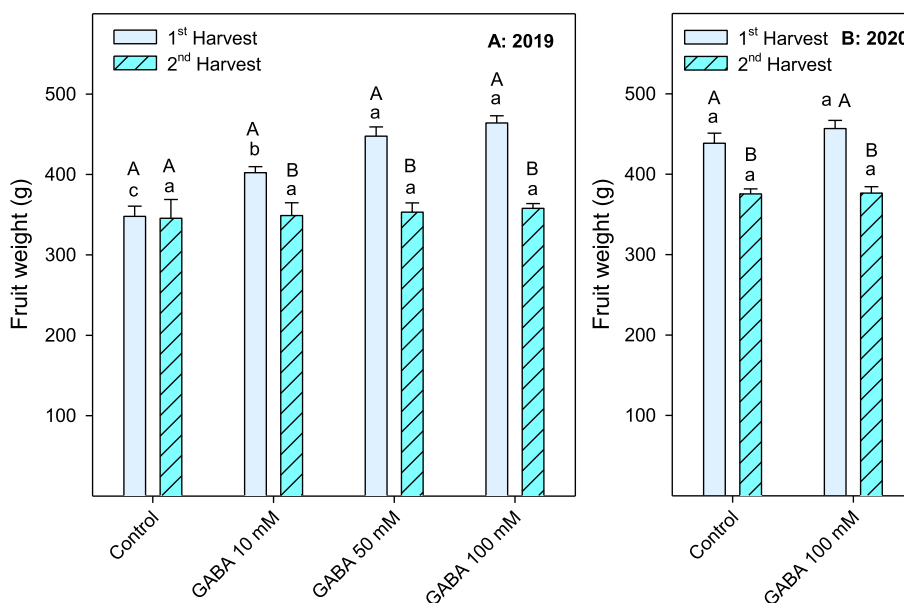


Fig. 3. Pomegranate fruit weight for the first and second harvest in 2019 (A) and 2020 (B) experiments as affected by preharvest γ -aminobutyric acid (GABA) treatments. Data are the mean \pm SE of three replicates of three or six trees for 2019 and 2020 experiments, respectively. Different lowercase letters show significant differences ($P < 0.05$) among treatments for each harvest and different capital letters show significant differences among harvests ($P < 0.05$) for each treatment.

2019 experiment (Fig. 5A and B).

Total anthocyanin content in juice of pomegranate arils was also significantly ($P < 0.05$) increased as a consequence of GABA tree treatments, from 63.8 ± 1.9 to 100.7 ± 2.3 mg 100 kg⁻¹ in control and 100 mM GABA treatment, respectively, for the first harvest date and from 82.2 ± 3.6 to 153.0 ± 4.8 mg 100 kg⁻¹, respectively, for the second

harvest date in 2019 experiment (Fig. 6A). For 2020 experiment, significant ($P < 0.05$) increases were also found in juice anthocyanin content in 100 mM GABA treated fruit with respect to controls (Fig. 6B). In addition, it is worth noting that anthocyanin concentration in juice increased significantly ($P < 0.05$) from harvest 1 to harvest 2, either in control as in GABA treated fruit in both experimental years (Fig. 6A, B).

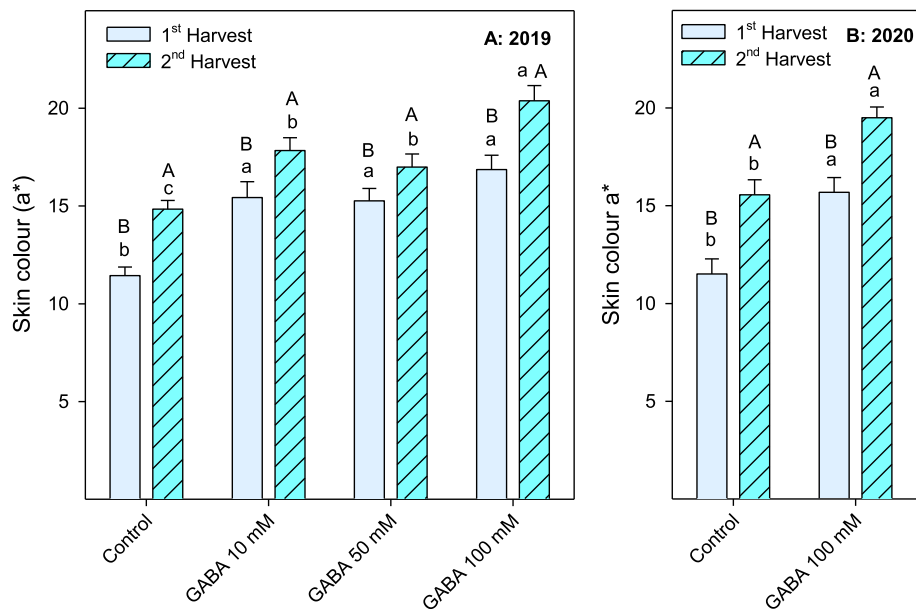


Fig. 4. Skin colour (a^*) for the first and second harvest in 2019 (A) and 2020 (B) experiments as affected by preharvest γ -aminobutyric acid (GABA) treatments. Data are the mean \pm SE of three replicates of six fruits. Different lowercase letters show significant differences ($P < 0.05$) among treatments for each harvest and different capital letters show significant differences among harvests ($P < 0.05$) for each treatment.

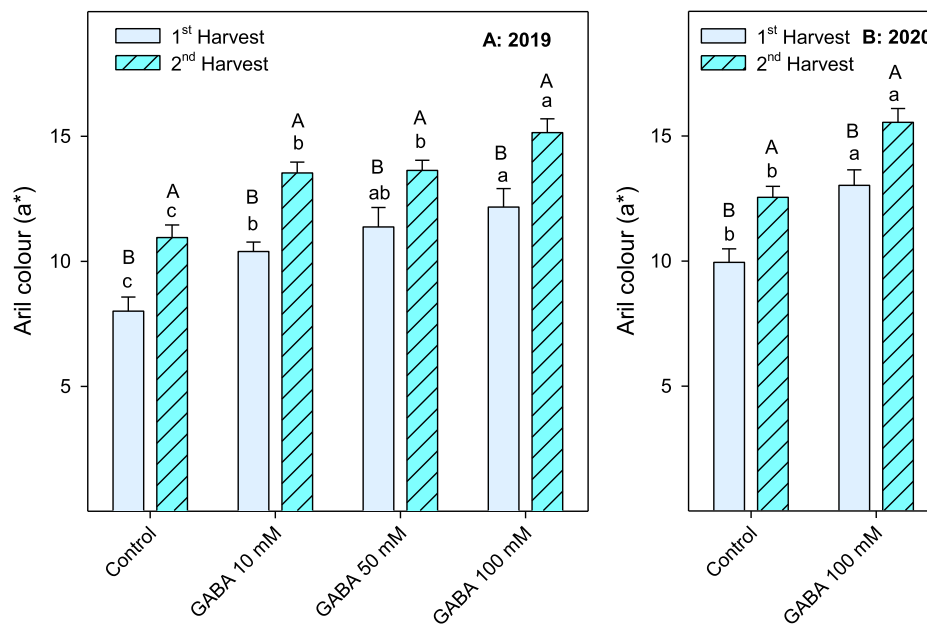


Fig. 5. Aril colour (a^*) for the first and second harvest in 2019 (A) and 2020 (B) experiments as affected by preharvest γ -aminobutyric acid (GABA) treatments. Data are the mean \pm SE of three replicates. Different lowercase letters show significant differences ($P < 0.05$) among treatments for each harvest and different capital letters show significant differences among harvests ($P < 0.05$) for each treatment.

Taking into account data for all treatments and years, a high correlation was found between colour a^* parameter and aril juice anthocyanin concentration ($y=0.064x+5.31$; $r^2=0.872$), showing that colour a^* parameter is a good index to measure pomegranate aril colour. A similar effect of GABA treatments was found for total phenolic content, that is to say, significant increases ($P < 0.05$) in arils of fruit from treated trees for

both harvest dates and years (Fig. 7A, B), which were dose-dependent in 2019 experiment (Fig. 7A). However, no significant changes were observed on phenolic content between the two harvest dates either in control or in treated fruit (Fig. 7).

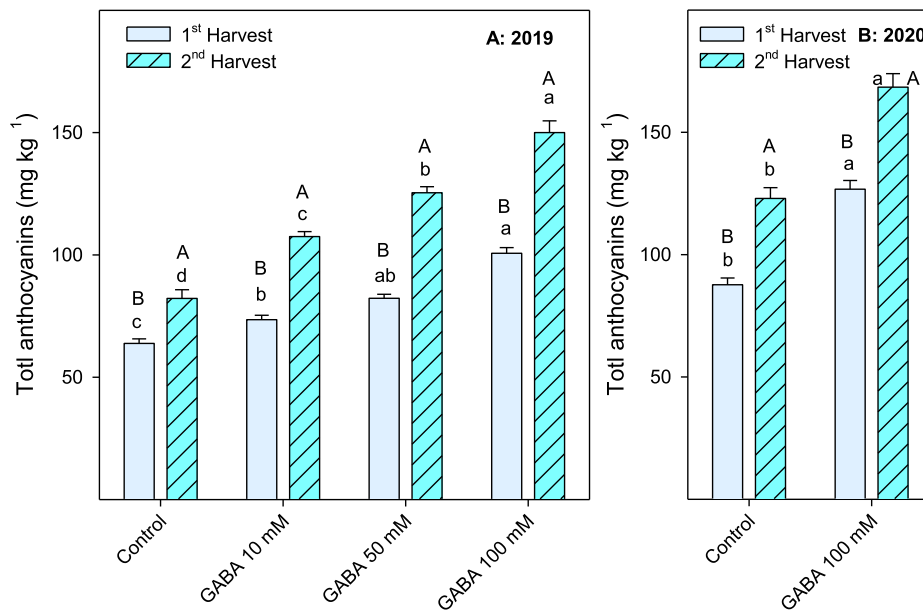


Fig. 6. Total anthocyanin concentration in aril for the first and second harvest in 2019 (A) and 2020 (B) experiments as affected by preharvest γ -aminobutyric acid (GABA) treatments. Data are the mean \pm SE of three replicates. Different lowercase letters show significant differences ($P < 0.05$) among treatments for each harvest and different capital letters show significant differences among harvests ($P < 0.05$) for each treatment.

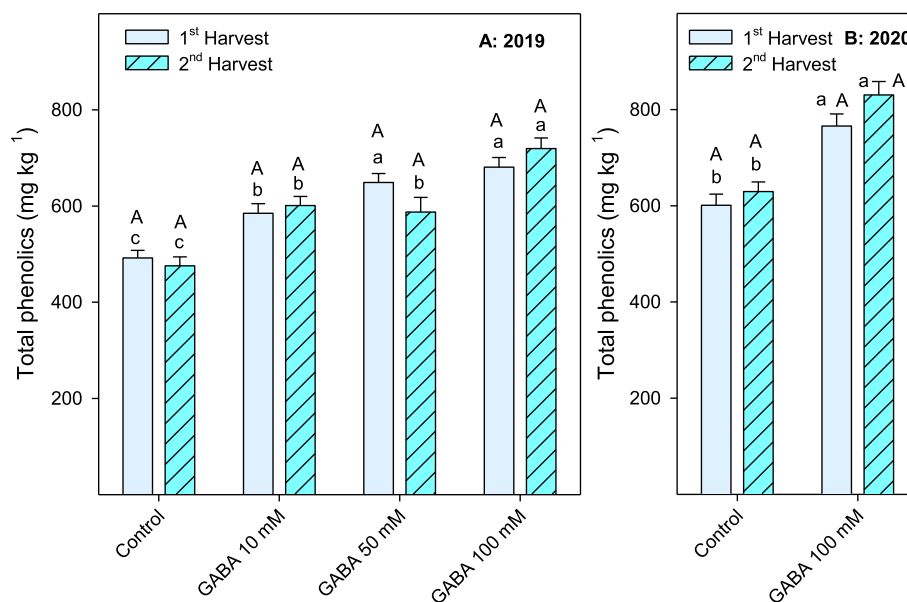


Fig. 7. Total phenolic content in arils for the first and second harvest in 2019 (A) and 2020 (B) experiments as affected by preharvest γ -aminobutyric acid (GABA) treatments. Data are the mean \pm SE of three replicates. Different lowercase letters show significant differences ($P < 0.05$) among treatments for each harvest and different capital letters show significant differences among harvests ($P < 0.05$) for each treatment.

4. Discussion

Results of the present experiments clearly show that GABA treatments of pomegranate tree led to significant ($P < 0.05$) increases in crop yield (kg tree^{-1}), the highest effect being observed for 100 mM treatment, in which total yield was enhanced by 50 and 31% for 2019 and 2020 experiments, respectively, with respect to control trees (Fig. 1). This increase on crop yield was due to increases in the total number of

fruit harvested by tree and on fruit weight of the first harvest, which were 20% and 30% higher, respectively, than in controls in 2019 experiment. However, in 2020 experiment, the increase on yield was only due to the higher number (29%) of fruits harvested from GABA treated trees as compared with controls (Figs. 2 and 3). In the present experiments GABA treatments started to be applied after 30 days of flowering when fruit were totally set. Thus, it is clear that GABA treatments increased the fruit-branch union strength, leading to reduced



normal fruit drop occurring during pomegranate fruit development, especially in the last phase of fruit maturation, which is attributed to environmental factors such as wind or rain, the first one being high and frequent in the field are of the study. In addition, the higher total yield of GABA pomegranate trees with respect to controls could show higher photoassimilate content to be partitioned among sinks such as developing fruit. In this sense, the effects of GABA on increasing photosynthesis rate have been mainly studied in plants under stress condition, showing that GABA increases plant stress tolerance by improving photosynthesis (Li et al., 2021). For instance, GABA treatments of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L) alleviated the detrimental effects of heat stress, such as reduction in chlorophyll content, net photosynthesis and water use efficiency among others, which was related with GABA-induced increase of the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX, POD, and DHAR) and reduction of ROS damage to photosynthetic tissues. However, no significant effects were observed on these parameters between control and GABA treated plants under no stress conditions (Zeng et al., 2021). Similarly, 20 mM GABA treatment of pepper seedling led to increased net photosynthetic rate and stomatal conductance under low light stress, although there was no marked effect of GABA treatment when the seedlings were under normal light conditions (Li et al., 2017). On the contrary, treatment of *Vicia faba* with GABA at 20 μ M, once per week, through irrigation system, starting when the first true leaves emerged on the plants, increased leaf area, leaf chlorophyll content and stomatal length, width and conductance leading to enhanced photosynthesis efficiency and these effects were observed on control plants and in those under salinity, osmotic and sulphur dioxide stresses (Shomali et al., 2021). Accordingly, GABA application at 50 mg L⁻¹ to maize seedlings promoted net photosynthesis, gas exchange capacities and chlorophyll biosynthesis (Li et al., 2016) and GABA increased grain yield and improved rice plant growth in different fragrant rice varieties under no stress conditions (Li et al., 2020; Xie et al., 2020). Thus, these previous reports support the effects of GABA treatments on increasing net photosynthesis rate in pomegranate trees which would lead to enhance crop yield. In addition, daily and night mean temperatures for September and October were higher for 2019 than for 2020 year (Table 2S), and the increases on total yield were also higher for 2019 than for 2020 year (50 and 31 %, respectively) for 100 mM GABA. Thus, pomegranate trees were exposed to a higher heat stress in 2019 than in 2020 year, and, in turn, an effect of GABA treatment on reducing heat stress cannot be discarded. Altogether, could explain that total crop yield was increased by 38 and 16 kg per tree, in 2019 and 2020, respectively, in GABA-treated trees with respect to control. However, the GABA used in the present experiment is quite expensive, the total cost for 100 mM GABA treatment to one tree being ca. 34 euros (3 L per tree x 3 applications). Growers usually obtain 1-1.5 euros/kg for 'Mollar de Elche' cultivar in Spain depending on the market demand. Then, even using this GABA for laboratory use, according to the 2019 results, the treatment could be economically affordable. Nevertheless, for field agronomic use the purity of the products is not necessary to be so high and the price could be highly reduced.

Fruit firmness and TSS and TA contents were not significantly affected by GABA treatments, either in fruit for the first or the second harvest dates. In addition, no significant changes occurred in TSS from the first to the second harvest date, although significant decreases occurred on TA and firmness (Table 1S). On the contrary, skin and arils colour a* parameters as well as anthocyanin content on arils were significantly increased by GABA treatments, in a dose dependent way and significant increases were also found from harvest 1 to harvest 2 (Figs. 4-6). Total phenolic content were also increased in pomegranate arils as a consequence of GABA treatments, the effects being also dose-dependent, although no significant differences were found between the two harvest dates (Fig. 7). These observed changes on quality traits, such as increases in colour and anthocyanin content and decreases in TA and firmness, between fruit from the first and second harvests show the normal evolution of pomegranate maturation process (Mphahlele et al.,

2014; Pareek et al., 2015; Kumar and Gill, 2017). However, the content of TSS was similar in fruit from both harvest dates, showing similar levels of sugar accumulation. There is not available literature about the effects of preharvest GABA treatments on fruit quality traits or phenolic content, inducing anthocyanins, for comparative purposes, although some papers have been published about postharvest GABA treatments. For instance, fruit quality parameters, such as firmness and TA, were maintained at higher levels in GABA treated aonla fruit (*Emblica officinalis*) than in controls during cold storage (Ali et al., 2022), as well as in apple fruit (Zhu et al., 2022). However, no significant differences on TSS or TA among control and GABA-treated were observed in mango fruit (Rastegar et al., 2020), in agreement with the present results. Thus, the effects of GABA postharvest treatments on organoleptic quality parameters seem to be dependent on the fruit species, GABA concentration or time of application.

On the contrary, GABA postharvest treatments have been reported to increase or maintain higher levels of phenolic concentration during storage in several fruit species. For instance, postharvest GABA treatment increased total phenolic content on mango (Rastegar et al., 2020) and on table grape led to increases on phenolic acids, stilbenes, flavonoids and anthocyanidins during storage, which was attributed to lower polyphenol oxidase activity (Asgarian et al., 2022). Similarly, GABA dipping treatment of blood orange fruit led to higher phenolic and anthocyanin contents during storage (Habibi et al., 2020) and in aonla fruit led to maintenance of higher content of phenolics and flavonoids during cold storage (Ali et al., 2022), as well as in carambola (Mekontso et al., 2021). Moreover, GABA treatment also increased phenolics and anthocyanins in cornelian cherry fruits, and these effects were attributed to higher PAL and decreased PPO activities (Aghdam et al., 2019). Taking into account that total phenolic content in pomegranate arils decreases as fruit matures (Mphahlele et al., 2014; Kumar and Gill, 2017), the reduction of PPO activity as a consequence of GABA treatment would lead to higher phenolic content at harvest. In addition, some key genes involved in the flavonoid biosynthetic pathway codifying for phenylalanine ammonia lyase (PAL), 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL) and chalcon synthase (CHS) have been reported to increase by GABA treatment in leaves of poplar seedlings (Xie et al., 2019). Accordingly, GABA dipping treatment of blueberry significantly improved the activity of PAL, 4CL and cinnamate-4-hydroxylase (C4H) during storage, leading to accumulation of total phenolics and flavonoids compounds (Ge et al., 2018). Thus, some effects of GABA preharvest treatment on increasing phenolics and anthocyanins biosynthesis as well as on avoiding phenolic oxidation in pomegranate arils cannot be discarded.

Specifically in pomegranate, Nazoori et al. (2020) reported that 5 and 15 mM GABA dipping treatment of pomegranate fruit delayed anthocyanin and phenolic losses during storage, although no effects were observed for 10 mM dose, and no explanations were given for the ineffectiveness of this dose-intermediate treatment. On the other hand, aril treatment of the 'Hicaznar' cultivar with 2.5 and 5 mM GABA had not effect on total phenolic or total anthocyanin content during storage (Öz et al., 2017). However, the present experiments show a clear effect of GABA preharvest treatments on increasing total phenolic and total anthocyanin concentrations in pomegranate arils (Figs. 6 and 7) in both of the assayed experimental years, which would indicate that preharvest treatment are more effective than postharvest ones. In addition, it is worth commenting that anthocyanin content was higher in 2020 than in 2019 experiment, either in fruit from GABA-treated trees as in controls. These differences could be attributed to the temperatures occurring during the last weeks of on-tree fruit maturation. Night temperatures were lower in 2020 than in 2019 and higher differences between day-night temperatures occurred in the last year (Tables 2S and 3S), these factors being reported to increase anthocyanin biosynthesis in other red fruit such as blood orange (Butelli et al., 2012).

Finally, it is worth noting that the increase on skin and aril red colour and the anthocyanin concentration in the arils in fruit from GABA-treated fruit would lead to increase the 'Mollar de Elche' economic



profit, because this cultivar has usually commercialization problems in the international markets due to its poor coloured skin and arils. Moreover, the increase of anthocyanin treatments as a consequence of GABA treatment was higher in 2019 (58 and 82% for the first and second harvest, respectively for 100 mM dose) than in 2020 (45 and 36%, respectively). Then, the effect of GABA treatment on increase aril colour was higher as lower was its colour in control conditions, leading to solve the marketing problems of 'Mollar de Elche' cultivar due to its poor aril colouration. On the other hand, taking into account that anthocyanins and other phenolic compounds are responsible for the antioxidant properties of pomegranate fruit and for its proved health beneficial effects (Asgary et al., 2017; Panth et al., 2017; Wang et al., 2020), the GABA treatment would also provide benefits to consumers.

5. Conclusions

The present experiments show that preharvest 10–100 mM GABA treatments, could be a useful tool to increase pomegranate crop yield, which was mostly due to an increase on the number of fruit harvested per tree. Thus, GABA would have some effect on reducing the normal dropping occurring during fruit on-tree development due to environmental stressing factors such as rain or winds. In addition, GABA increased anthocyanin content in pomegranate arils, which is particularly important in a poor aril coloured cultivar as 'Mollar de Elche', leading to increase its economic value in international markets and its health beneficial effects for consumers.

Funding

This work has been funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation through Project RTI2018-09966-B-100 and the European Commission with FEDER funds.

CRediT authorship contribution statement

José M. Lorente-Mento: Investigation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Fabián Guillén:** Formal analysis, Writing – original draft, Funding acquisition. **Domingo Martínez-Romero:** Formal analysis, Writing – original draft, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Alberto Carrión-Antolí:** Formal analysis, Writing – original draft, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Daniel Valero:** Conceptualization, Visualization, Formal analysis, Writing – original draft, Funding acquisition, Writing – review & editing. **María Serrano:** Conceptualization, Visualization, Formal analysis, Writing – original draft, Funding acquisition, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors thank Miguel Hernández University for the PhD-scholarship of J.M. Lorente-Mento and to Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities for PhD-scholarship of A. Carrión-Antolí. Authors would like to express their sincere gratitude to Hegebu SL who provided the commercial field to perform the experiments.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version, at [doi:10.1016/j.scienta.2022.111633](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111633).

References

- Aghdam, M.S., Kakavand, F., Rabiei, V., Zaare-Nahandi, F., Razavi, F., 2019. γ -Aminobutyric acid and nitric oxide treatments preserve sensory and nutritional quality of cornelian cherry fruits during postharvest cold storage by delaying softening and enhancing phenols accumulation. *Sci. Hortic.* 246, 812–817. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.064>.
- Al Shoffe, Y., Nock, J.F., Zhang, Y., Watkins, C.B., 2021. Pre and post-harvest γ -aminobutyric acid application in relation to fruit quality and physiological disorder development in 'Honeycrisp' apples. *Sci. Hortic.* 289, 110431 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110431>.
- Ali, S., Anjum, M.A., Nawaz, A., Ejaz, S., Anwar, R., Khalik, G., Hussain, S., Ullah, S., Hussain, R., Saleem, M.S., Hasan, M.U., 2022. Postharvest γ -aminobutyric acid application mitigates chilling injury of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn.) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 185, 111803 <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111803>.
- Asgarian, Z.S., Karimi, R., Ghabooli, M., Maleki, M., 2022. Biochemical changes and quality characterization of cold-stored 'Sahebi' grape in response to postharvest application of GABA. *Food Chem.* 373, 131401 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131401>.
- Asgary, S., Keshvari, M., Sahebkar, A., Sarrafzadegan, N., 2017. Pomegranate consumption and blood pressure: a review. *Curr. Pharm. Des.* 23, 1042–1050. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161010103339>.
- Bartual, J., Pérez-Gago, M.B., Pomares, F., Palou, L., Intrigliolo, D.S., 2015. Nutrient status and irrigation management affect anthocyanins in 'Mollar de Elche' pomegranate. *Acta Hortic.* 1106, 85–92. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1106.14>.
- Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., Reforgiato-Recupero, G., Martin, C., 2012. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *Plant Cell* 24, 1242–1255. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.095232>.
- Cano-Lamadrid, M., Galindo, A., Collado-González, J., Rodríguez, P., Cruz, Z.N., Legua, P., Burló, F., Morales, D., Car-bonell-Barrachina, A., Hernández, F., 2018. Influence of deficit irrigation and crop load on the yield and fruit quality in Wonderful and Mollar de Elche pomegranates. *J. Sci. Food Agric.* 98, 3098–3108. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8810>.
- Faria, A., Calhau, C., 2011. The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 626–634. <https://doi.org/10.1080/10408391003748100>.
- García-Pastor, M.E., Giménez, M.J., Valverde, J.M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Valero, D., Zapata, P.J., 2020a. 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., 2020b. Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. *J. Sci. Food Agric.* 100, 145–153. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10007>.
- García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M., 2020c. The effects of salicylic acid and its derivatives on increasing pomegranate fruit quality and bioactive compounds at harvest and during storage. *Front. Plant Sci.* 11, 668. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00668>.
- Ge, Y., Duan, B., Li, C., Tang, Q., Li, X., Wei, M., Chen, Y., Li, J., 2018. γ -Aminobutyric acid delays senescence of blueberry fruit by regulation of reactive oxygen species metabolism and phenylpropanoid pathway. *Sci. Hortic.* 240, 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.044>.
- Giménez-Bastida, J.A., Ávila-Gálvez, M.Á., Espín, J.C., González-Sarrías, A., 2021. Evidence for health properties of pomegranate juices and extracts beyond nutrition: A critical systematic review of human studies. *Trends Food Sci. Technol.* 114, 410–423. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.014>.
- Habibi, F., Ramezani, A., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., 2020. Blood oranges maintain bioactive compounds and nutritional quality by postharvest treatments with γ -aminobutyric acid, methyl jasmonate or methyl salicylate during cold storage. *Food Chem.* 306, 125634 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125634>.
- Habibi, F., Ramezani, A., Rahemi, M., Eshghi, S., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., 2019. Postharvest treatments with γ -aminobutyric acid, methyl jasmonate, or methyl salicylate enhance chilling tolerance of blood orange fruit at prolonged cold storage. *J. Sci. Food Agric.* 99, 6408–6417. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9920>.
- Kumar, A., Gill, P.S., 2017. Developmental dynamics in chemical composition during fruit ripening of pomegranate. *J. Environ. Biol.* 38, 805–813. <https://doi.org/10.22438/jeb/38/5/MRN-299>.
- Li, L., Dou, N., Zhang, H., Wu, C., 2021. The versatile GABA in plants. *Plant Signal Behav.* 16, 862565. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565>.
- Li, Y., Fan, Y., Ma, Y., Zhang, Z., Yue, H., Wang, L., Li, J., Jiao, Y., 2017. Effects of exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) on photosynthesis and antioxidant system in



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



- pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under low light stress. *J. Plant Growth Regul.* 36, 436–449. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9652-8>.
- Li, Y., Lai, R., Li, W., Liu, J., Huang, M., Tang, Y., Tang, X., Pan, S., Duan, M., Tian, H., Wu, L., Wang, S., Mo, Z., 2020. γ -Aminobutyric acid regulates grain yield formation in different fragrant rice genotypes under different nitrogen levels. *J. Plant Growth Regul.* 39, 738–750. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10016-z>.
- Li, W., Liu, J., Ashraf, U., Li, G., Li, Y., Lu, W., Gao, L., Han, F., Hu, J., 2016. Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) application improved early growth, net photosynthesis, and associated physio-biochemical events in maize. *Front. Plant Sci.* 7, 919. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00919>.
- Li, X., Wasila, H., Liu, L., Yuan, T., Gao, Z., Zhao, B., Ahmad, I., 2015. Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food Chem.* 175, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.003>.
- Mekontso, F.N., Duan, W., Cisse, E.H.M., Chen, T., Xu, X., 2021. Alleviation of postharvest chilling injury of carambola fruit by γ -aminobutyric acid: physiological, biochemical, and structural characterization. *Front. Nutr.* 8, 752583 <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.752583>.
- Melgarejo-Sánchez, P., Núñez-Gómez, D., Martínez-Nicolás, J.J., Hernández, F., Legua, P., Melgarejo, P., 2021. Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 8 (1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00351-5>.
- Mphahlele, R.R., Stander, M.A., Fawole, O.A., Opara, U.L., 2014. Effect of fruit maturity and growing location on the postharvest contents of flavonoids, phenolic acids, vitamin C and antioxidant activity of pomegranate juice (cv. Wonderful). *Sci. Hortic.* 179, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.007>.
- Nazoori, F., Zamanibahramabadi, E., Mirdehghan, S.H., Rafie, A., 2020. Extending the shelf life of pomegranate (*Punica granatum* L.) by GABA coating application. *J. Food Meas. Charact.* 14, 2760–2772. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00521-1>.
- Nazoori, F., Zamanibahramabadi, E., Rafie, A., Mirdehghan, S.H., 2022. Combined application of gamma-aminobutyric acid and carnauba wax as edible coating on pomegranates in cold storage. *J. Agric. Sci. Technol.* 24, 591–602. <http://jast.modares.ac.ir/article-23-47551-en.html>.
- Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, A., Carbonell-Barrachina, A., Hernández, F., 2014. Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. *Sci. Hortic.* 165, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.021>.
- Öz, A.T., Hıçıylmaz, Ş., Yarış, T., 2017. Effects of the alternative postharvest treatments on 'Hicaznar' pomegranate fruit phytochemicals, organic acids and sugar content. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 51, S445–S449. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.65>.
- Panth, N., Manandhar, B., Paudel, K.R., 2017. Anticancer activity of *Punica granatum* (pomegranate): a review. *Phytother. Res.* 31, 568–578. <https://doi.org/10.1002/ptr.5784>.
- Pareek, S., Valero, D., Serrano, M., 2015. Postharvest biology and technology of pomegranate. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2360–2369. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7069>.
- Rastegar, S., Khankahdani, H.H., Rahimzadeh, M., 2020. Effect of γ -aminobutyric acid on the antioxidant system and biochemical changes of mango fruit during storage. *J. Food Meas. Charact.* 14, 778–789. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00326-x>.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., Zarei, A., 2017. γ -Aminobutyrate (GABA): a metabolite and signal with practical significance. *Botany* 95, 1015–1032. <https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0135>.
- Shomali, A., Aliniaieifard, S., Didaran, F., Lotfi, M., Mohammadian, M., Seif, M., Strobel, W.R., Sierka, E., Kalaji, H.M., 2021. Synergistic effects of melatonin and gamma-aminobutyric acid on protection of photosynthesis system in response to multiple abiotic stressors. *Cells* 10, 1631. <https://doi.org/10.3390/cells10071631>.
- Tozzi, F., Legua, P., Martínez-Nicolás, J.J., Núñez-Gómez, D., Giordani, E., Melgarejo, P., 2020. Morphological and nutraceutical characterization of six pomegranate cultivars of global commercial interest. *Sci. Hortic.* 272, 109557 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109557>.
- Wang, P., Zhang, Q., Hou, H., Liu, Z., Wang, Li., Rasekhamgham, R., HamedKord-Varkaneh, H., Santos, H.O., Yao, G., 2020. The effects of pomegranate supplementation on biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction: a meta-analysis and systematic review. *Complement. Ther. Med.* 49, 102358 <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102358>.
- Xie, T., Ji, J., Chen, W., Yue, J., Du, C., Sun, J., Chen, L., Jiang, Z., Shi, S., 2019. γ -Aminobutyric acid is closely associated with accumulation of flavonoids. *Plant Signal. Behav.* 14, 1604015 <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1604015>.
- Xie, W., Kong, L., Ma, L., Ashraf, U., Pan, S., Duan, M., Tian, H., Wu, L., Tang, X., Mo, Z., 2020. Enhancement of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) concentration, total yield, and quality in fragrant rice through exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) application. *J. Cereal Sci.* 91, 102900 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102900>.
- Zeng, W., Hassan, M.J., Kang, D., Peng, Y., Li, Z., 2021. Photosynthetic maintenance and heat shock protein accumulation relating to γ -aminobutyric acid (GABA)-regulated heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *S. Afr. J. Bot.* 141, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.028>.
- Zhu, J., Li, C., Fan, Y., Qu, L., Huang, R., Liu, J., Zhang, C., Ge, Y., 2022. γ -Aminobutyric acid regulates mitochondrial energy metabolism and organic acids metabolism in apples during postharvest ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 186, 111846 <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111846>.



4.4 Publicación IV

Preharvest Multiple Applications of GABA Improve Quality Traits and Antioxidant Compounds of Pomegranate Fruit during Storage

José M. Lorente-Mento, Daniel Valero, Domingo Martínez-Romero, Fátima Badiche, María Serrano y Fabián Guillén.

Horticulturae, 9(5), 534 (2023)

<https://doi.org/10.3390/horticulturae9050534>





Article

Preharvest Multiple Applications of GABA Improve Quality Traits and Antioxidant Compounds of Pomegranate Fruit during Storage

José Manuel Lorente-Mento¹, Daniel Valero² , Domingo Martínez-Romero² , Fátima Badiche²,
María Serrano^{1,*}  and Fabián Guillén² 

¹ Department of Applied Biology-CIAGRO, University Miguel Hernández, Carretera Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain; jlorente@umh.es

² Department of Food Technology-CIAGRO, University Miguel Hernández, Carretera. Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain; daniel.valero@umh.es (D.V.); dmromero@umh.es (D.M.-R.); fbadiche@umh.es (F.B.); fabian.guillen@umh.es (F.G.)

* Correspondence: m.serrano@umh.es; Tel.: +34-9-6674-9616

Abstract: GABA (γ -Aminobutyric acid) is an amino acid with diverse effects on plant development, including delayed senescence in horticultural commodities. The main goal of this research was to investigate the impact of GABA applications to pomegranate trees on the ‘Mollar de Elche’ quality traits and antioxidant compounds during storage for 60 days at 10 °C. In the 2019 experiment, pomegranate trees received foliar sprays of GABA at 10-, 50- or 100-mM concentrations at three stages of fruit development. Pomegranates harvested from GABA-treated trees exhibited enhanced fruit firmness, titratable acidity, the red color of skin and aril, and higher levels of total phenolics and total and specific anthocyanins compared to those obtained from the control group. These quality traits were maintained at higher levels during 60 days of preservation at 10 °C, and the most important effects were observed for 100 mM dose. In a 2020 experiment, GABA was sprayed at a 100 mM dose, and results were confirmed, showing a retard of the ripening process in pomegranates from GABA-treated trees concerning controls for two months of storage and an extension of their shelf life (with optimal quality traits appreciated by consumers) from 30 to 60 days. Moreover, the increase in anthocyanin content due to GABA treatments resulted in redder fruits, which would appeal more to consumers and have improved health benefits.

Keywords: *Punica granatum*; anthocyanins; phenolics; firmness; titratable acidity; total soluble solids; colour



Citation: Lorente-Mento, J.M.; Valero, D.; Martínez-Romero, D.; Badiche, F.; Serrano, M.; Guillén, F. Preharvest Multiple Applications of GABA Improve Quality Traits and Antioxidant Compounds of Pomegranate Fruit during Storage. *Horticulturae* **2023**, *9*, 534. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050534>

Academic Editors: Liqin Zhu and Jingying Shi

Received: 29 March 2023

Revised: 18 April 2023

Accepted: 24 April 2023

Published: 26 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fruit from the plant species pomegranate (*Punica granatum* L.) have high-quality properties, the most important being external visual appearance and aril colour, taste, and flavour, which make this fruit very appreciated by consumers worldwide [1–3]. In addition, pomegranate fruits provide health benefits known since ancient times. However, the scientific evidence proving these beneficial effects has been reported mainly in the last few years and attributed to antioxidant compounds, primarily phenolic compounds, including anthocyanins [4–7]. In Spain, the most important pomegranate cultivar is ‘Mollar de Elche’, which is highly appreciated by its balanced sugars-acids ratio and its small-sized seeds with a soft and thin coat, which is imperceptible when eating. Thus, this is a cultivar with excellent flavour and taste. However, ‘Mollar de Elche’ skin and aril colour is not as red as in ‘Wonderful’ and other worldwide-known cultivars due to their low concentration of anthocyanins [1,8–11]. Then, for the ‘Mollar de Elche’ cultivar is difficult to achieve good prices in international markets, in which redder cultivars are valued. To solve this problem, several studies have been performed aimed at increasing skin and aril coloration. For



Article

Preharvest Multiple Applications of GABA Improve Quality Traits and Antioxidant Compounds of Pomegranate Fruit during Storage

José Manuel Lorente-Mento ¹, Daniel Valero ², Domingo Martínez-Romero ², Fátima Badiche ²,
María Serrano ^{1,*} and Fabián Guillén ²

¹ Department of Applied Biology-CIAGRO, University Miguel Hernández, Carretera Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain; jlorente@umh.es

² Department of Food Technology-CIAGRO, University Miguel Hernández, Carretera. Beniel, km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain; daniel.valero@umh.es (D.V.); dmromero@umh.es (D.M.-R.); fbadiche@umh.es (F.B.); fabian.guillen@umh.es (F.G.)

* Correspondence: m.serrano@umh.es; Tel.: +34-9-6674-9616

Abstract: GABA (γ -Aminobutyric acid) is an amino acid with diverse effects on plant development, including delayed senescence in horticultural commodities. The main goal of this research was to investigate the impact of GABA applications to pomegranate trees on the ‘Mollar de Elche’ quality traits and antioxidant compounds during storage for 60 days at 10 °C. In the 2019 experiment, pomegranate trees received foliar sprays of GABA at 10-, 50- or 100-mM concentrations at three stages of fruit development. Pomegranates harvested from GABA-treated trees exhibited enhanced fruit firmness, titratable acidity, the red color of skin and aril, and higher levels of total phenolics and total and specific anthocyanins compared to those obtained from the control group. These quality traits were maintained at higher levels during 60 days of preservation at 10 °C, and the most important effects were observed for 100 mM dose. In a 2020 experiment, GABA was sprayed at a 100 mM dose, and results were confirmed, showing a retard of the ripening process in pomegranates from GABA-treated trees concerning controls for two months of storage and an extension of their shelf life (with optimal quality traits appreciated by consumers) from 30 to 60 days. Moreover, the increase in anthocyanin content due to GABA treatments resulted in redder fruits, which would appeal more to consumers and have improved health benefits.

Keywords: *Punica granatum*; anthocyanins; phenolics; firmness; titratable acidity; total soluble solids; colour



Citation: Lorente-Mento, J.M.; Valero, D.; Martínez-Romero, D.; Badiche, F.; Serrano, M.; Guillén, F. Preharvest Multiple Applications of GABA Improve Quality Traits and Antioxidant Compounds of Pomegranate Fruit during Storage. *Horticulturae* **2023**, *9*, 534. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050534>

Academic Editors: Liqin Zhu and Jingying Shi

Received: 29 March 2023

Revised: 18 April 2023

Accepted: 24 April 2023

Published: 26 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fruit from the plant species pomegranate (*Punica granatum* L.) have high-quality properties, the most important being external visual appearance and aril colour, taste, and flavour, which make this fruit very appreciated by consumers worldwide [1–3]. In addition, pomegranate fruits provide health benefits known since ancient times. However, the scientific evidence proving these beneficial effects has been reported mainly in the last few years and attributed to antioxidant compounds, primarily phenolic compounds, including anthocyanins [4–7]. In Spain, the most important pomegranate cultivar is ‘Mollar de Elche’, which is highly appreciated by its balanced sugars-acids ratio and its small-sized seeds with a soft and thin coat, which is imperceptible when eating. Thus, this is a cultivar with excellent flavour and taste. However, ‘Mollar de Elche’ skin and aril colour is not as red as in ‘Wonderful’ and other worldwide-known cultivars due to their low concentration of anthocyanins [1,8–11]. Then, for the ‘Mollar de Elche’ cultivar is difficult to achieve good prices in international markets, in which redder cultivars are valued. To solve this problem, several studies have been performed aimed at increasing skin and aril coloration. For



example, the application of deficit water treatment to pomegranate trees during the linear phase of on-tree fruit growth (in summer) led to increased aril anthocyanin content [12], as well as treatments with salicylates [13], oxalic acid [2] and methyl jasmonate [14] during critical points of on-tree pomegranate fruit development. These treatments would enhance the economic value of 'Mollar de Elche' pomegranate in markets worldwide apart from its health benefits because it is well known that anthocyanin pigments are responsible for aril colour also for their health-beneficial properties [4,5,7]. On the other hand, the quality of this fruit species decreases during preservation, primarily due to fruit weight loss and softening and to decreases in aril acid content, which leads to reduced fruit acceptability by loss in freshness and juiciness and taste changes [1,13–16].

γ -Aminobutyric acid (GABA), an amino acid that is not involved in protein synthesis, has several effects on plant development, the first ones reported being the induction of plant resistance to abiotic [17,18] and biotic stresses [18–20]. In addition, previous reports have shown that GABA postharvest treatments delay the senescence of horticultural commodities and increase fruit chilling tolerance, with additional effects on fruit quality preservation after storage at low temperatures [17,21–23]. For example, dipping treatment with GABA (in the range of 2.5–10 mM) decreased chilling injury (CI) symptoms and led to enhanced concentrations of bioactive compounds (mainly phenolics, flavonoids and anthocyanins) on cornelian fruit [21]. Accordingly, 200 μ M GABA postharvest treatments of mango fruits led to higher firmness levels and increased concentrations of ascorbic acid and phenolic compounds along preservation at 15 °C [24]. In blood orange fruit, reduced weight, firmness, and acidity losses during cold storage, and lower CI symptoms, have also been reported for GABA dipping treatments, these effects being dose-dependent [25,26].

The literature regarding the treatments with GABA of pomegranate fruits is scarce. Recently, Nazoori et al. [27] have reported that GABA dipping treatments at 5, 10 and 15 mM (for 15 min) maintained firmness levels, total phenolic concentration and antioxidant activity and diminished CI along preservation at 4 °C. Accordingly, edible coating based on carnauba wax, with the addition of GABA, at 5 or 10 mM, delayed the appearance of CI symptoms and preserved quality traits in 'Malas Saveh' cultivar [28]. On the other hand, GABA treatments of the pomegranate tree, applied by foliar spray during fruit development on-tree, have been reported to enhance the yield of pomegranate crop, apart from some quality attributes of fruit, such as skin and aril colour [29]. However, our current understanding, there are no previously published reports exploring the potential impacts of pomegranate trees' GABA treatments on the evolution of pomegranate quality attributes during preservation, which was the major objective of the present research. Especial emphasis was given to the effects of these treatments on anthocyanin content to increase the commercial value of this poor-coloured 'Mollar de Elche' cultivar after two months of preservation at 10 °C, with additional benefits on enhancing its antioxidant properties and healthful effects.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and GABA Treatments

Trees of pomegranate (*Punica granatum* L.) 'Mollar de Elche' grown on a farm settled at Elche (Alicante, Spain) were used for the experiments in the 2019 and 2020 growing cycles. Trees were 12 years old in 2019 and 13 years old in 2020, planted at 6 × 5 m and trained following a single stem pattern. Nitrogen and potassium, at 160 kg ha⁻¹, and phosphorus, at 80 kg ha⁻¹, were supplied as fertilizers. Irrigation was applied in agreement with agronomic practices for this crop species in the South-East of Spain. In the 2019 experiment, GABA treatments were applied, at 10, 50 or 100 mM, by sprinkling 3 L of GABA solutions (freshly prepared) to the tree canopy with an atomizer. Treatments were repeated at 15 days intervals, from 30 to 120 days after full blossom. The equatorial diameter of the fruit at the first treatment was 5–6 cm.

GABA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) freshly prepared solutions in tap water before application and contained 0.5% Tween 20. Tap water with Tween 20 at 0.5% was sprayed



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



to control trees. Three replicates were used for each treatment, composed of three trees. Fruits were harvested at the maturation stage in accordance with commercial practices, based on fruit equatorial diameter, skin colour and appropriate content of total soluble solids (ca. 14 °Brix) for this cultivar. Thus, fruits with these commercial criteria were harvested from all the experimental trees on 15 October 2019 and 8 October 2020 for storage experiments. Fifteen pomegranates were gathered randomly from each experimental group and delivered to the laboratory in two hours. Then, three lots (or replicates) of five fruits were performed randomly and stored at 10 °C for 0, 30 and 60 days. After that, fruit quality properties and bioactive compounds were measured. GABA treatments at 100 mM yielded the best results according to the highest maintenance of pomegranate fruit quality traits from harvest to the end of storage for 60 days observed for 100 mM GABA treatment. Then, this concentration was chosen to be applied in the 2020 experiment, performed in the same commercial field, and as previously described.

2.2. Fruit Quality Parameter Measures

Weight loss was measured independently in each fruit. Each fruit was weighed before and after the preservation period, and the loss of fruit weight was quantified (in percentage) based on the weight at harvest (day 0). Skin colour was also measured in individual fruits using a colorimeter, CRC-400-Konica-Minolta model (Minolta Camera Company, Tokyo, Japan). The colour was expressed in CIELab-coordinates. Three colour measures were performed on equidistant points of the fruit perimeter. The firmness of the fruit was measured with a Texture Analyser (TA.XT plus-model, from Stable Microsystems Company, Godalming, UK). The system measured the required force (N) to achieve a 5% deformation of fruit diameter and the covered distance (mm) and force/distance (N mm^{-1}) was utilized as the unit for presenting the results. After that, fruits were cut in two halves, and the colour of the arils was measured on the cut surface at three equidistant points with the colorimeter described above. Then, the arils of the five fruits of each of the three replicates were mixed to obtain a uniform sample from which ca. 50 g were pressed throughout two layers of cotton fabric to get a juice sample. Total soluble solid concentration (TSS) was measured in the juice (in duplicate and at 20 °C) by means of an Atago PR-101 model refractometer (Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan). TA (titratable acidity) was measured in the same juice (also in duplicate), by titration, up to pH 8.1, with 0.1 N NaOH by mean of a 785-DMP-Titrino-titrator-model (Metrohm, Herisau, Switzerland), as previously reported [29]. Results for all the above-measured parameters were expressed as the mean \pm standard error (SE) of three replicates. Another sample of ca. 50 g of arils for each sample was frozen and grown under liquid- N_2 and kept at -20 °C until total anthocyanins and phenolics and individual anthocyanins were measured.

2.3. Total Phenolic, Total Anthocyanin and Individual Anthocyanin Measures

The extraction of total phenolics was performed by homogenisation of 10 g of arils with 30 mL of an extraction agent containing 80% of water and 20% of methanol and NaF at 2 mM (to limit the activity of polyphenol oxidase and avoid degradation of phenolics), for 30 s, by using an Ultraturrax homogenizer (T18-basic model, from IKA company, Berlin, Germany). Then, the extracts were submitted to a centrifugation process for 10 min at $10,000 \times g$ and at 4 °C. Total phenolic content was measured, in duplicate, in the supernatant according to García-Pastor et al. [14]. In short, 50 μL of the extract was added to 2.5 mL of the reagent Folin-Ciocalteu, previously diluted in water (1:10). The sample was left at 20 °C for 2 min and thereafter, 2 mL of Na_2CO_3 were incorporated, and this mixture was vigorously shaken and left, for 20 min, into a bath of water at a temperature of 50 °C. The absorbance was recorded at 760 nm in a Shimadzu spectrophotometer (UV-Vis-1900i model, Duisburg, Germany). Total phenolic concentration was calculated according to a calibration curve previously obtained with gallic acid as standard. Results (mean \pm SE) are reported as mg of gallic acid equivalents per 100 g of fresh weight (FW). To extract total anthocyanins, 10 g of arils were homogenized as above in 30 mL of a mixture of 24% water,



25% methanol and 1% formic acid. Then, the extracts were submitted to centrifugation at $10,000 \times g$ at a temperature of 4°C for 10 min. The concentration of total anthocyanins was measured in the supernatant in duplicate by reading the absorbance at 520 nm in the same spectrophotometer above. Results are expressed as $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ of cyn 3-gluc equivalents in an FW basis, according to the formula $(Ab \times D \times V \times 100 \times 449.2) / (W \times 23,900)$, where Ab is the absorbance, D and V are dilution factor and extract volume, respectively, 449.2 is the cyn 3-gluc molecular weight, W is the sample weight, and 23,900 is the coefficient of molar absorption ($\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) of this anthocyanin. These extracts were also used to quantify individual anthocyanins after filtering through a polyvinylidene fluoride filter (Millipore, Millex HV13 model from Bedford Industries, Burlington, MA, USA) of $0.45 \mu\text{m}$. Twenty μL of the filtered extracts were injected into an HPLC system (Agilent (Santa Clara, CA, USA), 1200-Infinity series) equipped with a C18-security guard cartridge ($4.0 \times 3.0 \text{ mm}$) from Phenomenex (Macclesfield, UK) and a Luna C18 column (25 cm of length and 0.46 cm of i.d., with a particle size of $5 \mu\text{m}$, also from Phenomenex). Two mobile phases were used: A, water-formic acid at 95–5% v-v and B, acetonitrile, running at a 1 mL min^{-1} flow rate with the gradient conditions previously described [14]. Chromatograms at 520 nm were recorded, and anthocyanin quantification was carried out according to calibration curves performed with pelargonidin 3-*O*-glucoside (pelg-3-gluc), cyanidin 3,5-*O*-di-glucoside (cyn 3,5-digluc) and cyanidin 3-*O*-glucoside (cyn-3-gluc), purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). The quantification of delphinidin 3-*O*-glucoside (delph-3-gluc) was performed using cyn 3-gluc equivalents. The results, presented as $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$, were obtained from the mean \pm SE of three biological replicates.

2.4. Statistical Analysis

For the 2019 experiment, treatment as the factor was used to perform an ANOVA analysis of variance, for which version 20 of the SPSS software was used (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Tukey's test was employed to compare the means and identify any significant differences between treatments at a significance level of $p < 0.05$. A Student's *t*-test was conducted to ascertain the significance of differences between the control and treated fruit at $p < 0.05$ for the 2020 experiment. The mean \pm SE (standard error) of three replicates was used to express the data for both experiments.

3. Results

3.1. The Influence of GABA Treatments on the Physicochemical Quality Parameters of Fruit

Weight loss percentages increased from day 0 to day 60 of storage in pomegranate fruits, reaching 12.25 ± 0.55 and $13.07 \pm 1.06\%$ at day 60 in control fruits for 2019 and 2020 experiments, respectively. However, GABA treatments led to significantly lower weight losses than controls, with the best effects being found for 100 mM dose, with reductions of 44 and 30% after 60 days of storage in 2019 and 2020 experiments, respectively (Figure 1A,B). Fruit firmness at the time of harvest was increased significantly ($p < 0.05$) by 50- and 100-mM GABA treatments in the 2019 experiment. Values decreased sharply during storage, although it is worth noting that fruit firmness was significantly ($p < 0.05$) higher in fruit from GABA-treated trees than in fruit from control ones, the effects being dose-dependent (Figure 2A). Accordingly, fruit firmness was found to be significantly ($p < 0.05$) higher, either at harvest or during storage, in pomegranate from 100 mM GABA-treated trees than in controls in the 2020 experiment, with final values of 20.35 ± 0.83 and $14.04 \pm 0.81 \text{ N mm}^{-1}$, respectively (Figure 2B).

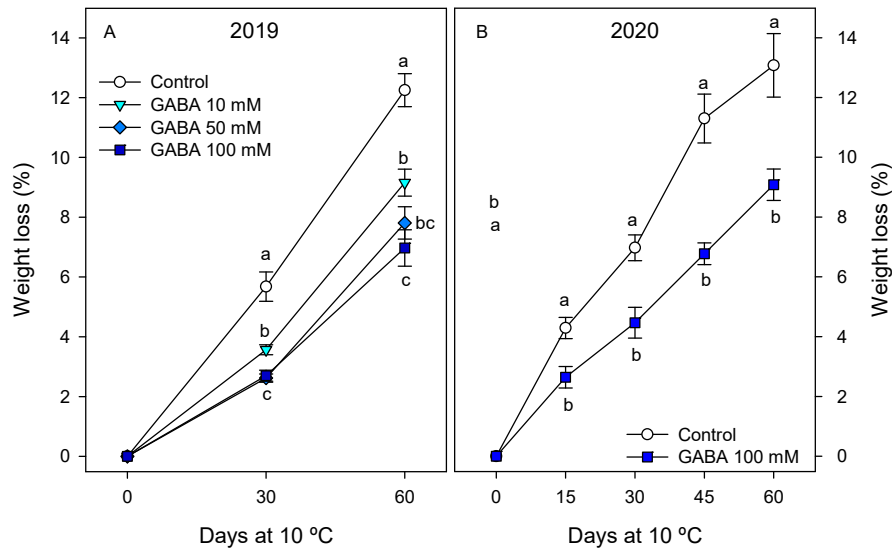


Figure 1. Weight loss of pomegranate fruits from control and 10, 50 and 100 mM γ -aminobutyric acid (GABA) treated trees along preservation at 10 °C in 2019 (A). From control and 100 mM GABA-treated trees in 2020 (B). Data are provided as the mean \pm standard error. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments for each sampling date.

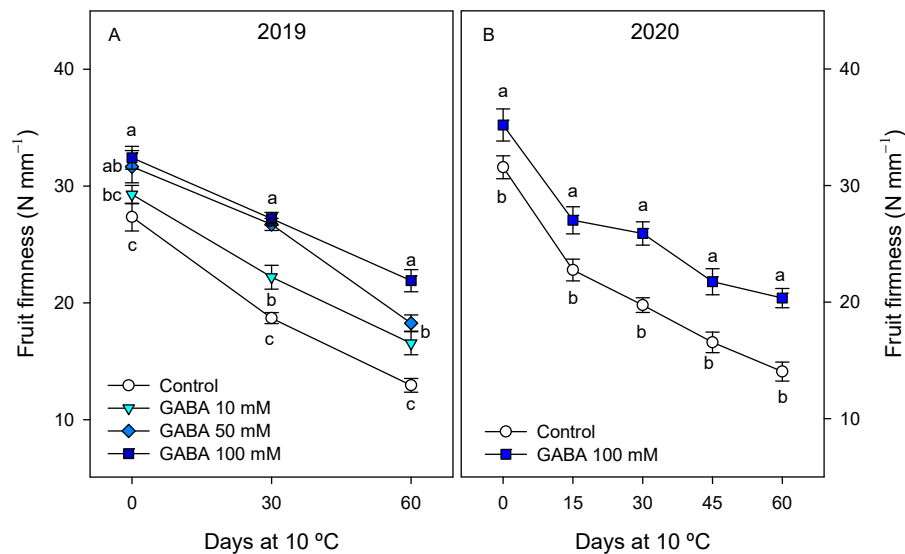


Figure 2. The firmness of pomegranate fruits from control and 10, 50 and 100 mM γ -aminobutyric acid (GABA) treated trees along preservation at 10 °C in 2019 (A) and from control and 100 mM GABA-treated trees in 2020 (B). Data are provided as the mean \pm standard error. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments for each sampling date.

The CIELab coordinates were measured in skin and arils, and Chroma and hue indexes were calculated. Results showed that the colour a^* parameter showed the highest differences between fruit picked from control and treated trees and the highest changes along storage, so results for this parameter are provided. Thus, skin colour expressed



as colour a^* parameter was significantly ($p < 0.05$) influenced by GABA treatments since it increased as a consequence of GABA treatments in a dose-dependent way in the 2019 experiment (Table 1). In the 2020 experiment, colour a^* at harvest was also significantly ($p < 0.05$) higher in pomegranates from 100 mM GABA-treated trees (15.69 ± 0.51) as compared with controls (11.51 ± 0.77). During storage, skin colour a^* increased, either in control or in treated fruits, although higher values were found in GABA-treated fruit than in control ones during the whole storage time, with 30–35% higher values at the last sampling date (Table 1). Aril colour was also increased by GABA treatments, as manifested by significant ($p < 0.05$) higher values of a^* parameter in the arils of pomegranates from GABA-treated trees concerning controls in both years of study. Increases in colour a^* parameter occurred during storage. However, values were significantly ($p < 0.05$) higher in fruit from GABA-treated trees than in controls, especially for the highest assayed dose (Figure 3A,B).

Table 1. Skin colour (a^* parameter), total soluble solids (TSS) and titratable acidity (TA) in pomegranate from control and γ -aminobutyric acid (GABA) treated trees at harvest and after 60 days of storage at 10 °C in 2019 and 2020 experiments.

2019 Experiment				
Colour a^*	Control	GABA 10 mM	GABA 50 mM	GABA 100 mM
Day 0	14.84 ± 0.44 cB	16.99 ± 0.65 bB	17.84 ± 0.67 bB	20.38 ± 0.77 aB
Day 60	17.95 ± 0.51 cA	21.05 ± 0.25 bA	21.95 ± 0.47 bA	24.38 ± 0.56 aA
2020 Experiment				
Colour a^*	Control			GABA 100 mM
Day 0	11.51 ± 0.77 bB			15.69 ± 0.51 aB
Day 60	15.44 ± 0.69 bA			19.92 ± 0.81 aA
2019 Experiment				
TSS (g 100 g ⁻¹)	Control	GABA 10 mM	GABA 50 mM	GABA 100 mM
Day 0	15.03 ± 0.04 aA	14.98 ± 0.19 aA	15.01 ± 0.08 aA	15.26 ± 0.12 aA
Day 60	15.17 ± 0.32 aA	15.19 ± 0.08 aA	14.72 ± 0.17 aA	14.90 ± 0.14 aA
2020 Experiment				
TSS (g 100 g ⁻¹)	Control			GABA 100 mM
Day 0	15.58 ± 0.15 aA			15.33 ± 0.18 aA
Day 60	15.72 ± 0.10 aA			15.43 ± 0.11 aA
2019 Experiment				
TA (g 100 g ⁻¹)	Control	GABA 10 mM	GABA 50 mM	GABA 100 mM
Day 0	0.31 ± 0.01 aA	0.32 ± 0.01 aA	0.32 ± 0.01 aA	0.33 ± 0.01 aA
Day 60	0.23 ± 0.02 bB	0.24 ± 0.01 bB	0.27 ± 0.01 abB	0.31 ± 0.01 aA
2020 Experiment				
TA (g 100 g ⁻¹)	Control			GABA 100 mM
Day 0	0.34 ± 0.02 aA			0.35 ± 0.01 aA
Day 60	0.26 ± 0.01 bB			0.32 ± 0.02 aA

Data are provided as the mean ± standard error of three replicates of five fruits. For each sampling date, different lowercase letters denote significant differences ($p < 0.05$) among treatments, and different capital letters show significant differences ($p < 0.05$) at harvest or after 60 days of storage for each treatment.

TSS in pomegranate arils ranged between 15 and 15.5 g 100 g⁻¹, and no significant differences were observed due to GABA treatments or storage time in the 2019 or 2020 years (Table 1). However, significant differences were observed in TA attributed to GABA treatments during storage time. Thus, TA values at harvest were similar in fruit from control and GABA-treated trees, and they decreased significantly ($p < 0.05$) in pomegranate arils during the whole storage period. However, these decreases were retarded in fruits from GABA-treated trees. Thus, the arils of pomegranates from treated trees showed



significant ($p < 0.05$) higher TA values at day 60 of storage, especially for the highest dose (Table 1).

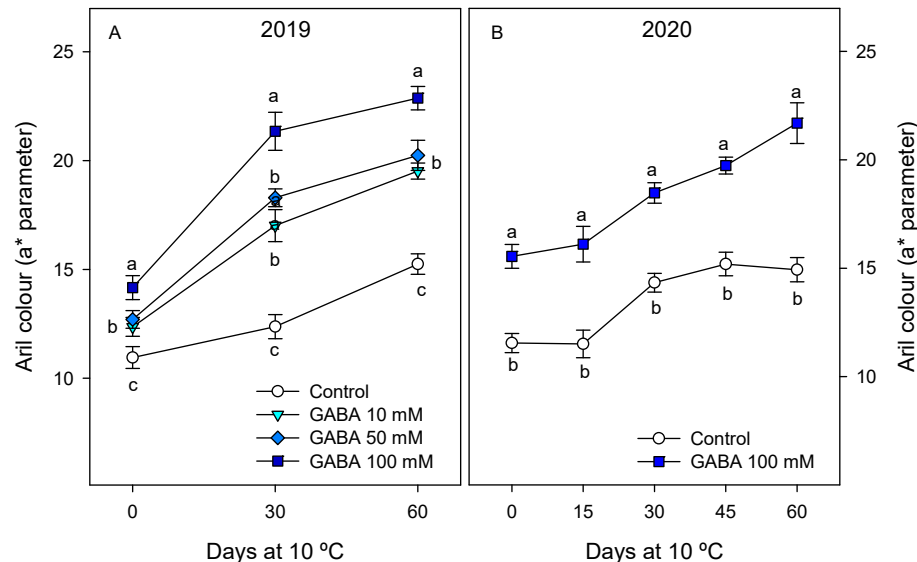


Figure 3. Aril colour a* parameter in pomegranate fruits from control and 10, 50 and 100 mM γ -aminobutyric acid (GABA) treated trees along preservation at 10 °C in 2019 (A). From control and 100 mM GABA-treated trees in 2020 (B). Data are provided as the mean \pm standard error. For each sampling date, different letters denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

3.2. Effects of GABA Treatments on Bioactive Compounds

Total anthocyanin concentration in arils at harvest was significantly ($p < 0.05$) enhanced by GABA treatments, the increase being higher as was the dose of applied GABA in the 2019 experiment, with values of 10.79 ± 0.96 and 17.35 ± 0.75 mg 100 g $^{-1}$ for fruit picked from control and 100 mM GABA-treated trees, respectively (Figure 4A). Furthermore, an increasing trend was observed in aril anthocyanin concentration during storage, either in fruit from treated trees or in controls, with values always being higher due to preharvest GABA treatments (Figure 4A). These effects of GABA treatment were confirmed in a 2020 experiment when pomegranate trees were treated with 100 mM GABA significantly ($p < 0.05$) higher total anthocyanin concentration in the last ones during the whole storage time (Figure 4B). Four individual anthocyanins were detected and quantified in pomegranate arils at harvest, and all of them were found at significant ($p < 0.05$) higher concentrations in arils of pomegranates from GABA-treated trees, the highest increases being found for the major one, cyn 3-gluc, when 100 mM GABA dose was applied (Figure 5A,B).

The content of total phenolic at harvest was 49.48 ± 1.77 mg 100 g $^{-1}$ in arils of fruit picked from control trees in the 2019 experiment and significantly higher ($p < 0.05$), 57.95 ± 0.86 , 61.08 ± 1.19 and 66.13 ± 2.52 mg 100 g $^{-1}$, in those in fruit picked from trees treated with GABA at 10, 50 and 100 mM doses, respectively. The concentration of total phenolic increased during storage in arils of fruit from control and treated trees, especially during the second month of storage, with values being significantly higher ($p < 0.05$) in GABA-treated ones as compared with controls from day 0 to day 60 of storage (Figure 6A). Accordingly, in the 2020 experiment, a similar increasing trend was observed in phenolic concentration in pomegranate arils of fruit picked from control and 100 mM GABA-treated trees, with significant ($p < 0.05$) higher values in the last ones during the 60 days storage period (Figure 6B).

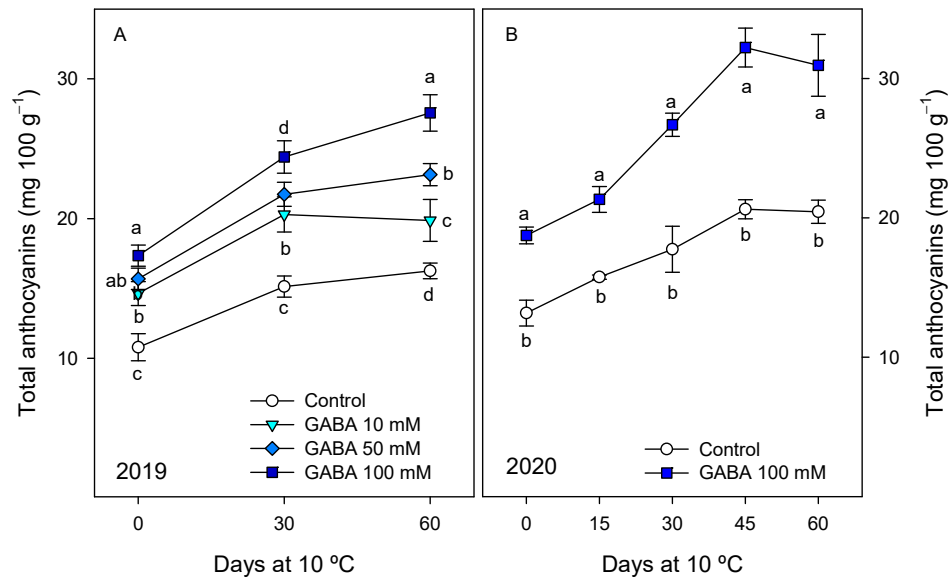


Figure 4. The concentration of total anthocyanin in arils of pomegranate fruits from control and 10, 50 and 100 mM γ -aminobutyric acid (GABA) treated trees along preservation at 10 °C in 2019 (A) and from control and 100 mM GABA-treated trees in 2020 (B). Data are provided as the mean \pm standard error. For each sampling date, different letters denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

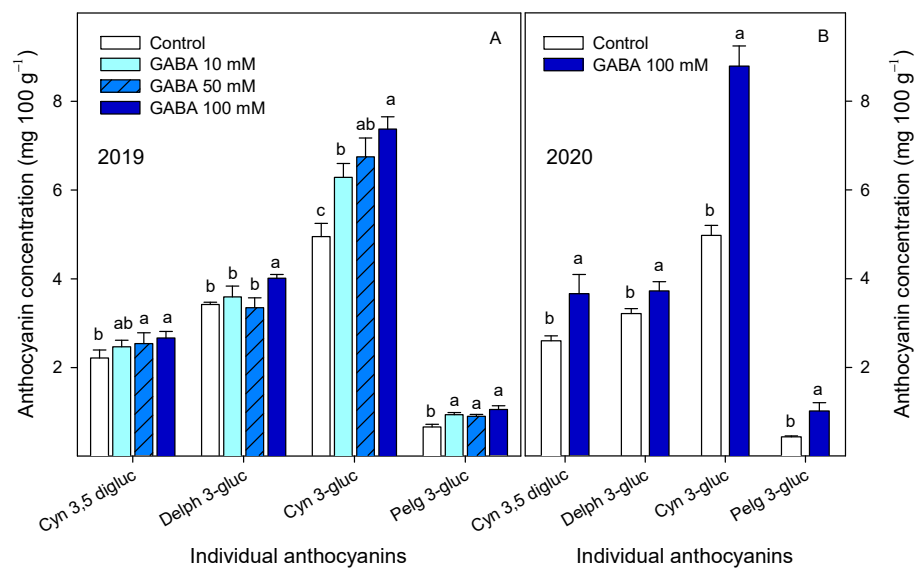


Figure 5. The concentration of individual anthocyanin in arils of pomegranate fruits from control and 10, 50 and 100 mM γ -aminobutyric acid (GABA) treated trees at harvest in 2019 (A) and from control and 100 mM GABA-treated trees in 2020 (B). Data are provided as the mean \pm standard error. For each sampling date, different letters denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

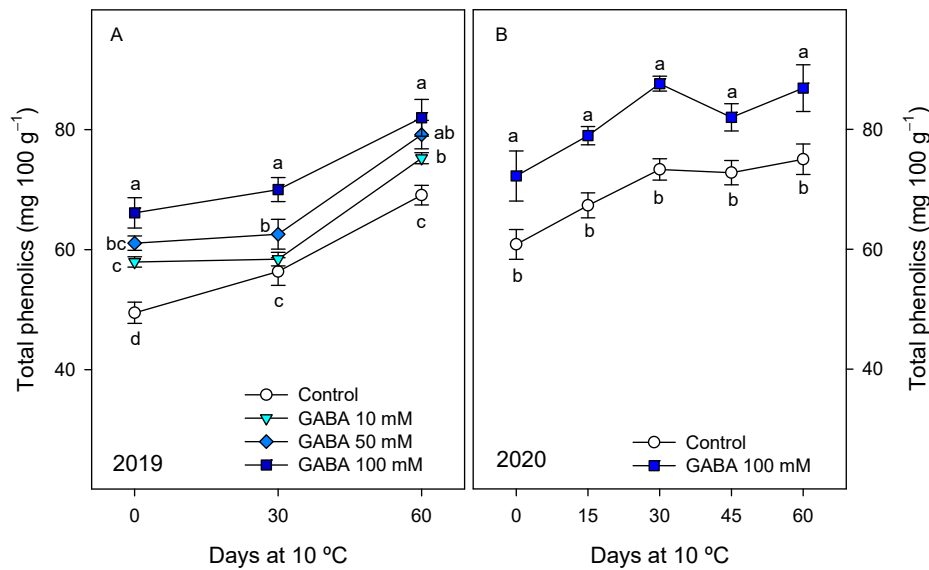


Figure 6. The concentration of total phenolic in arils of pomegranate fruits from control and 10, 50 and 100 mM γ -aminobutyric acid (GABA) treated trees along preservation at 10 °C in 2019 (A), and from control and 100 mM GABA-treated trees in 2020 (B). Data are provided as the mean \pm standard error. For each sampling date, different letters denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

4. Discussion

The primary factors influencing the quality of pomegranate fruit include the colour of the peel and arils, fruit firmness, and TSS and TA concentration in arils [1,7,15]. Results showed higher values of fruit firmness and higher red colour in both skin and arils (manifested by enhanced colour a^*) at harvest in fruit from GABA-treated trees as compared with controls. Thus, results clearly show that preharvest applications of GABA increased quality attributes, especially when applied at 100 mM dose. However, TSS content and TA levels, which are also important indicators of the pomegranate on-tree maturation process [1,2,8], were not influenced by GABA applications independently of the applied concentration. So then, an apparent effect of GABA treatment on fruit maturation was not observed.

On the other hand, these treatments improved crop yield, especially for 50 and 100 mM doses, due to an increase in the number of fruit per tree harvested [29]. In addition, decreases in fruit firmness and acidity levels and increases in weight loss and red colour of skin and arils occurred during storage, either in control as in treated fruits, which are common changes observed during the postharvest maturation process in 'Mollar de Elche' and in other cultivars of this fruit species [13,30,31]. However, it is worth noting that preharvest GABA treatments reduced weight losses, while firmness, TA, colour a^* as well as total concentrations of phenolic and anthocyanin compounds were maintained at higher levels, and no changes were observed in TSS. TSS and TA are important quality traits since they affect sweetness and sourness. They are due to fructose and glucose, as major sugars, and to malic acid, followed by succinic and citric acids, as major organic acids in the 'Mollar de Elche' cultivar [32]. Thus, maintaining TSS and TA close to values at harvest after 60 days of storage, because of 100 mM GABA treatments, would lead to fruit with the freshness, juiciness and taste consumers demand [1,13,14,33,34]. Therefore, according to the evolution of all the measured quality parameters during storage, it could be inferred that control pomegranate could be stored at 10 °C with high-quality parameters for consumption for 30 days in 2019 and 2020. However, this period could be extended up to 60 days in fruit from 100 mM GABA-treated trees, showing an effect of preharvest GABA treatments on delaying the ripening process of pomegranate during storage.



There are no available references in the literature regarding the effects of GABA treatments, applied as preharvest treatments, on the changes of fruit quality traits during storage for comparative purposes. However, there are some published reports about the effects of postharvest GABA treatments. For example, fruit quality traits, such as TA and firmness, were preserved at higher values in GABA-treated apple fruit [23] as compared with controls during cold storage, as well as on aonla fruit (*Embluca officinalis*) [35]. Accordingly, weight loss, softening, ascorbic acid losses and colour changes were delayed during storage in carambola GABA-treated fruit, leading to the maintenance of fruit quality [36]. Similar results were obtained in blueberries [37] and mango [24] fruits after postharvest GABA applications, which maintained quality parameters, delayed senescence, and prolonged shelf life, in agreement with the present results. These effects were explained by the effect of GABA on reducing reactive oxygen species levels, due to increased activity of the enzymes with antioxidant activity, namely catalase, glutathione reductase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and peroxidase. Nevertheless, authority approval would be required for practical pre- or postharvest GABA treatment applications.

It has been reported that pomegranate arils have various antioxidant compounds, mostly ascorbic acid, and phenolic compounds, including anthocyanins, other complex flavonoids, and hydrolysable tannins which are present at higher levels than in other common fruits of the Mediterranean diet. However, different concentrations have been observed based on the cultivar, maturation stage at harvest, cultural techniques, and environmental factors [9,38–41]. Total anthocyanin and phenolic concentrations in pomegranate arils at harvest were increased by GABA treatments, and these effects increased as did GABA doses in the range from 10 to 100 mM and were found at higher levels concerning those of pomegranate from control trees during the storage at 10 °C for 60 days. Regarding the anthocyanin profile, cyn 3-gluc was found at the highest concentration, followed by delph 3-gluc and cyn 3,5-digluc. In contrast, pelg 3-gluc was the minor one, in agreement with previous reports for the 'Mollar de Elche' cultivar [7,13,42–44]. However, the concentrations of each anthocyanin in these previous reports were slightly different from those in the present experiments. These are attributed to the effects of cultural practices and/or environmental conditions on anthocyanin biosynthesis. A similar anthocyanin profile has been reported previously in many other cultivars of pomegranate, although the relative concentration of each one was different depending on the cultivar. In this sense, in the 'Wonderful' cultivar, cyn 3-gluc was the anthocyanin found at the highest concentration [29].

In contrast, delph 3-gluc was the predominant one for some cultivars from Croatia [38], pelg 3,5-digluc in cultivars from Iran [45] and cyn 3,5-digluc in cultivars from Tunisia [46]. The Anthocyanin profile was not influenced by preharvest GABA treatments, independently of the assayed concentration. However, it is worth pointing out that GABA treatments increased the concentrations of all the individual anthocyanins. The highest effect is found for the significant one and 100 mM GABA dose. The increase in total and individual anthocyanin content after preharvest GABA applications led to fruit with a deeper red colour in the arils, as observed in the photographs in the graphical abstract. Thus, fruit from GABA-treated trees would be more appreciated by consumers due to their increased aril red colour [1,8–11].

On the other hand, phenolics, especially anthocyanins, have been reported to be highly correlated with antioxidant activity in pomegranate arils [14,16,34]. They are compounds responsible for the health benefits attributed to the consumption of pomegranate fruit [4–6,47–50]. Therefore, preharvest GABA treatments would lead to pomegranates with enhanced health-beneficial effects.

Previous recent reports have shown that postharvest GABA treatments led to increased phenolic compound concentrations, including anthocyanins, during storage in 'Sahebi' grapes [19], 'Moró' blood oranges [26] and cornelian cherry fruits [21]. These effects were attributed to the increased activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), the key enzyme pivotal in phenolic biosynthesis, and reduced polyphenol oxidase activity (PPO), the major



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



enzyme involved in their degradation. Similarly, phenolic, and flavonoid content were increased in blueberries during storage due to postharvest GABA treatments due to the enhanced activity of PAL, cinnamate-4-hydroxylase and 4-coumarate/coenzyme A ligase, which are two pivotal enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in plants [37]. In pomegranate fruit, Nazoori et al. [27] reported that GABA dipping treatments before storage maintained higher levels of total phenolics and anthocyanins after 90 days of storage. However, the effects were positive for 5 and 15 mM concentrations but not for 10 mM. However, this is the first report on the effects of GABA treatments of pomegranate trees, applied at key points of on-tree fruit development, on increasing phenolic and anthocyanin concentration at harvest and after prolonged storage provided. On the other hand, the increase in anthocyanin concentration in arils of 'Mollar de Elche' fruit from GABA-treated trees, either at harvest or during storage, would contribute to an increase in its income and commercial value in international markets, which appreciate more red-coloured cultivars, such as the Spanish 'Katirbasi', 'CG8', 'White' or 'Wonderful' [42,51] or other Turkish, Tunisian, Iranian or Croatian cultivars [1,9,10,38,40].

5. Conclusions

In a 2019 experiment, pomegranate trees treatment with GABA at 10, 50 and 100 mM increased the quality attributes of pomegranate fruit at the time of harvest. They were maintained during 60 days of storage at 10 °C. The most important effect is found for 100 mM dose. Similar results were obtained in the 2020 experiment, when a 100 mM GABA dose was chosen to repeat the treatments, showing a delay of the postharvest ripening process in pomegranates from GABA-treated trees concerning controls. Thus, the storage time of pomegranates with optimum quality traits for consumption could be extended from 30 days, for fruit from control trees to 60 days for those from GABA-treated ones. In addition, redder arils with enhanced anthocyanin content were observed because of preharvest multiple GABA applications, which would lead to an increase in the profit and commercial value in international markets of 'Mollar de Elche' pomegranate since fruit with enhanced skin and aril red colour would be more appreciated for consumption. Moreover, GABA applications showed an additional effect on improving antioxidant compounds, mainly total phenolics and total and individual anthocyanins, increasing the health-beneficial effects of pomegranate consumption. Future research is needed to determine if the number of GABA applications could be reduced without compromising its beneficial effects to achieve a cost-effective treatment for practical purposes.

Author Contributions: Conceptualization, F.G., D.V. and M.S.; Data curation, F.G., D.V. and M.S.; Formal analysis, F.G., D.V. and M.S.; Funding acquisition, D.V. and M.S.; Investigation, J.M.L.-M., F.G., D.M.-R. and F.B.; Methodology, J.M.L.-M., D.M.-R., F.G. and F.B.; Project administration, D.V. and M.S.; Writing an original draft, F.G.; Writing, review & editing, F.G., D.V. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Commission, with FEDER funds, contributed to founding this research through Project RTI2018-099664-B-100.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Acknowledgments: The authors thank Miguel Hernández University for Ph.D.-scholarship of J.M. Lorente-Mento and to Spanish Ministry of Science and Innovation for the fellowship of Fatima Badiche.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pareek, S.; Valero, D.; Serrano, M. Postharvest biology and technology of pomegranate. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 2360–2369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. García-Pastor, M.E.; Giménez, M.J.; Valverde, J.M.; Guillén, F.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Serrano, M.; Valero, D.; Zapata, P.J. Preharvest application of oxalic acid improved pomegranate fruit yield, quality, and bioactive compounds at harvest in a concentration dependent manner. *Agronomy* **2020**, *10*, 1522. [[CrossRef](#)]



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



3. Czieczor, L.; Bentkamp, C.; Damerow, L.; Blanke, M. Non-invasive determination of the quality of pomegranate fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2018**, *136*, 74–79. [[CrossRef](#)]
4. Asgary, S.; Keshvari, M.; Sahebkar, A.; Sarrafzadegan, N. Pomegranate consumption and blood pressure: A review. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 1042–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Panth, N.; Manandhar, B.; Paudel, K.R. Anticancer activity of *Punica granatum* (pomegranate): A review. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 568–578. [[CrossRef](#)]
6. Giménez-Bastida, J.A.; Ávila-Gálvez, M.A.; Espín, J.C.; González-Sarriás, A. Evidence for health properties of pomegranate juices and extracts beyond nutrition: A critical systematic review of human studies. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *114*, 410–423. [[CrossRef](#)]
7. Melgarejo-Sánchez, P.; Núñez-Gómez, D.; Martínez-Nicolás, J.J.; Hernández, F.; Legua, P.; Melgarejo, P. Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: A review. *Bioresour. Bioprocess.* **2021**, *8*, 2. [[CrossRef](#)]
8. Nuncio-Jáuregui, N.; Calín-Sánchez, A.; Carbonell-Barrachina, A.; Hernández, F. Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. *Sci. Hortic.* **2014**, *165*, 181–189. [[CrossRef](#)]
9. Li, X.; Wasila, H.; Liu, L.; Yuan, T.; Gao, Z.; Zhao, B.; Ahmad, I. Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food Chem.* **2015**, *175*, 575–584. [[CrossRef](#)]
10. Cano-Lamadrid, M.; Galindo, A.; Collado-González, J.; Rodríguez, P.; Cruz, Z.N.; Legua, P.; Burló, F.; Morales, D.; Carbonell-Barrachina, A.; Hernández, F. Influence of deficit irrigation and crop load on the yield and fruit quality in Wonderful and Mollar de Elche pomegranates. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 3098–3108. [[CrossRef](#)]
11. Tozzi, F.; Legua, P.; Martínez-Nicolás, J.J.; Núñez-Gómez, D.; Giordani, E.; Melgarejo, P. Morphological and nutraceutical characterization of six pomegranate cultivars of global commercial interest. *Sci. Hortic.* **2020**, *272*, 109557. [[CrossRef](#)]
12. Bartual, J.; Pérez-Gago, M.B.; Pomares, F.; Palou, L.; Intrigliolo, D.S. Nutrient status and irrigation management affect anthocyanins in 'Mollar de Elche' pomegranate. *Acta Hortic.* **2015**, *1106*, 85–92. [[CrossRef](#)]
13. García-Pastor, M.E.; Zapata, P.J.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Valero, D.; Serrano, M. The effects of salicylic acid and its derivatives on increasing pomegranate fruit quality and bioactive compounds at harvest and during storage. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. García-Pastor, M.E.; Serrano, M.; Guillén, F.; Giménez, M.J.; Martínez-Romero, D.; Valero, D.; Zapata, P.J. Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 145–153. [[CrossRef](#)]
15. Faria, A.; Calhau, C. The bioactivity of pomegranate: Impact on health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 626–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Valero, D.; Mirdehghan, S.H.; Sayyari, M.; Serrano, M. Vapor treatments, chilling, storage, and antioxidants in pomegranates. In *Processing and Impact on Active Components in Food*; Academic Press: Cambridge, MA, USA; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 189–196. [[CrossRef](#)]
17. Shelp, B.J.; Bown, A.W.; Zarei, A. γ -Aminobutyrate (GABA): A metabolite and signal with practical significance. *Botany* **2017**, *95*, 1015–1032. [[CrossRef](#)]
18. Li, L.; Dou, N.; Zhang, H.; Wu, C. The versatile GABA in plants. *Plant Signal. Behav.* **2021**, *16*, 862565. [[CrossRef](#)]
19. Asgarian, Z.S.; Karimi, R.; Ghabooli, M.; Maleki, M. Biochemical changes and quality characterization of cold-stored 'Sahebi' grape in response to postharvest application of GABA. *Food Chem.* **2022**, *373*, 131401. [[CrossRef](#)]
20. Liu, B.; Li, Y.; Zhang, X.; Liu, Y.; Liu, C.; Wang, H.; Ren, S.; Ma, F.; Liang, W.; Li, C. Exogenous GABA prevents Marssonina apple blotch damage in 'Royal Gala' apple seedling. *Sci Hortic.* **2022**, *299*, 111005. [[CrossRef](#)]
21. Aghdam, M.S.; Kakavand, F.; Rabiei, V.; Zaare-Nahandi, F.; Razavi, F. γ -Aminobutyric acid and nitric oxide treatments preserve sensory and nutritional quality of cornelian cherry fruits during postharvest cold storage by delaying softening and enhancing phenols accumulation. *Sci. Hortic.* **2019**, *246*, 812–817. [[CrossRef](#)]
22. Khan, M.I.R.; Syed, U.J.; Priyanka, C.; Himanshu, C.; Antonio, F.; Nafees, A.K.; Ansari, M.I. Role of GABA in plant growth, development and senescence. *Plant Gene* **2021**, *26*, 100283. [[CrossRef](#)]
23. Zhu, J.; Li, C.; Fan, Y.; Qu, L.; Huang, R.; Liu, J.; Zhang, C.; Ge, Y. γ -Aminobutyric acid regulates mitochondrial energy metabolism and organic acids metabolism in apples during postharvest ripening. *Postharvest Biol. Technol.* **2022**, *186*, 111846. [[CrossRef](#)]
24. Rastegar, S.; Khankahdani, H.H.; Rahimzadeh, M. Effect of γ -aminobutyric acid on the antioxidant system and biochemical changes of mango fruit during storage. *J. Food Meas. Charact.* **2020**, *14*, 778–789. [[CrossRef](#)]
25. Habibi, F.; Ramezani, A.; Rahemi, M.; Eshghi, S.; Guillén, F.; Serrano, M.; Valero, D. Postharvest treatments with γ -aminobutyric acid, methyl jasmonate, or methyl salicylate enhance chilling tolerance of blood orange fruit at prolonged cold storage. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 6408–6417. [[CrossRef](#)]
26. Habibi, F.; Ramezani, A.; Guillén, F.; Serrano, M.; Valero, D. Blood oranges maintain bioactive compounds and nutritional quality by postharvest treatments with γ -aminobutyric acid, methyl jasmonate or methyl salicylate during cold storage. *Food Chem.* **2020**, *306*, 125634. [[CrossRef](#)]
27. Nazoori, F.; Zamanibrahmabadi, E.; Mirdehghan, S.H.; Rafie, A. Extending the shelf life of pomegranate (*Punica granatum* L.) by GABA coating application. *J. Food Meas. Charact.* **2020**, *14*, 2760–2772. [[CrossRef](#)]



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



28. Nazoori, F.; Zamanibahramabadi, E.; Rafie, A.; Mirdehghan, S.H. Combined application of gamma-aminobutyric acid and carnauba wax as edible coating on pomegranates in cold storage. *J. Agric. Sci. Technol.* **2022**, *24*, 591–602.
29. Lorente-Mento, J.M.; Guillén, F.; Martínez-Romero, D.; Carrión-Antoli, A.; Valero, D.; Serrano, M. γ -Aminobutyric acid treatments of pomegranate trees increase crop yield and fruit quality at harvest. *Sci. Hortic.* **2023**, *309*, 111633. [[CrossRef](#)]
30. Sayyari, M.; Babalar, M.; Kalantari, S.; Serrano, M.; Valero, D. Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *53*, 152–154. [[CrossRef](#)]
31. Sayyari, M.; Aghdam, M.S.; Salehi, F.; Ghanbari, F. Salicyloyl chitosan alleviates chilling injury and maintains antioxidant capacity of pomegranate fruits during cold storage. *Sci. Hortic.* **2016**, *211*, 110–117. [[CrossRef](#)]
32. Medina-Santamarina, J.; Serrano, M.; Lorente-Mento, J.M.; García-Pastor, E.; Zapata, P.J.; Valero, D.; Guillén, F. Melatonin treatment of pomegranate trees increases crop yield and quality parameters at harvest and during storage. *Agronomy* **2021**, *11*, 861. [[CrossRef](#)]
33. Kulkarni, A.P.; Aradhya, S.M. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chem.* **2005**, *93*, 319–324. [[CrossRef](#)]
34. Valero, D.; Serrano, M. *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*; CRC: Boca Raton, FL, USA, 2010. [[CrossRef](#)]
35. Ali, S.; Anjum, M.A.; Nawaz, A.; Ejaz, S.; Anwar, R.; Khalik, G.; Hussain, S.; Ullah, S.; Hussain, R.; Saleem, M.S.; et al. Postharvest γ -aminobutyric acid application mitigates chilling injury of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn.) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* **2022**, *185*, 111803. [[CrossRef](#)]
36. Ngaffo Mekontso, F.; Duan, W.; Cisse, E.H.M.; Chen, T.; Xu, X. Alleviation of postharvest chilling injury of carambola fruit by γ -aminobutyric acid: Physiological, biochemical, and structural characterization. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 752583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ge, Y.; Duan, B.; Li, C.; Tang, Q.; Li, X.; Wei, M.; Chen, Y.; Li, J. γ -Aminobutyric acid delays senescence of blueberry fruit by regulation of reactive oxygen species metabolism and phenylpropanoid pathway. *Sci. Hortic.* **2018**, *240*, 303–309. [[CrossRef](#)]
38. Radunić, M.; Jukić Špika, M.; Goretta Ban, S.; Gadžđ, J.; Díaz-Pérez, J.C.; Maclean, D. Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. *Food Chem.* **2015**, *177*, 53–60. [[CrossRef](#)]
39. Mphahlele, R.R.; Stander, M.A.; Fawole, O.A.; Opara, U.L. Effect of fruit maturity and growing location on the postharvest contents of flavonoids, phenolic acids, vitamin C and antioxidant activity of pomegranate juice (cv. Wonderful). *Sci. Hortic.* **2014**, *179*, 36–45. [[CrossRef](#)]
40. Mphahlele, R.R.; Fawole, O.A.; Stander, M.A.; Opara, U.L. Preharvest and postharvest factors influencing bioactive compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.)—A review. *Sci. Hortic.* **2014**, *178*, 114–123. [[CrossRef](#)]
41. Boussaa, F.; Zaouay, F.; Burlo-Carbonell, F.; Nuncio-Jáuregui, N.; Gmati, M.; El Arbi, B.; Melgarejo, P.; Hernandez, F.; Mars, M. Combined effects of cropping system and harvest date determine quality and nutritional value of pomegranate fruits (*Punica granatum* L. cv. Gabsi). *Sci. Hortic.* **2019**, *249*, 419–431. [[CrossRef](#)]
42. Mena, P.; Gironés-Vilaplana, A.; Martí, N.; García-Viguera, C. Pomegranate varietal wines: Phytochemical composition and quality parameters. *Food Chem.* **2012**, *133*, 108–115. [[CrossRef](#)]
43. Laribi, A.I.; Palou, L.; Intrigliolo, D.S.; Nortes, P.A.; Rojas-Argudo, C.; Taberner, V.; Bartual, J.; Pérez-Gago, M.B. Effect of sustained and regulated deficit irrigation on fruit quality of pomegranate cv. ‘Mollar de Elche’ at harvest and during cold storage. *Agric. Water Manag.* **2013**, *125*, 61–70. [[CrossRef](#)]
44. Gil, M.I.; García-Viguera, C.; Artés, F.; Tomás-Barberán, F.A. Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *68*, 77–81. [[CrossRef](#)]
45. Mousavinejad, G.; Emam-Djomeh, Z.; Rezaei, K.; Khodaparast, M.H. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1274–1278. [[CrossRef](#)]
46. Hasnaoui, N.; Mars, M.; Ghaffari, S.; Trifi, M.; Melgarejo, P.; Hernandez, F. Seed and juice characterization of pomegranate fruits grown in Tunisia: Comparison between sour and sweet cultivars revealed interesting properties for prospective industrial applications. *Ind. Crops Prod.* **2011**, *33*, 374–381. [[CrossRef](#)]
47. Doostkam, A.; Bassiri-Jahromi, S.; Irvani, K. *Punica granatum* with multiple effects in chronic diseases. *Int. J. Fruit Sci.* **2020**, *20*, 471–494. [[CrossRef](#)]
48. Mattioli, R.; Francioso, A.; Mosca, L.; Silva, P. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules* **2020**, *25*, 3809. [[CrossRef](#)]
49. Wang, P.; Zhang, Q.; Hou, H.; Liu, Z.; Wang, L.; Rasekhamgham, R.; HamedKord-Varkaneh, H.; Santos, H.O.; Yao, G. The effects of pomegranate supplementation on biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction: A meta-analysis and systematic review. *Complement. Ther. Med.* **2020**, *49*, 102358. [[CrossRef](#)]
50. Fernandes, L.; Pereira, J.A.; Lopéz-Cortés, I.; Salazar, D.; González-Álvarez, J.; Ramalhosa, E. Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 1799–1814. [[CrossRef](#)]
51. Pirzadeh, M.; Caporaso, N.; Rauf, A.; Shariati, M.A.; Yessimbekov, Z.; Khan, M.U.; Imran, M.; Mubarak, M.S. Pomegranate as a source of bioactive constituents: A review on their characterization, properties and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 982–999. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



4.5 Publicación V

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

José M. Lorente-Mento, María Serrano, Domingo Martínez-Romero, María Celeste Ruiz-Aracil, Daniel Valero y Fabián Guillén.

Foods, 13(6), 10060 (2023)



<https://doi.org/10.3390/foods13010060>





Article

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

José Manuel Lorente-Mento, María Serrano , Domingo Martínez-Romero , María Celeste Ruiz-Aracil , Daniel Valero  and Fabián Guillén * 

Postharvest Research Group of Fruit and Vegetables, CIAGRO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

* Correspondence: fabian.guillen@umh.es; Tel.: +34-96-6749-656



Citation: Lorente-Mento, J.M.; Serrano, M.; Martínez-Romero, D.; Ruiz-Aracil, M.C.; Valero, D.; Guillén, F. 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* **2024**, *13*, 60. <https://doi.org/10.3390/foods13010060>

Academic Editors: Zisheng Luo and Dong Li

Received: 10 November 2023

Revised: 19 December 2023

Accepted: 21 December 2023

Published: 22 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Spain is one of the main contributors to global pomegranate production. Pomegranate presents a challenge for preservation at suboptimal temperatures. Preserving this fruit for an extended period is challenging due to its susceptibility to chilling injury (CI). For this reason, we have examined different postharvest treatments to extend the pomegranate shelf life and their potential impact on reducing CI. For this reason, two postharvest treatments have been applied: 1-Methylcyclopropene (1000 nL L⁻¹ 1-MCP) and methyl jasmonate vapors (0.01 mM MeJA), a natural elicitor found in many plant organs that induces a wide range of physiological processes, including the activation of defense mechanisms against stress. Following the application of these treatments and subsequent fruit storage at 2 °C for 90 days, maintenance of firmness and membrane integrity was observed. Additionally, a positive synergic effect was observed in these quality traits when combining both substances (1-MCP + MeJA), especially with regard to delaying weight loss, the external color evolution, and total polyphenol accumulation. On the other hand, MeJA treatment alone or in combination with 1-MCP also increased the anthocyanin content in arils, thereby enhancing the fruit quality. In general, the best results were observed when these two different technologies were applied as a combined treatment, especially in terms of maintaining quality traits such as fruit firmness and total acidity and reducing weight loss and CI. This is the first time that these two substances have been tested together in any fruit species, and their simultaneous application in the same container represents an innovative approach that could be an interesting tool for commercial purposes.

Keywords: chilling injury; elicitor; 1-MCP; *Punica granatum* L.; quality; storage

1. Introduction

Pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit is a plant species that originated in the Middle East but has spread throughout the Mediterranean and other countries over the years [1]. Currently, pomegranate is widely valued by consumers primarily for its sensory qualities and the existence of beneficial compounds like flavonoids, anthocyanins, and tannins. Scientific research has revealed that these compounds, particularly with their antioxidant properties, can contribute positive effects to human health and could be used as a preventive strategy for different diseases, such as cardiovascular diseases, diabetes, cancer, etc. [2,3]. Pomegranate fruit, once harvested, continues its metabolic activity, leading to different alterations that cause a decrease in quality. Among the most frequent alterations are dehydration, increased respiratory rate, and rotting. Currently, there are different technologies that help to delay pomegranate fruit senescence, such as cold storage, which prolongs fruit quality during its storage. However, temperatures below 5 °C cause pomegranate chilling injury (CI) [4], which results in discoloration and pitting of the pomegranate peel



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



and aril browning. In this sense, CI contributes to a greater presence of microorganisms and, therefore, to the rot incidence [5]. In recent years, different methods or strategies have been used and/or studied to help minimize the presence of CI in pomegranate fruit. For example, it has been observed that physical barriers such as packaging or wrapping with different films successfully maintain quality traits during refrigerated storage [6] and also reduce CI at suboptimal temperatures [7]. With respect to chemical treatments, salicylic acid (SA) has the potential to decrease both ethylene production and the respiration rate, maintaining pomegranate quality during postharvest storage at low temperatures [8]. In this sense, SA stimulates CI tolerance by activating antioxidant systems and increasing resistance to different pathogens [9]. Other chemical substances such as methyl salicylate, γ -aminobutyric acid (GABA), or glycine betaine were able to reduce CI in pomegranate, orange, and kiwifruit during storage [10–12]. Other strategies as intermittent warming, controlled atmosphere, or the application of nitric oxide have demonstrated success in controlling CI [13]. Methyl jasmonate (MeJA) is an elicitor that stimulates plant growth and development and is involved in the plant defense system against several biotic and abiotic stresses [14]. For this reason, it has been applied to maintain fruit quality stored at suboptimal temperatures [15]. Additionally, in previous studies we have observed that MeJA solutions applied at pre- and postharvest reduced CI in the pomegranate rind when stored at 2 °C, which has been linked to higher stability of the cell membranes [16]. It has also been shown that MeJA solutions improve the antioxidant activity in pomegranate arils [17,18] and other non-climacteric fruit, such as strawberries stored at 1 °C [19]. On the other hand, blocking ethylene action with 1-methylcyclopropene (1-MCP) can reduce fruit senescence after harvest as well as CI [20]. Similar effects were observed after applying 1-MCP to kiwifruit [21]. Recently, different studies displayed a synergistic effect between the combination of 1-MCP with different plant-origin substances such as salicylic acid derivatives, essential oils, or melatonin [22–24]. For example, several studies evaluating the effect of MeJA treatments in comparison with 1-MCP obtained positive effects with both technologies in different fruit species such as kiwifruit and peach [25,26]. Nevertheless, to the best of our knowledge, this is the first time in which a combined treatment with these two different fumigation technologies has been applied to evaluate CI in any fruit species. For this reason, in this study, we have evaluated the potential of these technologies, combined or separately, on pomegranate fruit to assess their impact on fruit shelf life and against CI during cold storage.

2. Materials and Methods

2.1. Fruit Material and Postharvest Treatments

The harvested fruit (*Punica granatum* L. cv. Mollar de Elche) were selected in accordance with the size homogeneity, external color, and soluble-solid-level (14–15° Brix) characteristics of this variety. In preliminary experiments, 0.01, 0.1, or 1 mM MeJA vapor applications were assayed alone or in combination with 1-MCP [27], and the most effective conditions that reduced CI symptoms and delayed other quality parameters (0.01 mM + 1-MCP) were selected. For this reason, in the present study, MeJA treatment (0.01 mM) was assayed alone or in combination with 1-MCP (1000 nL L⁻¹) for 24 h under room temperature conditions, as recommended by Li et al. [26] for 1-MCP treatments in pomegranate fruit. The application of 1-MCP treatments was conducted by combining tablets available commercially with an activator solution. All these chemicals were supplied by SmartFresh (Agro-Fresh Inc., Philadelphia, PA, USA). Treatments were assayed in 3 replicates, using batches of 15 pomegranates containing 5 fruits per replicate and sampling time. The different lots were placed inside distinct sealed containers. For MeJA treatments, the necessary volume of this substance required to achieve the desired concentration was placed on a filter paper at the container's bottom, and the container was immediately closed so that it was airtight. MeJA treatments for each replicate were applied in the vapor phase for 24 h at 20 °C either alone or combined with 1-MCP (1000 nL L⁻¹). Another batch without treatment was stored in similar containers under the same conditions (Control).



After the treatments, the pomegranate fruit were removed and transferred to suboptimal temperatures (2 °C) and 85% RH to trigger CI [10]. Samples were studied over a period of 90 days in periods of 30 days of refrigerated storage plus 3 days at room temperature.

2.2. Postharvest Quality Parameters

Respiration rate was measured in a secure airtight 3.7 L container for a duration of 60 min, using 5 fruits per replicate and treatment. Subsequently, a 1 mL gas sample was extracted from the headspace, and carbon dioxide levels were measured using a Shimadzu 14B gas chromatograph (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany) equipped with a thermal conductivity detector. The chromatographic parameters have been detailed in previous studies by Martínez-Romero et al. [28]. This parameter was elucidated as $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. The weight loss of pomegranates was evaluated and calculated in relation to the fruit weight at the beginning of the experiment. Fruit softening was measured in each fruit, using a flat probe in a TX-XT2i texture analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK), applying the necessary force to achieve a 5% deformation of the fruit diameter. The obtained results were displayed as the ratio of the applied force to the distance covered (N mm^{-1}), presented in this study as the mean \pm standard error (ES). Outer-rind color parameters were evaluated individually at three different areas across the equatorial area of 5 fruits per replicate. Color evaluations were assayed for each pomegranate on the skin (external) and arils using a colorimeter (CRC400, Minolta Camera Co., Tokyo, Japan). CIE hue angle* ($180 + \tan^{-1} b^*/a^*$, if $a^* < 0$) results were displayed as the mean \pm SE ($n = 3$) [17]. Then, after cutting the pomegranate fruit in half, 3 simultaneous measurements were collected on the aril surface for each pomegranate individually to evaluate the internal color. Thereafter, the skin and arils were taken separately from all the fruits in each replicate and mixed homogeneously. Evaluation of the total content of soluble solids (TSS) from each replicate was performed in duplicate with a refractometer at 20 °C (Atago PR-101, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan) by squeezing the arils obtained from the 5 fruits of each replicate, using two layers of cotton cloth. This filtered and homogenized juice of each replica was evaluated, and the results were displayed in $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$. In each of these juices, the titratable acidity (TA) was also evaluated. The evaluations were measured in duplicate by titration in 1 mL of diluted (25 mL) juice (785 DMP Titrino, Metrohm). The registered observations were displayed as g malic acid equivalent per 100 g^{-1} as described for pomegranates by García-Pastor et al. [17].

2.3. Bioactive Compounds

To determine the polyphenol content, 5 g of arils or 5 g of rind from each sample per replicate were mixed and blended in 15 mL of methanol:water (8:2) containing 2 mM sodium fluoride (with the aim of deactivating polyphenol oxidase enzyme activity and preventing polyphenol breakdown) for 60 s with a homogenizer. Extractions were subjected to centrifugation ($10,000 \times g$) at 4 °C for 15 min. The supernatant was evaluated with the Folin-Ciocalteu solution in duplicate for each replica to quantify the total phenolic content, following the methodology previously reported by García-Pastor et al. [17]. These authors also described the method to evaluate the anthocyanin content. These bioactive compounds were obtained by extraction from 5 g of arils and homogenization for 1 min in 15 mL of methanol/formic acid/water (80:1:19) solution with a homogenizer (Ultraturrax, T18 basic, IKA, Berlin, Germany). The extracted samples were subjected to centrifugation ($10,000 \times g$) at 4 °C for a duration of 15 min. Finally, the anthocyanin content was evaluated in the supernatant in duplicate at 520 nm (UV-1900i, Shimadzu, Duisburg, Germany). The total anthocyanin content was expressed as cyanidin 3-glucoside equivalents (molecular weight of 449.2 g mol^{-1} and molar absorption coefficient of $23,900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) and represent the mean \pm SE ($n = 3$).



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



2.4. Membrane Permeability and Cold Damage

Malondialdehyde (MDA) content has been evaluated in pomegranate rind tissue, as reported by Zhang et al. [29]. Using a mortar and pestle, a 2.5 g sample was mixed and blended with 10 mL of a 10% trichloroacetic acid solution. Subsequently, supernatants were obtained after centrifuging the extract at 4 °C (10,000 × g) for a duration of 20 min. Six mL of 0.67% thiobarbituric acid was shaken with a vortex in a test tube containing part of the supernatant (2 mL). All the tubes were subsequently immersed in a water bath set at 95 °C. After 20 min in the water bath, samples were allowed to cool at room temperature and studied using spectrophotometry (1900 UV/Vis, Shimadzu, Kyoto, Japan) at 450, 532, and 600 nm. Each evaluation was performed in duplicate, and the MDA content was evaluated as $\mu\text{mol kg}^{-1}$. Membrane permeability was estimated with the method described by Yuan et al. [24] for evaluating electrolyte leakage (EL). From each treatment group, 45 disks (15 disks per replicate) with a diameter of 1 cm were obtained from the pomegranate rind. Briefly, the pomegranate disks were subjected to three successive rinses for 3 min each in deionized water. Subsequently, the disks were immersed in deionized water (50 mL) at ambient temperature for 4 h under constant shaking. After this time, the electrical conductivity (C_1) at 20 °C in these solutions was evaluated. Samples were frozen for 24 h and then exposed to high temperature (121 °C) for 15 min. All the samples were allowed to cool, and the final electrical conductivity (C_2) was measured at 20 °C. Electrolyte leakage (EL) was evaluated using the formula $EL = (C_1/C_2) \times 100$. CI to the outer and inner rind of the pomegranate was assessed visually as we recently described [7], with 9 trained evaluators scoring the affected pomegranate surface. Scores were displayed on a 5-point scale: 1 = no damage; 2 = 1–10% surface damaged; 3 = 11–30% surface damaged; 4 = 31–50% surface damaged; 5 = >50% surface damaged.

2.5. Statistical Analysis

The results were expressed as the mean \pm standard error (SE) and subjected to analysis of variance (ANOVA) tests. Significant differences ($p < 0.05$) were determined by a comparison of means conducted with the Tukey's HSD test. Distinct lowercase letters denote significant differences among treatments for the same sampling period. All statistical evaluations were determined using the SPSS software package, version 22 (IBM Corp.; Armonk, NY, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Respiration Rate, Weight Loss, and Fruit Firmness Evolution

After cold storage, pomegranates increase their respiration rate at room temperature (Figure 1A). Compared with control fruit, pomegranates treated only with 1-MCP or with MeJA displayed a similar pattern, with no significant differences ($p > 0.05$) between batches. However, respiration was significantly ($p < 0.05$) reduced when 1-MCP and MeJA were applied as a combined treatment during cold storage plus 3 days at 20 °C. At the end of the storage period, the different postharvest treatments did not show any significant differences ($p > 0.05$).

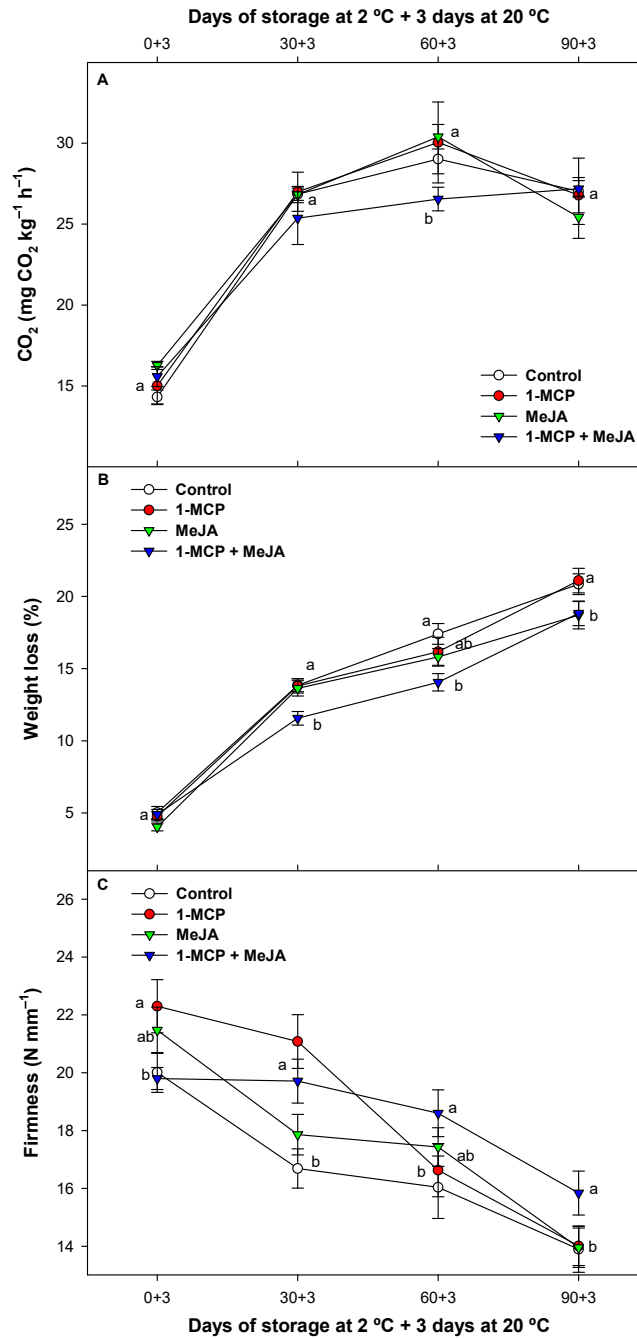


Figure 1. Respiration rate ($\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (A), weight loss (%) (B), and fruit flesh firmness (N mm^{-1}) (C) of “Mollar de Elche” pomegranate fruit after treatment with 1-methylcyclopropene (1-MCP), methyl jasmonate (MeJA), and 1-methylcyclopropene + methyl jasmonate (1-MCP + MeJA) postharvest during refrigerated storage at 2 °C plus 3 days at room temperature. Different displayed lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments on the same sampling date. Data are the mean \pm SE ($n = 3$).



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



Although 1-MCP and MeJA treatments assayed alone did not result in a decrease in metabolic activity, the favorable impact arising from the combination of these two distinct substances could be attributed to a synergistic effect of their respective properties. In this sense, both substances reduced the metabolism in other non-climacteric fruits such as cherries [30,31], apples and pineapples [32,33], or pomegranates [5,16,17] while preserving cellular membrane integrity and reducing fruit weight loss. In this study, weight loss in the pomegranate batches increased as expected during refrigerated storage (Figure 1B), but pomegranates treated with 1-MCP + MeJA showed a significantly ($p < 0.05$) delayed evolution compared with the other batches studied during the whole experiment. In this sense, in coincidence with respiration, a synergistic effect was observed with the combined application (1-MCP + MeJA) compared with these treatments when applied separately. Pomegranates treated with 1-MCP and control fruit showed the highest dehydration at the last evaluation assayed (90 days of cold storage). The increased fruit weight loss in the experiment may be due to fruit transpiration and respiration processes. In other previous studies, postharvest treatments based on MeJA and 1-MCP applied separately led to reduced pomegranate weight loss [5,10,16,17]. Fruit firmness decreased during cold storage as expected (Figure 1C), and pomegranates treated with 1-MCP maintained a greater fruit firmness compared with control pomegranates during the first storage period. However, during the last part of the cold storage period, greater firmness was obtained by combining treatments (1-MCP + MeJA), thus maintaining this effect during storage. The synergistic effect displayed by combining both technologies may be attributed to their enhanced performance when used together. 1-MCP delays senescence by blocking basal ethylene action in pomegranate fruit [27,34], while MeJA increases the cell energy status [35] and stimulates stress responses and the antioxidative capacity [36]. We previously reported the MeJA effect, when applied at preharvest or as a postharvest treatment, in increasing antioxidative activity and the bioactive compound content of total polyphenols, anthocyanins, or vitamin C in pomegranate fruit [16,17]. This trend was consistent with recent observations reported for minimally processed arils [18], which have been linked to a positive effect in increasing resilience to membrane peroxidation in many fruit species [36,37], resulting in decreased weight loss and the preservation of fruit firmness.

3.2. Pomegranate External and Internal Color

Pomegranate color is a key indicator of its quality and nutritional content. Aril and husk colors are determined by the amount of anthocyanin pigments, which can vary depending on factors such as variety, growing conditions, and ripeness [38]. CIE L^* in pomegranate husk decreased in all samples during storage conditions, with an approximate 5% reduction in all treatments after 90 days of storage. 1-MCP + MeJA was the postharvest treatment which displayed the highest CIE L^* values, compared with the remaining fruit batches, which showed significant differences ($p < 0.05$) up to two months of storage. However, these differences were not observed between the different batches after 3 months at 2 °C plus 3 days at 20 °C (Figure 2A). The delayed CIE L^* evolution has been linked to a lower rate of fruit weight loss and a delayed postharvest ripening [39] since reduced water evaporation in pomegranate fruit preserves their freshness for longer periods. The CIE hue^* angle of the pomegranate external rind also decreased during storage, with no differences ($p > 0.05$) observed over the whole study (Figure 2B).

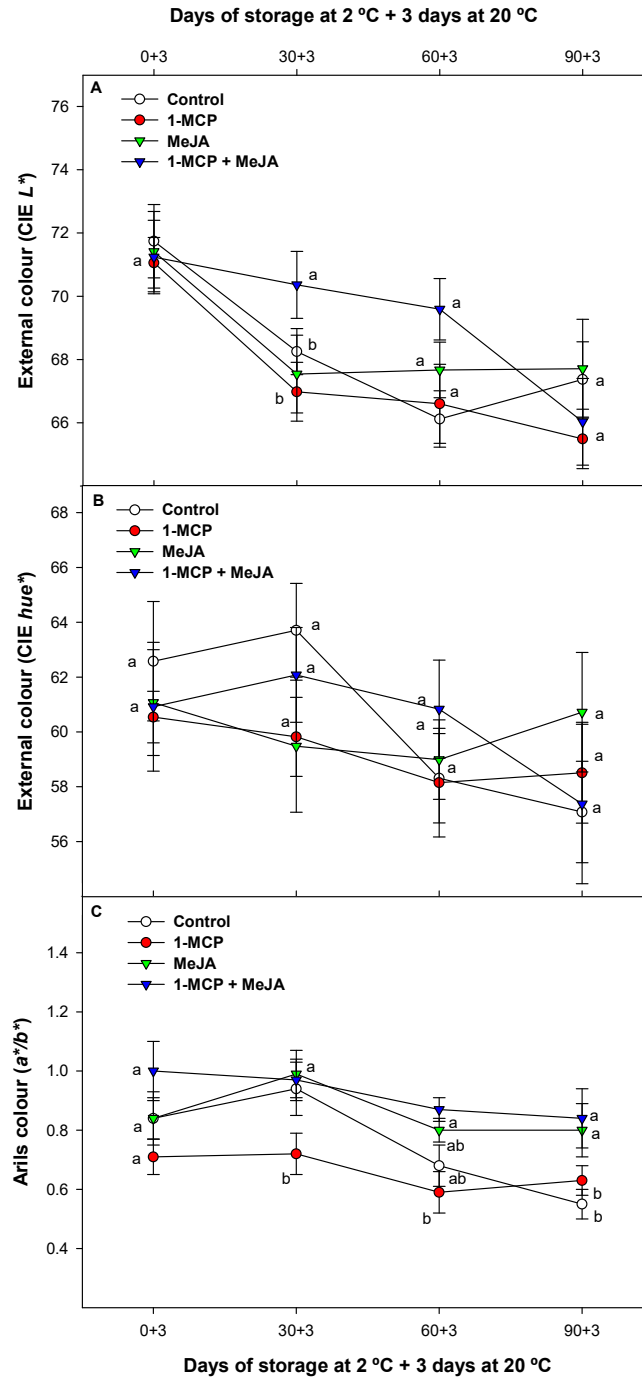


Figure 2. CIE L* (A) and CIE hue* (B) evolution in the skin and CIE a/b (C) evaluated in arils of “Mollar de Elche” pomegranates treated with 1-methylcyclopropene (1-MCP), methyl jasmonate (MeJA), and 1-methylcyclopropene + methyl jasmonate (1-MCP + MeJA) at postharvest during refrigerated storage at 2 °C plus 3 days at 20 °C. Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date. Data are the mean \pm SE ($n = 3$).



CIE hue^* is an important parameter that provides an objective measure of the fruit color; lower values are related to darker colors [38]. On the contrary, significant differences ($p < 0.05$) were observed in pomegranate arils after measuring the CIE a^*/b^* ratio, since 1-MCP batches displayed the lowest CIE a^*/b^* ratio in pomegranate arils, which correlates with a paler aril color [40] (Figure 2C). Aril color evolution was stimulated by MeJA postharvest treatment alone or in combination with 1-MCP, generally with similar values ($p > 0.05$) between them. In this sense, both technologies increased the reddish color of arils significantly ($p < 0.05$) compared with control pomegranates or with 1-MCP treatment applied alone. The deeper red color observed in MeJA-treated fruit alone or in fruit treated with MeJA combined with 1-MCP is related to an increased level of bioactive compounds, such as anthocyanins, as previously reported [16–18] and in the present study, as discussed below.

3.3. Total Soluble Solids (TSS) and Titratable Acidity (TA)

During storage, the amount of TSS showed a slight increase in all samples for up to 90 days. Notably, the 1-MCP + MeJA batch exhibited the highest TSS values, while the 1-MCP batch had the lowest. Specifically, after 90 days, the TSS content in the 1-MCP + MeJA batch was significantly higher ($p < 0.05$) compared with the control fruit. Conversely, the 1-MCP-treated batch displayed significantly lower values ($p < 0.05$) compared with the rest of the treatments evaluated (Figure 3A).

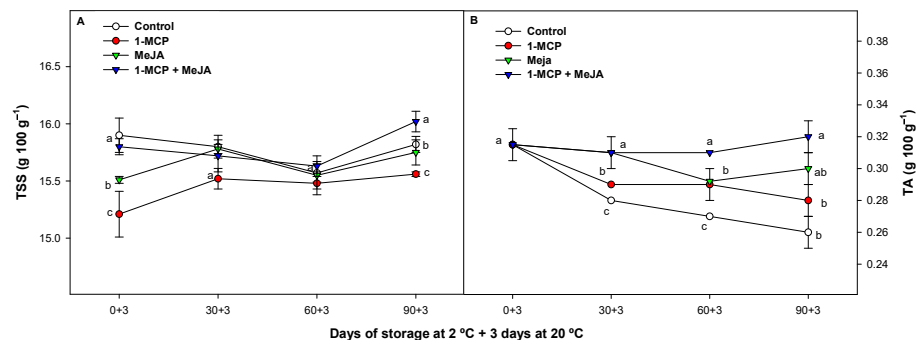


Figure 3. Total soluble solids (TSS) ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) (A) and titratable acidity (TA) ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) (B) in aril juice of “Mollar de Elche” pomegranate fruit treated with 1-methylcyclopropene (1-MCP), methyl jasmonate (MeJA), and 1-methylcyclopropene + methyl jasmonate (1-MCP + MeJA) at postharvest during cold storage at 2°C plus 3 days at 20°C . Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date. Data are the mean \pm SE ($n = 3$).

On the other hand, the TA in all the pomegranate batches slightly decreased during the study (Figure 3B). Fruit treated with 1-MCP + MeJA displayed higher TA values compared with control pomegranates after periods of 30, 60, and 90 days (13.84, 15.99, and 19.07% higher, respectively). MeJA and 1-MCP applied separately also delayed TA evolution compared with control fruit, with MeJA batches displaying the greater effectiveness. These modifications occur as part of the ordinary maturation process of pomegranates as previously reported [4,41], characterized by a decrease in TA in the pomegranate juice and an increase in TSS values (mainly sugars). In relation to our results, other authors reported that MeJA-treated arils showed effectiveness in reducing the loss of organic acids such as vitamin C [18] as well as in reducing pomegranate respiration [16,17]. In this sense, 1-MCP can reduce the metabolic activity of pomegranate fruit, delaying senescence [5,27]. These events, coincident with our results, could be related to the enhanced effect observed in maintaining the TSS content and TA when 1-MCP and MeJA were applied as a combined treatment.



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



3.4. Effect of Postharvest Treatments on Total Bioactive Compounds

Consumers value pomegranates for the presence of bioactive compounds with antioxidative attributes [16]. These phytochemical compounds are mainly phenolic substances, such as anthocyanins and other flavonoids, as well as hydrolysable tannins such as ellagitannins, gallic acid, and ellagic acid. These constituents have been documented to contribute to the health-promoting qualities associated with the consumption of pomegranate, offering protection against certain degenerative diseases [2,3]. The concentration of total polyphenols in the pomegranate rind increased during storage (Figure 4A). The highest values were observed in control fruit compared with the other treatments, whether combined or separately applied. On the other hand, the polyphenol content in arils showed an initial upward trend in all treatments during the first 60 days of cold storage, followed by a subsequent decline, probably because of the degradation stimulated by polyphenol oxidase [18]. The evolution of these bioactive compounds was delayed only for the 1-MCP-treated fruit batch ($\approx 83\text{--}100\text{ mg}^{-1}$) after 60 days of refrigerated storage compared with the rest of batches ($\approx 96\text{--}98\text{ mg}^{-1}$) (Figure 4B). The total anthocyanin content slightly increased in all pomegranates during storage (Figure 4C). However, treatments containing MeJA elicited an approximately 20% increase in these red-colored compounds. The effect was maintained through the whole storage period with significantly ($p < 0.05$) higher values for the combined treatment (1-MCP + MeJA) at the end of the study. MeJA application by itself increased the red coloration in pomegranate arils during ripening on-tree and after harvest during storage [16–18]. Additionally, in previous studies, 1-MCP has shown a positive effect reducing the polyphenol oxidase (PPO) activity in pomegranate fruit [5]. This could explain the higher anthocyanin content in the combined treatment since MeJA stimulates anthocyanin accumulation, while 1-MCP could be preventing the PPO oxidative action.

3.5. Membrane Permeability (MDA Content and EL) and Chilling Injury (CI)

Aldehydes are some of the most important products obtained after lipid peroxidation and can be indicators of catabolism. The main aldehyde compound is MDA [42]. MDA increased in all samples during cold storage. Pomegranate fruit after treatments based on 1-MCP, MeJA, or 1-MCP + MeJA showed a reduction of 22.45, 22.17, and 18.75%, respectively, after 60 days at 2 °C plus 3 more days at 20 °C. The MDA content in control fruit was, in general, significantly higher ($p < 0.05$) compared with the other pomegranate batches during the experiment. However, the MDA evolution was delayed when MeJA was applied alone compared with when 1-MCP was assessed. Moreover, pomegranate fruit treated with 1-MCP + MeJA displayed the strongest effect in reducing MDA content compared with the rest of the pomegranate batches at the end of the study (Figure 5A).

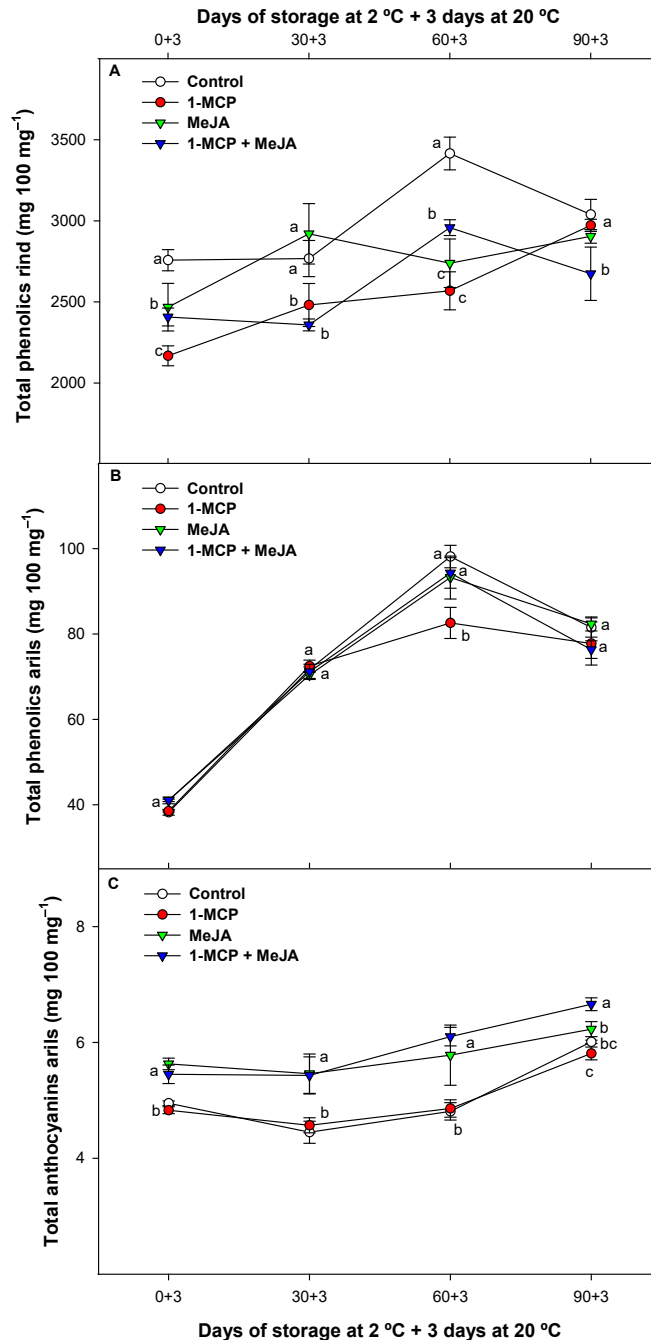


Figure 4. Total phenolic content in rind (mg 100 mg⁻¹) (A), total phenolic content in arils (mg 100 mg⁻¹) (B) and total anthocyanin content in arils (mg 100 mg⁻¹) (C) of “Mollar de Elche” pomegranate fruit treated with 1-methylcyclopropene (1-MCP), methyl jasmonate (MeJA), and 1-methylcyclopropene + methyl jasmonate (1-MCP + MeJA) at postharvest during cold storage at 2 °C plus 3 days at 20 °C. Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date. Data are the mean \pm SE ($n = 3$).

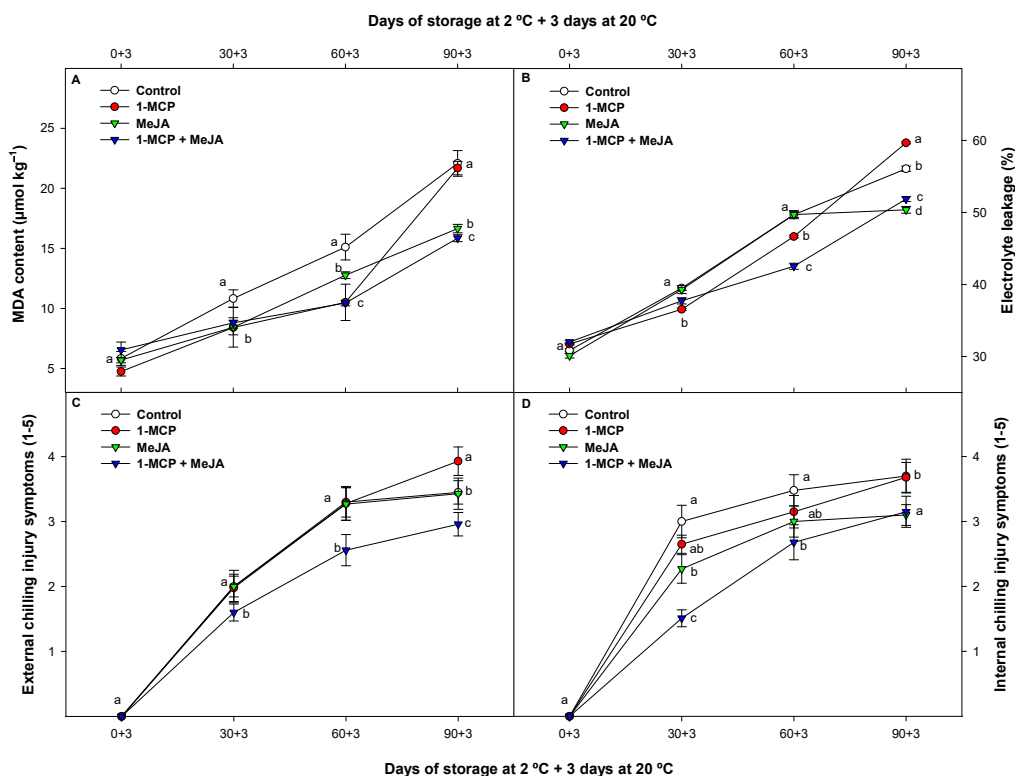


Figure 5. Evolution of malondialdehyde (MDA) content ($\mu\text{mol kg}^{-1}$) (A), electrolyte leakage (EL) (%) (B), and chilling injury symptoms in the external (C) and internal (D) peel of “Mollar de Elche” pomegranate fruit treated with 1-methylcyclopropene (1-MCP), methyl jasmonate (MeJA), and 1-methylcyclopropene + methyl jasmonate (1-MCP + MeJA) at postharvest during cold storage at 2 °C plus 3 days at 20 °C. Data are the mean \pm SE ($n = 3$). Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments for each sampling date.

High concentrations of MDA and other free radicals are poisonous in plant tissues, leading to cell and lipid membrane peroxidation. In this sense, EL indicates changes in membrane integrity during refrigerated storage [43]. In the husk tissues, EL increased during this study, although the EL was delayed significantly ($p < 0.05$) in 1-MCP batches and in pomegranates treated with the combined application (1-MCP + MeJA) compared with control pomegranates after 30 days of storage (Figure 5B). After this period, untreated and 1-MCP-treated batches exhibited higher EL levels (8.09 and 15.05%, respectively) than the 1-MCP + MeJA batch. Earlier studies have indicated that 1-MCP and MeJA may stimulate the activity of antioxidative enzymes in pomegranate [5,44] and other non-climacteric fruit [45], resulting in a reduction in MDA content and a decrease in EL, which is consistent with the results obtained in this study. Consequently, the positive effect in reducing the MDA content and EL when 1-MCP or MeJA were used individually might explain why the delay observed in the evolution of the MDA content and EL were more effective when these substances were applied together (1-MCP + MeJA). On the other hand, as expected, pomegranate fruit were susceptible to CI at 2 °C, displaying symptoms of this disorder on the external and internal rinds after 30 days of storage at 2 °C plus 3 more days at 20 °C (Figures 5C and 6). MeJA or 1-MCP treatments, when administered individually, did not show efficacy in delaying external CI compared to control fruit, except toward the end of cold storage, where both compounds demonstrated a reduction in this parameter



(Figure 5C). Nonetheless, the application of these treatments as a combined treatment throughout the entire storage period at suboptimal temperatures resulted in a significant ($p < 0.05$) delay in external CI. On the other hand, the photographs prominently illustrate the discernible impact of different treatments on internal CI (Figure 6). Also, in these photographs, the effect of 1-MCP in delaying aril color development can be observed, as well as the contrary effect displayed in MeJA-treated pomegranate alone or MeJA combined with 1-MCP.

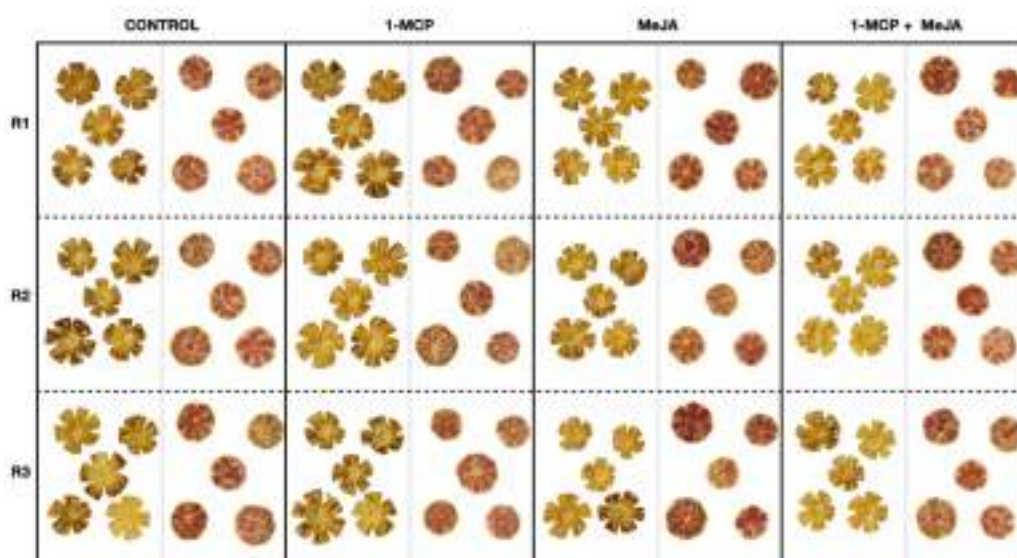


Figure 6. Internal visual aspect (mesocarp and arils) of pomegranates treated with 1-methylcyclopropane (1-MCP), methyl jasmonate (MeJA), and 1-methylcyclopropane + methyl jasmonate (1-MCP + MeJA) at postharvest after 30 days of cold storage at 2 °C plus 3 days at 20 °C.

CI in the mesocarp (internal CI) showed similar results to that previously observed for the epicarp (Figure 5D). However, internal CI was delayed not only with the combination of treatments (1-MCP + MeJA) but also in 1-MCP and especially in MeJA-treated fruit, which showed a significant cold tolerance compared with control batches. CI developed after removing the fruit from suboptimal temperatures to room temperature. Even when applied individually or in combination, neither treatment was able to completely prevent CI at suboptimal temperatures such as 2 °C. It is reasonable to assume, however, that due to the substantial delay in the onset of this damage, these technologies might be highly effective in postponing the occurrence of such damage at higher cooling temperatures. The main indicators of CI include rind desiccation, browning, pitting, surface depressions, and an increased vulnerability to decay [46]. The progression of CI is related to an elevation in membrane permeability due to modifications in lipids and proteins [47]. In this sense, 1-MCP and MeJA have shown enhanced resilience to CI in other non-climacteric species when applied alone as both these different substances lead to a common outcome in pomegranate fruit as has been displayed in this study: both of them applied alone improved membrane integrity, reducing EL and the MDA content, which is related to the extended functionality and maintenance of cellular tissues [25,36]. Additionally, MeJA treatments provide an increased energy status coincident with stress events (such as senescence or storage at suboptimal temperatures), thus reducing metabolic demands and respiration [35]. On the other hand, 1-MCP is known to reduce the basal ethylene impact on pomegranates [25], thus stimulating respiration and different metabolic pathways [34]. These events involve a multifactorial metabolic system that could be linked to the synergistic effect of 1-MCP + MeJA in reducing



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



EPSO



ReTosAAA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



the MDA content, EL, and CI under suboptimal temperatures, reducing the respiration process.

4. Conclusions

The data presented in this study suggest that methyl jasmonate vapor on pomegranate alleviates chilling injury and reduces membrane disintegration while also augmenting the anthocyanin content. Weight loss and fruit softening were delayed with the different strategies applied in this study, maintaining the total acidity. The accumulation of total phenolic compounds was delayed, but the total anthocyanin content was stimulated with strategies containing methyl jasmonate. Membrane permeability was reduced, delaying chilling injury. The methyl jasmonate effect in reducing chilling injury and delaying quality losses was higher than that observed with 1-methylcyclopropene applications. Fruit firmness and membrane stability were well controlled with 1-methylcyclopropene, leading to a delay of senescence. However, the best results in terms of fruit quality were observed when both strategies were combined. Different pomegranate cultivars may respond differently to these treatments, particularly under suboptimal storage temperatures. The different strategies assayed in this study did not completely prevent the chilling injury in pomegranate fruit. On the other hand, the results suggest that pomegranate storability at higher cooling temperatures could be enhanced by combining these different postharvest treatments, but further studies will be necessary to elucidate the limitations of these technologies based on the storage temperature. However, the observed impact of these strategies, which can be simultaneously applied, could be a new promising approach to control chilling injury and fruit senescence during cold storage in pomegranate fruit and other fruit species.

Author Contributions: J.M.L.-M.: Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing—original draft preparation, Software. M.S.: Investigation, Methodology, Formal analysis, Validation, Visualization, Writing—reviewing and editing, Supervision. D.M.-R.: Investigation, Formal analysis, Methodology, Data curation, Validation, Visualization. M.C.R.-A.: Investigation, Formal analysis, Data curation, Visualization. D.V.: Investigation, Methodology, Data curation, Validation, Visualization. F.G.: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Data curation, Validation, Visualization, Writing—reviewing and editing, Supervision, Project Administration, Funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Project AGL2015-63986R and by the European Commission with FEDER funds. The authors thank Miguel Hernández University for the PhD scholarship for J.M. Lorente-Mento.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the research reported in this paper.

References

1. Fadavi, A.; Barzegar, M.; Azizi, M.H.; Bayat, M. Note. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci. Technol. Int.* **2005**, *11*, 113–119. [[CrossRef](#)]
2. Faria, A.; Calhau, C. The bioactivity of pomegranate: Impact on health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 626–634. [[CrossRef](#)]
3. Panth, N.; Manandhar, B.; Paudel, K.R. Anticancer activity of *Punica granatum* (Pomegranate): A Review. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 568–578. [[CrossRef](#)]
4. Mirdehghan, S.H.; Rahemi, M.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Serrano, M.; Valero, D. Pre-storage application of polyamines by pressure or immersion improves shelf-life of pomegranate stored at chilling temperature by increasing endogenous polyamine levels. *Postharvest Biol. Technol.* **2007**, *44*, 26–33. [[CrossRef](#)]



5. Maghoumi, M.; Amodio, M.L.; Fatchurrahman, D.; Cisneros-Zevallos, L.; Colelli, G. Pomegranate husk scald browning during Storage: A review on factors involved, their modes of action, and its association to postharvest treatments. *Foods* **2022**, *11*, 3665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lufu, R.; Ambaw, A.; Opara, U.L. The influence of internal packaging (Liners) on moisture dynamics and physical and physiological quality of pomegranate fruit during cold storage. *Foods* **2021**, *10*, 1388. [[CrossRef](#)]
7. Lorente-Mento, J.M.; Guillén, F.; Valverde, J.M.; Valero, D.; Badiche, F.; Robles, A.; Díaz-Mula, H.M.; Serrano, M.; Martínez-Romero, D. Chilling injury control in pomegranate fruit with compostable stretchable skin film. *Sci. Hortic.* **2024**, *323*, 112480. [[CrossRef](#)]
8. Sayyari, M.; Babalar, M.; Kalantari, S.; Serrano, M.; Valero, D. Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *53*, 152–154. [[CrossRef](#)]
9. Chen, C.; Sun, C.; Wang, Y.; Gong, H.; Zhang, A.; Yang, Y.; Guo, F.; Cui, K.; Fan, X.; Li, X. The preharvest and postharvest application of salicylic acid and its derivatives on storage of fruit and vegetables: A review. *Sci. Hortic.* **2023**, *312*, 111858. [[CrossRef](#)]
10. Sayyari, M.; Babalar, M.; Kalantari, S.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Serrano, M.; Valero, D. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chem.* **2011**, *124*, 964–970. [[CrossRef](#)]
11. Habibi, F.; Valero, D.; Serrano, M.; Guillén, F. Exogenous application of glycine betaine maintains bioactive compounds, antioxidant activity, and physicochemical attributes of blood orange fruit during prolonged cold storage. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 873915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Liu, Q.; Li, X.; Jin, S.; Dong, W.; Zhang, Y.; Chen, W.; Shi, L.; Cao, S.; Yang, Z. γ -Aminobutyric acid treatment induced chilling tolerance in postharvest kiwifruit (*Actinidia chinensis* cv. Hongyang) via regulating ascorbic acid metabolism. *Food Chem.* **2023**, *404*, 134661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Maghoumi, M.; Amodio, M.L.; Cisneros-Zevallos, L.; Colelli, G. Prevention of chilling injury in pomegranates revisited: Pre- and post-harvest factors, mode of actions, and technologies involved. *Foods* **2023**, *12*, 1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Faizy, A.H.; Ozturk, B.; Aglar, E.; Yıldız, K. Role of methyl jasmonate application regime on fruit quality and bioactive compounds of sweet cherry at harvest and during cold storage. *J. Food Process. Preserv.* **2021**, *45*, 15882. [[CrossRef](#)]
15. Ozturk, A.; Yıldız, K.; Ozturk, B.; Karakaya, O.; Gun, S.; Uzun, S.; Gundogdu, M. Maintaining postharvest quality of medlar (*Mespilus germanica*) fruit using modified atmosphere packaging and methyl jasmonate. *LWT* **2019**, *111*, 117–124. [[CrossRef](#)]
16. García-Pastor, M.E.; Serrano, M.; Guillén, F.; Zapata, P.J.; Valero, D. 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 Biol. Technol.* **2020**, *167*, 111226. [[CrossRef](#)]
17. García-Pastor, M.E.; Serrano, M.; Guillén, F.; Giménez, M.J.; Martínez-Romero, D.; Valero, D.; Zapata, P.J. Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. *J. Sci. Food Agr.* **2020**, *100*, 145–153. [[CrossRef](#)]
18. El-Beltagi, H.S.; Al-Otaibi, H.H.; Ali, M.R. A new approach for extending shelf-life of pomegranate arils with combined application of salicylic acid and methyl jasmonate. *Horticulturae* **2023**, *9*, 225. [[CrossRef](#)]
19. Asghari, M.; Hasanlooee, A.R. Methyl jasmonate effectively enhanced some defense enzymes activity and total antioxidant content in harvested "Sabrosa" strawberry fruit. *Food Sci. Nutr.* **2016**, *4*, 377–383. [[CrossRef](#)]
20. Watkins, C.B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 389–409. [[CrossRef](#)]
21. Liu, H.; Pei, H.; Jiao, J.; Jin, M.; Li, H.; Zhu, Q.; Ma, Y.; Rao, J. 1-Methylcyclopropene treatment followed with ethylene treatment alleviates postharvest chilling injury of 'Xuxiang' kiwifruit during low-temperature storage. *Food Control* **2021**, *130*, 108340. [[CrossRef](#)]
22. Min, D.; Li, F.; Zhang, X.; Shu, P.; Cui, X.; Dong, L.; Ren, C.; Meng, D.; Li, J. Effect of methyl salicylate in combination with 1-methylcyclopropene on postharvest quality and decay caused by *Botrytis cinerea* in tomato fruit. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 3815–3822. [[CrossRef](#)]
23. Liu, R.; Gao, H.; Chen, H.; Fang, X.; Wu, W. Synergistic effect of 1-methylcyclopropene and carvacrol on preservation of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*). *Food Chem.* **2019**, *283*, 588–595. [[CrossRef](#)]
24. Yuan, F.; Wang, C.; Yi, P.; Li, L.; Wu, G.; Huang, F.; Huang, M.; Gan, T. The effects of combined 1-methylcyclopropene and melatonin treatment on the quality characteristics and active oxygen metabolism of mango fruit during storage. *Foods* **2023**, *12*, 1979. [[CrossRef](#)]
25. Li, H.; Suo, J.; Han, Y.; Liang, C.; Jin, M.; Zhang, Z.; Rao, J. The effect of 1-methylcyclopropene, methyl jasmonate and methyl salicylate on lignin accumulation and gene expression in postharvest 'Xuxiang' kiwifruit during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* **2017**, *124*, 107–118. [[CrossRef](#)]
26. Wang, L.; Yang, X.; Dai, B.; Wang, Y.; Du, X.; Huan, C.; Zheng, X. 1-methylcyclopropene or methyl jasmonate-induced chilling tolerance in a stony hard peach cultivar. *Sci. Hortic.* **2022**, *304*, 111279. [[CrossRef](#)]
27. Li, L.; Lichter, A.; Chalupowicz, D.; Gamrasni, D.; Goldberg, T.; Nerya, O.; Ben-Arie, R.; Porat, R. Effects of the ethylene-action inhibitor 1-methylcyclopropene on postharvest quality of non-climacteric fruit crops. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *111*, 322–329. [[CrossRef](#)]



UNIVERSITAS
Miguel Hernández



28. Martínez-Romero, D.; Serrano, M.; Carbonell, A.; Burgos, L.; Riquelme, F.; Valero, D. Effects of postharvest putrescine treatment on extending shelf life and reducing mechanical damage in apricot. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *67*, 1706–1712. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, M.; Liu, W.; Li, C.; Shao, T.; Jiang, X.; Zhao, H.; Ai, W. Postharvest hot water dipping and hot water forced convection treatments alleviate chilling injury for zucchini fruit during cold storage. *Sci. Hortic.* **2019**, *249*, 219–227. [[CrossRef](#)]
30. Sharma, M.; Jacob, J.K.; Subramanian, J.; Paliyath, G. Hexanal and 1-MCP treatments for enhancing the shelf life and quality of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Sci. Hortic.* **2010**, *125*, 239–247. [[CrossRef](#)]
31. Balbontín, C.; Gutiérrez, C.; Wolff, M.; Figueroa, C.R. Effect of Abscisic acid and methyl jasmonate preharvest applications on fruit quality and cracking tolerance of sweet cherry. *Chil. J. Agric. Res.* **2018**, *78*, 438–446. [[CrossRef](#)]
32. Mitra, A.; Selvam, S.P.; Shehabudheen, S.; Anitha, P.M.; Kumar, M.M. Efficiency evaluation of cinnamon essential oil loaded nanoliposomal coating for the post-harvest management of apple (*Malus domestica*). *Int. J. Emerg. Technol.* **2020**, *11*, 554–559.
33. Boonyaritthongchai, P.; Supapvanich, S. Effects of methyl jasmonate on physicochemical qualities and internal browning of 'Queen' pineapple fruit during cold storage. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **2017**, *58*, 479–487. [[CrossRef](#)]
34. Kader, A.A.; Chordas, A.; Elyatem, S.M. Responses of pomegranates to ethylene treatment and storage temperature. *Calif. Agric.* **1984**, *38*, 14–15.
35. Aghdam, M.S.; Jannatizadeh, A.; Luo, Z.; Paliyath, G. Ensuring sufficient intracellular ATP supplying and friendly extracellular ATP signaling attenuates stresses, delays senescence, and maintains quality in horticultural crops during postharvest life. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *76*, 67–81. [[CrossRef](#)]
36. Wang, S.Y.; Shi, X.C.; Liu, F.Q.; Laborda, P. Effects of exogenous methyl jasmonate on quality and preservation of postharvest fruits: A review. *Food Chem.* **2021**, *353*, 129482. [[CrossRef](#)]
37. Min, D.; Li, Z.; Ai, W.; Li, J.; Zhou, J.; Zhang, X.; Mu, D.; Li, F.; Li, X.; Guo, Y. The co-regulation of ethylene biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle by methyl jasmonate contributes to aroma formation of tomato fruit during postharvest ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 10822–10832. [[CrossRef](#)]
38. Pathare, P.B.; Opara, U.L.; Al-Said, F.A.J. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 36–60. [[CrossRef](#)]
39. Nunes, C.N.; Emond, J.P. Relationship between weight loss and visual quality of fruits and vegetables. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* **2007**, *120*, 235–245.
40. Giménez, M.J.; Valverde, J.M.; Valero, D.; Díaz-Mula, H.M.; Zapata, P.J.; Serrano, M.; Moral, J.; Castillo, S. Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees improve fruit quality at harvest and during storage. *Sci. Hortic.* **2015**, *197*, 665–673. [[CrossRef](#)]
41. Matityahu, I.; Glazer, I.; Holland, D.; Bar-Ya'akov, I.; Ben-Arie, R.; Amir, R. Total antioxidative capacity and total phenolic levels in pomegranate husks correlate to several postharvest fruit quality parameters. *Food Bioproc. Technol.* **2014**, *7*, 1938–1949. [[CrossRef](#)]
42. Deng, Y.; Xu, L.; Zeng, X.; Li, Z.; Qin, B.; He, N. New perspective of GABA as an inhibitor of formation of advanced lipoxidation end-products: It's interaction with malondialdehyde. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2010**, *6*, 318–324. [[CrossRef](#)]
43. Besada, C.; Llorca, E.; Novillo, P.; Hernando, I.; Salvador, A. Short-term high CO₂ treatment alleviates chilling injury of persimmon cv. Fuyu by preserving the parenchyma structure. *Food Control* **2014**, *51*, 163–170. [[CrossRef](#)]
44. Valdenegro, M.; Fuentes, L.; Bernal, M.; Huidobro, C.; Monsalve, L.; Hernández, I.; Schelle, M.; Simpson, R. Antioxidant and fatty acid changes in pomegranate peel with induced chilling injury and browning by ethylene during long storage times. *Front. Plant Sci.* **2022**, *9*, 771094. [[CrossRef](#)]
45. Zhang, C.; Huang, R.; Zhan, N.; Qin, L. Methyl jasmonate and selenium synergistically mitigative cadmium toxicity in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) plants by improving antioxidase activities and reducing Cd accumulation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2023**, *30*, 82458–82469. [[CrossRef](#)]
46. Luo, Z.; Wu, X.; Xie, Y.; Chen, C. Alleviation of chilling injury and browning of postharvest bamboo shoot by salicylic acid treatment. *Food Chem.* **2012**, *131*, 456–461. [[CrossRef](#)]
47. Bouchereau, A.; Aziz, A.; Larher, F.; Martin-Tanguy, J. Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Sci.* **1999**, *140*, 103–125. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



4.6 Publicación VI

Chilling injury control in pomegranate fruit with compostable stretchable skin film

José M. Lorente-Mento, Fabián Guillén, José Miguel Valverde, Daniel Valero, Fátima Badiche, Alba Robles, Huertas María Díaz-Mula, María Serrano, Domingo Martínez-Romero

Scientia Horticulturae, 323, 112480 (2024)

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112480>





Chilling injury control in pomegranate fruit with compostable stretchable skin film

J.M. Lorente-Mento^a, F. Guillén^b, J.M. Valverde^b, D. Valero^b, F. Badiche^b, A. Robles^b, H.M. Díaz-Mula^a, M. Serrano^a, D. Martínez-Romero^{b,*}

^a Department of Biology, EPSO, CIAGRO - University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

^b Department of Food Technology, EPSO, CIAGRO - University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Poly(butylene-co-adipate-co-terephthalate)
 Polylactide
 Anthocyanin
Punica granatum L.
 Map packaging
 Quality
 Phenolic

ABSTRACT

The use of stretch films as a second skin over fruits is a common technological solution to prevent their deterioration during postharvest storage. However, these films pose an environmental problem, and the management of this waste is a challenge. To address this issue, a new biodegradable polymer composed of a blend of butylene adipate-co-terephthalate and polylactic acid (PBAT-PLA) called Nature Fresh® has been developed to produce stretch films suitable for post-harvest use without environmental concerns. Pomegranate is a fruit that is highly sensitive to Chilling Injury (CI) at temperatures below 5 °C. To evaluate the suitability of Nature Fresh® film for pomegranate packaging, two cultivars with different sensitivity to CI, 'Bigful' and 'Mollar de Elche', were wrapped with the film and stored for 56 days at 2 °C plus 2 days at 20 °C. Control groups included fruits without film and fruits wrapped with stretch film made of linear low-density polyethylene (LLDPE), which is commonly used in post-harvest storage. Pomegranates packed in PBAT-PLA and LLDPE films showed similar evolution in the appearance of internal and external husk CI, respiration rate, ion leakage, total polyphenol, and anthocyanin content, these parameters being lower than in control fruit. However, due to differences in water vapor and gas permeability between the two films, weight loss and firmness reduction were significantly higher in pomegranates wrapped in PBAT-PLA compared to LLDPE, but this did not impact any detrimental effect on overall appearance. Internal CI was significantly ($P < 0.001$) positively correlated with fruit respiration rate, ion leakage, weight loss, total polyphenol, and anthocyanin content; while it was negatively correlated with fruit firmness, skin and aril color, soluble solids, acidity, and maturity index. In summary, the use of PBAT-PLA film presents a feasible substitution to LLDPE on maintaining the quality of pomegranates during post-harvest storage, while also aligning with worldwide initiatives aimed at decreasing plastic waste.

1. Introduction

Packaging technology for fruits and vegetables has evolved rapidly, always with the goal of helping with their preservation, commercialization, sale, and consumption. In addition to meeting these objectives, fruit and vegetable packaging is being demanded to be environmentally friendly and safe for consumers (Abdul Khalil, et al., 2018). Thus, new packaging materials with biodegradable properties and eco-friendly manufacturing techniques are being developed, which reduce greenhouse gas emissions and the formation of microplastics (Dedieu et al., 2022).

The postharvest packaging of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit is usually carried out in bulk, inside plastic, cardboard or wooden boxes,

where the fruits are arranged using either cells or natural materials such as straw that prevent movement and damage to the fruits. For this fruit, graded packaging with biodegradable plastics has not been utilized. The use of films made from biodegradable and compostable polymers such as naturally sourced poly(lactide) (PLA) or petroleum-derived poly(butylene-co-adipate-co-terephthalate) (PBAT) is being implemented in food packaging recently (Dedieu et al., 2022). However, these films often present problems for their use in the postharvest of fruit and vegetables due to their high gas permeabilities (CO₂, O₂, and water vapor), high cost, and low yield for packaging due to their poor mechanical properties (Khalid and Arif, 2022). The combination of different types of biopolymers has been used to improve the gas diffusion and properties of these biopolymers. For instance, the mixture of

* Corresponding author.

E-mail address: dmromero@umh.es (D. Martínez-Romero).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112480>

Received 29 May 2023; Received in revised form 31 August 2023; Accepted 5 September 2023

Available online 9 September 2023

0304-4238/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



PBAT/PLA leads to film with barrier properties similar to LLPE (Siegenthaler et al., 2012). However, the use of this film to wrap fruit or vegetables is limited and up to date, it has only been documented in passion fruit (Zhang et al., 2019) and broccoli florets (Paulsen et al., 2022).

Pomegranate is a fruit highly susceptible to the development of chilling injury (CI) when stored at temperatures below 5 °C after harvest (Lorente-Mento et al., 2023). CI in pomegranate is manifested by the appearance of internal darkening of the white spongy tissue that surrounds the arils and internal membranes (Kashash et al., 2016), and the presence of brown spots and punctures on the external skin, as also occurs in most tropical and subtropical fruits subjected to CI (Opara et al., 2015; Pareek et al., 2015; Mirdehghan et al., 2007a, 2007b). Storage conditions and postharvest technology help alleviate the occurrence of CI in pomegranates. For example, Di Millo et al. (2021) reduced the occurrence of CI in the 'Mollar de Elche' pomegranate cultivar by using edible coatings with hydroxypropyl methylcellulose and packaging in modified atmosphere (MAP). In addition, MAP packaging has allowed a reduction in CI in different pomegranate cultivars, including the 'Mollar de Elche' cultivar (Porat et al., 2016; Candir et al., 2018; Selcuk and Erkan, 2015; D'Aquino et al., 2010; Artés et al., 2000). Moreover, Candir et al. (2018) found that the reduction of CI in pomegranates is linked to the inhibition or delay of phenolic compound oxidation as a consequence of the lower concentration of O₂ and higher concentration of CO₂ in the atmosphere generated inside the package and in contact with the fruit.

CI affects the composition of cell membrane lipids during storage, resulting in considerable reductions in both saturated fatty acids (SFA) and unsaturated fatty acids (UFA), as well as a significant decrease in the UFA/SFA ratio (Mirdehghan et al., 2007b). It has been observed that treatments that prevent CI, such as the use of thermal treatments (Mirdehghan et al., 2007b) or elicitors such as methyl jasmonate (García-Pastor et al., 2020a) or salicylic acid (Sayyari et al., 2017), maintained a higher proportion of unsaturated fatty acids, which led to the maintenance of membrane fluidity at low storage temperatures and could be responsible for the lower electrolyte leakage and skin darkening. The decrease in the ratio of UFA/SFA has been associated with the hydrolysis of phospholipids into free fatty acids, as well as the peroxidation of UFA by the synergistic action of lipid-metabolizing enzymes such as phospholipase, lipase, and lipoxygenase (Wang et al., 2018; Lin et al., 2017). Vazquez-Hernández et al. (2020) reported that high concentrations of CO₂ help to maintain the structure of cells and their organelles, allow for the restoration of cell membranes, reduce the oxidation of fatty acids, and increase the degree of unsaturation of lipids. The use of plastic packaging that generates modified atmospheres has been widely studied as a tool to maintain fruit and vegetable quality during storage. Additionally, this technique reduces CI symptoms in a wide range of fruit and vegetable species (Flores et al., 2004; Fahmy and Nakano, 2014), including pomegranates (Artés et al., 2000). However, the reduction of CI has not been studied in pomegranates wrapped in stretchable biodegradable films.

The main objective of the study is to determine whether the use of a biodegradable film based on PLA+PBAT as a "second skin" on pomegranates can prolong their storage and reduce the incidence of CI as compared to the use of a conventional LLDPE film. Additionally, the feasibility of this type of packaging as a sustainable alternative that does not pollute the environment and can be composted after being used will be evaluated.

2. Material and methods

2.1. Materials used

The study utilized pomegranates (*Punica granatum* L.) of the Mollar de Elche and Bigful cultivars grown on a commercial farm situated in Albatera, Alicante-Spain. The fruits were harvested in 2021 ('Bigful' -

September 15th and 'Mollar de Elche' - October 9th) at commercial maturation stage, according to commercial criteria for each cultivar based on fruit size, husk color, and aril total soluble solid (TSS) and titratable acidity (TA) (Table 1).

The two films used are stretchable and self-adhesive, with a thickness of 10.1 ± 0.1 μm and specific characteristics (Table 2). The Nature Fresh® film (Fabbri Group Modena-Italy) was made from PLA and PBAT from BASF-Germany.

2.2. Experimental design

Once the fruit (~300 per each cultivar) were harvested, they were transported without delay to the postharvest laboratory at the University Miguel Hernández for further analysis. There, only the fruits that showed no signs of damage, such as bruises, sunburns, decay, etc., were selected. Additionally, three batches of 60 fruits were randomly sorted for each cultivar. The first batch was for control pomegranates (unpacked), the second batch was for packaging pomegranates in biodegradable plastic (PLA-PBAT), and the third batch was for packaging pomegranates in LLDPE. The packaging technique involved wrapping and stretching each film (25 × 25 cm) over the fruit skin at the top (corolla of the fruit) and twisting the film to close it at the peduncle zone of the fruit. An adhesive tape was applied to the closing area to prevent it from opening. The wraps were in contact with the fruit skin, like a second skin. The wrapped fruits were placed in cells with the corolla on top. In addition, 15 fruits of each cultivar were analyzed at the moment of harvest.

All fruit samples were subjected to storage at 2 °C and 90% relative humidity for a duration of 56 days. Periodic analyses were performed on three replicates of 5 fruits from each cultivar and treatment at 2-weeks intervals at 2 °C, followed by an additional 2-day period at 20 °C

2.3. CO₂ and O₂ concentration in the internal package atmosphere and respiration rate of pomegranate

O₂ and CO₂ concentrations were measured in the internal atmosphere of packages by extracting 1 mL gas sample directly from the corolla pomegranate space through the films. Two samples were taken per experimental unit to measure CO₂ and O₂ concentrations. The concentrations of CO₂ and O₂ were measured using a Shimadzu CG-14B gas chromatograph with a thermal conductivity detector and a 2 m x 1/8" CHROMOSORB 102 80/100 column, under the same conditions as the method described by Valverde et al. (2005). Results were reported as the partial pressure (kPa) of O₂ and CO₂ in the internal space of the packages.

After measuring the gas concentrations in the internal atmosphere, the films were removed from the pomegranates, and after 6 h, the respiratory rate analysis was conducted. The respiratory rate of the fruits was determined using a closed static system. Three 5 L containers with airtight seals were used for each treatment, and 5 fruits were placed in each container for one hour. Gas samples (1 mL) were taken from the headspace of each container for CO₂ chromatography analysis in the

Table 1

Fruit quality parameters at harvest according to commercial criteria. Weight, diameter, external color, titratable acidity (TA) and total soluble solids (TSS).

	cv. Bigful	cv. Mollar de Elche
Weight (g)	330.77 ± 4.36	276.05 ± 2.32
Diameter (mm)	88.67 ± 7.08	83.80 ± 6.72
Husk color	Full Red	Cream
TA (g 100 ⁻¹ mL)	0.50 ± 0.03	0.22 ± 0.01
TSS (%)	15.68 ± 0.13	15.06 ± 0.014

The presented \data represent the average ± standard error (SE) of three independent replicates, with each replicate consisting of five individual fruits.



Table 2
Composition, CO₂ (CTR), O₂ (OTR) and water vapor (WVTR) permeabilities of the two used films.

	Conventional plastic (LLDPE)	Biodegradable plastic (PLA-PBAT)
Composition	100%	5% PLA - 95% PBAT
CTR (cm ³ m ⁻² d ⁻¹ Pa ⁻¹) (23 °C, 0% RH)	5.2 × 10 ⁻¹	6.0 × 10 ⁻¹
OTR (cm ³ m ⁻² d ⁻¹ Pa ⁻¹) (23 °C, 0% RH)	8.0 × 10 ⁻²	5.5 × 10 ⁻²
WVTR (g m ⁻² d ⁻¹ Pa ⁻¹) (38 °C, 90% RH)	4.0 × 10 ⁻⁴	3.0 × 10 ⁻²

chromatograph previously described. The results were reported in mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, and the mean ± SE was calculated for each of the three replicates.

2.4. CI index

Each individual pomegranate was evaluated for the CI index, which was determined based on the percentage of peel surface affected by CI symptoms such as dehydration, browning, and pitting, as described by Lorente-Mento et al. (2023). To quantify the external and internal CI index of pomegranate peel, a 5-point hedonic reference scale was utilized, ranging from 1 (no damage) to 5 (> 50%), with intermediary values of 2 (0–10%), 3 (10–30%), and 4 (30–50%).

2.5. Ion leakage

To evaluate ion leakage (IL), peel tissue was analyzed using the method described by Lorente-Mento (2023). Firstly, three peel replicates per treatment were taken in the equatorial zone of the pomegranate. Using a 0.5 cm diameter cork borer, 15 discs were extracted from each replicate. After rinsing each replicate three times for 3 min with deionized water, they were then vigorously shaken with 50 mL of deionized water at room temperature. After 30 min, the initial electrical conductivity (C1) was measured with a Crison conductivity meter. The samples were then frozen and heated to 121 °C for 15 min. Total conductivity (C2) was evaluated after cooling the samples at room temperature (20 °C). IL was calculated as (C1/C2) × 100.

2.6. Fruit quality parameters

Weight loss was calculated as the ratio of the difference between the weight of each fruit at harvest and the weight after each storage period, divided by the weight of each fruit at harvest. Results were expressed as a percentage of the initial weight (%). Fruit firmness was determined using a TX-Xt2i Texture Analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK) interfaced with a personal computer, following the method described by Lorente-Mento et al. (2021). On the equatorial zone of each fruit, the necessary force to deform the diameter by 5% was applied with a flat probe of 10 cm in diameter. Firmness results were expressed as the force-deformation ratio (N mm⁻¹). External and internal peel and aril color were measured with a Konica-Minolta colorimeter (CRC400, Minolta Camera Co., Japan) by using the CIELab system. Peel color measurements were made at three equidistant points around of equatorial zone in each fruit. Arils color measurements were made directly at tree equidistant points on cut fruit surface. Data of color were expressed as Hue angle (arctg b*/a*) according the CIELab coordinates. To quantify TSS and TA a sample of the arils from five fruits was used for each replicate. The juice was extracted by squeezing approximately 50 g of arils through a cotton cloth. TSS were determined in duplicate at a temperature of 20 °C using a digital refractometer, Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan), and expressed as%. For TA measurement also in duplicate in each sample, 1 mL of the juice was diluted with 25 mL of distilled H₂O and titrated using an automatic titrator (785 DMP Titrimo,

Metrohm) with 0.1 N NaOH to pH 8.1. The results were expressed as g 100 mL⁻¹ citric acid equivalents for both cultivars. Maturity index were expressed as the ratio of TSS and TA. To extract total phenolics, 10 g of arils were mixed with 30 mL of a water:methanol (2:8) solution containing 2 mM NaF. The resulting extracts were then centrifuged at 10,000 g for 15 min, and the supernatant was used to measure the total phenolic content in duplicate using the Folin-Ciocalteu reagent, described by Garcia-Pastor et al. (2020b). The results were reported in mg kg⁻¹ of gallic acid equivalents on a fresh weight basis. The procedure outlined by Lorente-Mento et al. (2021) was followed for the extraction and measurement of total anthocyanins. Specifically, 20 g of arils from each sample were extracted for anthocyanins using a solution of methanol/formic acid/water (25:1:24, v/v/v), and the homogenate was centrifuged at 10,000 × g for 10 min. The total anthocyanin concentration was then measured by recording the absorbance at 520 nm in the supernatant, and the results were reported as mg 100 g⁻¹ of cyanidin 3-glucoside equivalents (cyn 3-glu), with a molar absorption coefficient of 26,900 L cm⁻¹ mol⁻¹ and a molecular weight of 449.2 g mol⁻¹.

2.7. Statistical analysis

The effect of storage time, cultivar, packaging system and their interaction on the different dependent variables quantified has been studied by Analysis of Variance (ANOVA). When the differences induced by the different treatments and cultivars were significant, the means were separated using the Tukey test ($P < 0.05$). Correlation coefficients using Pearson's method were computed to determine the relationship between the dependent variables in both cultivars during storage. A bilateral significance test was then conducted to verify the correlation coefficient. IBM SPSS Statistics 28.0.0.0 (Armonk, NY: IBM Corp) software was used for statistical analyses.

3. Results and discussion

According to the ANOVA analysis, the presence of CI in fruit was influenced by the cultivar, duration of storage, and packaging system, as well as their interactions. Specifically, fruits of the 'Bigfull' cultivar, regardless of packaging system, could only be stored for 42 days at 2 °C plus 2 days at 20 °C. After 56 days at 2 °C plus 2 days at 20 °C, 100% of 'Bigfull' fruits showed symptoms of external and internal CI, wilting, and rot beyond commercially acceptable levels (Fig. 1B, D). In addition, the poor condition of these fruits prevented further analysis during the remaining storage period. However, fruits of the 'Mollar de Elche' cultivar maintained acceptable quality during the entire 56-day storage period at 2 °C plus 2 days at 20 °C (Fig. 1A, C). The external and internal CI of this cultivar did not reach a visual rating of 3. In this regard, Lorente-Mento et al. (2023) found that the 'Mollar de Elche' cultivar is less sensitive to CI than the cultivars 'Wonderful', 'Bigfull', 'Acco', and 'Purple Queen'. The occurrence of CI, in addition to being linked to storage conditions and postharvest technologies applied, is a genetically linked factor (Kashash et al., 2019). Kashash et al. (2018) found that the sensitivity of pomegranates to CI is related to various metabolic pathways, such as jasmonic acid biosynthesis, ethylene, and transcription factors indicating cold stress such as galactinol biosynthesis, lipids, raffinose, phenols, and heat shock proteins.

Furthermore, internal and external CI of pomegranates wrapped in both PBAT-PLA and LLDPE films were lower than in control fruits of both cultivars throughout the storage period ($P < 0.001$) (Fig. 1). In contrast, internal CI of control fruits from the most sensitive cultivar, 'Bigfull', reached a score of 3.43 ± 0.29 on day 14 of storage, while the CI symptoms of pomegranates wrapped in the films were lower, 1.98 ± 0.28 and 2.33 ± 0.18 for the PLA-PBAT biofilm and LLDPE film, respectively (Fig. 1D). The external damages of pomegranates from both cultivars were lower than internal damages, but both were significantly ($P < 0.001$) correlated ($r = 0.803$) (Table 3). Lorente-Mento et al. (2023) also confirmed that internal damages due to CI were always higher than

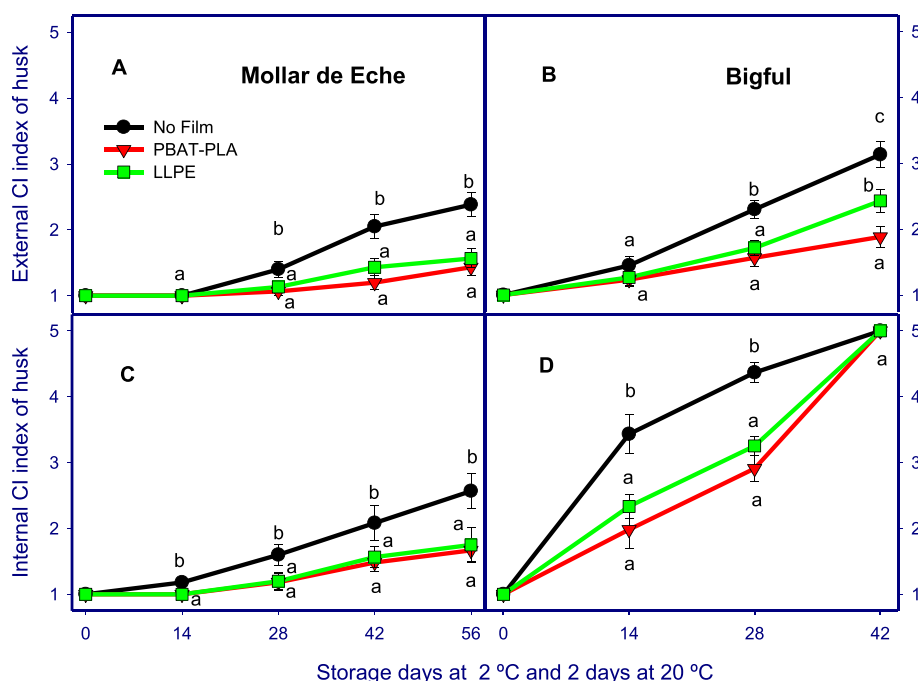


Fig. 1. Effect of packaging condition on the internal or external chilling injury index of husk in 'Mollar de Elche' (A and C) and 'Bigful' (B-D) pomegranates. Mean values and standard errors (represented by vertical bars) are shown from three replicates of 5 fruits. Different letters denote significant differences within the same day ($P < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

external damages in a wide range of pomegranate cultivars.

During the storage of pomegranates in the passive modified atmospheres, there were a decrease in the concentration of O_2 and an increase in the concentration of CO_2 inside the packagings, which were affected by the permeability of the films used and the respiration rate of the pomegranates (Fig. 2). In this regard, it has been observed in several studies that the atmosphere generated in the packaging of pomegranates under passive modified atmospheres allows to reduce CI and prolong their shelf life (Candir et al., 2018; Artés et al., 2000; Selcuk and Erkan, 2013, 2014).

The equilibrium atmosphere inside the packaging varies depending on the cultivar, its metabolism, and the permeability of the film used. In our case, the accumulated CO_2 concentration in the 'Mollar de Elche' cultivar was lower than in the 'Bigful' cultivar in both films (Fig. 2A, B). On the contrary, the O_2 concentration was higher in 'Mollar de Elche' cultivar than in 'Bigful' for both films (Fig. 2C, D). However, the LLPE film, regardless of the cultivar, always allowed to achieve a more enriched CO_2 equilibrium atmosphere and a more impoverished O_2 atmosphere than with the PBAT-PLA film (Fig. 2). Nevertheless, it is worth noting that in none of the cultivars or film types, concentrations higher than 10–15% CO_2 were reached, which would induce fermentative processes that could have adverse effects. The different equilibrium atmospheres generated are due to the higher metabolic activity of the 'Bigful' cultivar, as demonstrated by its higher respiration rate as compared with those of 'Mollar de Elche' cultivar (Fig. 2E, F).

The respiration rate of 'Bigful' pomegranate was higher than that of 'Mollar de Elche' throughout the experiment ($P < 0.05$) (Fig. 2E, F). In addition, the respiration rate of the control fruits of both cultivars increased significantly from $20.98 \pm 0.22 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to reach values of $37.81 \pm 0.91 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ on day 56 of storage at 2 °C plus 2 days at 20 °C in the 'Mollar de Elche' cultivar, while the respiration rate in the 'Bigful' cultivar increased from $33.28 \pm 0.85 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $69.61 \pm 3.72 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ on day 42 of storage at 2 °C plus 2 days at 20 °C (Fig. 2E, F). However, pomegranates that were wrapped

with both films showed significantly lower respiration rates than control fruits throughout the storage period. In the case of the 'Mollar de Elche' cultivar, the respiration rate of fruits wrapped with both films was similar between them and did not vary significantly throughout storage. The respiration rate of 'Mollar de Elche' fruits was always lower than that of wrapped fruits of the 'Bigful' cultivar. The respiration rate of 'Bigful' cultivar pomegranates increased significantly from the day 14 when the first symptoms of chilling injury were observed until the end of the experiment. In addition, the occurrence of chilling injury on the internal or external surface of the pomegranate peel was highly correlated ($P < 0.001$) with the respiration rate of the fruits (Table 3).

Respiratory activity and ethylene production rate can serve as indicators of CI in non-climacteric fruits (McCollum and McDonald, 1991). Upon transferring fruits from cold to warm temperatures, there is typically a significant increase in respiratory activity and ethylene production. In 'Wonderful' pomegranate cultivar, a drastic increase in respiratory activity was observed after exposure to 1 °C and transfer to 20 °C, even higher than when the fruit was transferred from 10 to 20 °C or when they were continuously held at 20 °C (Elyatem and Kader, 1984; Kader et al., 1984). However, the 'Mollar de Elche' cultivar, which is less sensitive to CI, does not undergo this increase in respiration rate. Additionally, it is known that an increase in respiration rate during prolonged storage periods increases metabolic activity and is associated with tissue senescence (Valero and Serrano, 2010).

The occurrence of external and internal CI in pomegranates was correlated with electrolyte leakage, weight loss, loss of firmness, and changes in external and internal coloration of the skin, as well as with the concentration of total polyphenols (Table 3). However, changes in coloration of the arils, total soluble solids content, maturity index, and accumulation of anthocyanins were only correlated with the occurrence of CI on the inner surface of the pomegranate husk (Table 3). In this sense, the occurrence of CI in vegetables is closely related to the electrolyte leakage from tissue (Valero and Serrano, 2010). In this experiment, pomegranates wrapped in both films showed lower electrolyte



Table 3
Pearson correlation between dependent variables of pomegranates during storage taking into account data from both cultivars, treatments and sampling date during storage.

	CI Int.	IL	WL	Firm.	H* ext. Husk	H* int. Husk	H* Aril	TSS	TA	IM	TPoly	ACNs	Resp.	CO ₂	O ₂
CI ext.	0.803 ***	0.906 ***	0.594 ***	-0.71 ***	-0.455 *	-0.665 ***	-0.141 NS	-0.115 NS	0.365 NS	-0.375 NS	0.443 *	-0.313 NS	0.819 ***	-0.269 NS	0.341 NS
CI Int.		0.906 ***	0.427 *	-0.637 ***	-0.817 ***	-0.958 ***	-0.589 ***	-0.416 *	0.736 ***	-0.762 ***	0.755 ***	0.711 ***	0.921 ***	0.056 NS	0.100 NS
IL			0.59 NS	-0.702 ***	-0.688 ***	-0.851 ***	-0.432 ***	-0.299 NS	0.612 **	-0.625 ***	0.644 ***	0.573 ***	0.877 ***	-0.113 NS	0.219 NS
WL				-0.806 ***	0.029 NS	-0.126 NS	0.359 NS	0.235 NS	-0.120 NS	0.139 NS	0.005 NS	-0.166 NS	0.375 NS	-0.784 ***	0.856 ***
Firm.					0.464 *	0.553 **	0.135 NS	-0.007 NS	-0.373 NS	0.356 NS	-0.466 *	-0.353 NS	0.595 **	-0.738 NS	0.078 NS
H* ext. Husk						0.913 ***	0.891 ***	0.494 *	-0.983 ***	0.984 ***	-0.958 ***	-0.968 ***	-0.780 ***	-0.231 NS	0.078 NS
H* int. Husk							0.74 ***	0.501 *	-0.850 ***	0.873 ***	-0.839 ***	-0.831 ***	-0.909 ***	-0.166 NS	-0.001 NS
H* Aril								0.586 **	-0.927 ***	0.935 ***	-0.829 ***	-0.927 ***	-0.519 *	-0.529 *	0.393 NS
TSS									-0.493 *	0.539 *	-0.405 NS	-0.512 *	-0.294 *	-0.38 NS	0.301 NS
TA											-0.959 ***	-0.985 ***	-0.710 ***	0.300 NS	-0.162 NS
IM											-0.950 ***	-0.985 ***	-0.71 ***	0.191 NS	0.191 NS
TPoly												0.950 ***	0.708 ***	-0.027 NS	-0.027 NS
ACNs													0.629 ***	-0.184 NS	-0.184 NS
Resp.														0.323 NS	0.323 NS
CO ₂														-0.044 NS	-0.044 NS
															-0.96 ***

External or internal husk CI index (CI ext) or (CI int), Ion Leakage (IL), Weight Loss (WL), Firmness (Firm), Hue angle (H*), Total Soluble Solids (TSS), Titrateable Acidity (TA), Maturity Index (MI), Total Polyphenolics (TPoly), Total Anthocyanins (ACNs), Respiration rate (Resp). Significant differences: *** at $P < 0.001$, ** at $P < 0.01$ and * at $P < 0.05$.

leakage than control fruits (Fig. 3A, B). However, the behavior between the two cultivars was different. The electrolyte leakage from the skins of the wrapped pomegranates of the 'Mollar de Elche' cultivar did not change throughout storage (Fig. 3A), while the electrolyte leakage from the husk of the wrapped pomegranates of the 'Bigful' cultivar increased significantly ($P < 0.001$) from day 14 of storage, although significant lower values of IL were observed for PBAT-PLA as compared with LLPE (Fig. 3B). García-Pastor et al. (2020a) obtained high correlation coefficients between CI and electrolyte leakage in the 'Mollar de Elche' pomegranate. The initial cellular structures impacted by CI are the cell membranes, which undergo a transition from a flexible liquid-crystalline phase to a solid gel structure upon exposure to extremely low storage temperatures ($< 5 ^\circ\text{C}$). This effect leads to loss of semipermeability and functionality of the cytoplasmic membrane and intracellular organelles membranes (Rui et al., 2010; Valero and Serrano, 2010) and to the leakage of electrolytes from the cells (Gómez-Galindo et al., 2004). Therefore, the wrapping of pomegranates in stretch films allows the integrity of the membranes to be maintained, reduces the loss of electrolytes, as observed in papaya (Singh and Rao, 2005), and could reduce lipid peroxidation of cell membranes, due to the maintenance of a high content of fatty acids, particularly a higher proportion of UFA/PUFA during storage (Pinela et al., 2016).

Fruits, in general, lose water after harvest due to transpiration and respiration, which results in weight loss and subsequent economic losses (Valero and Serrano, 2010). The present results show that control pomegranates reached weight losses of $12.30 \pm 0.71\%$ at the end of storage in control fruit of 'Mollar de Elche' cultivar and $11.47 \pm 0.46\%$ in 'Bigful' cultivar. However, the weight losses of pomegranates wrapped with both films were significantly lower than the control ($P < 0.001$). For both pomegranates cultivars wrapped with PBAT-PLA film, weight losses were less than 7%, while weight losses of pomegranates wrapped in LLDPE film showed weight losses less than 1% (Fig. 3C, D). Among the main factors that determine higher transpiration and, consequently, higher weight loss of vegetables, are high temperature and low relative humidity in the environment of the fruits which create large vapor pressure deficits that allow for higher transpiration rate and weight loss. In addition, the permeability of fruit and vegetable epidermis helps to limit fruit transpiration (Lufu et al., 2020).

In the transpiration process, water moves from intercellular spaces to the internal epidermis layer, and it is subsequently released into the environment to a greater or lesser extent depending on the fruit surface-to-volume ratio, cuticle thickness, and the presence of damage, waxes, lenticels, or stomata on the epidermis (Xanthopoulos et al., 2014). Particularly, pomegranate is a fruit with high susceptibility to weight loss due to the high porosity of the skin, which allows for the free movement of water vapor (Elyatem and Kader, 1984). Furthermore, this transpiration rate can be modified by storage conditions and packaging type (Fawole and Opara, 2013). The appearance of fruit wilting is a direct consequence of weight loss and is linked to the cultivar. Kader et al. (1984) indicate that in the 'Wonderful' cultivar, wilting symptoms begin to appear at 5% weight loss. However, in the 'Bhagwa' and 'Ruby' cultivars, wilting symptoms did not appear until weight losses reached 10% (Fawole and Opara, 2013). Only the control pomegranate fruit in both cultivars (unwrapped) showed visual symptoms of dehydration from the second week of storage.

It has been described that the use of edible coatings (Meighani et al., 2015) or selective permeability plastic films (Rao and Shivashankara, 2018; D'Aquino et al., 2010; Nanda et al., 2001) limits transpiration and weight loss in pomegranates during storage, since these films acted as gas barriers and reduced the vapor pressure deficit between the fruit surrounding atmosphere and the atmosphere of the internal fruit surface. The permeability of the polymer films used limits the diffusion of water vapor. In the present experiment, the difference in weight loss between pomegranates packaged in biodegradable film and LLDPE film is due to the water vapor permeability of the films (Shogren, 1997). The higher fraction of PBAT into the blend system (PBAT/PLA) caused a

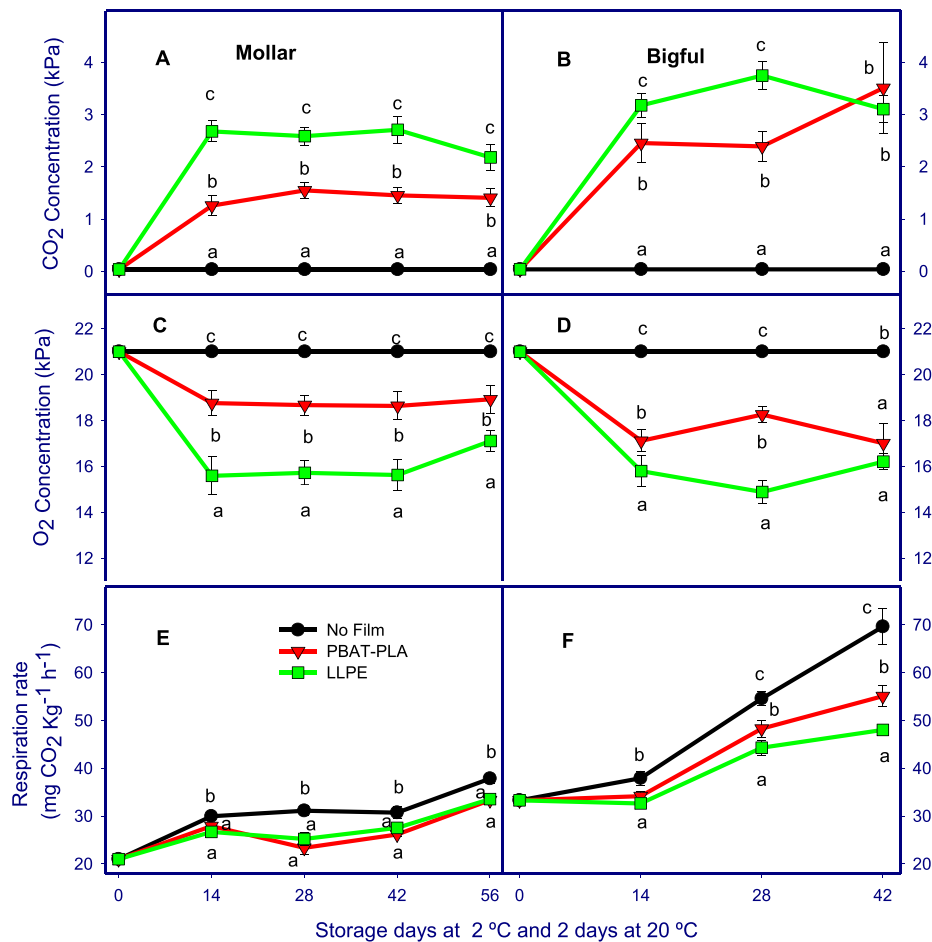


Fig. 2. Effect of packaging condition on the O₂, CO₂ headspace composition, and respiration rate of 'Mollar de Elche' (A, C, E) and 'Bigful' (B, D, F) pomegranates. Mean values and standard errors (represented by vertical bars) are shown from three replicates of 5 fruits. Different letters denote significant differences within the same day ($P < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

significant reduction in Young modulus, tensile strength and elongation at break (Ma et al., 2017) necessary for the stretching and self-sealing of the film and also causes a considerable increase in the WVP permeability of the film. Paulsen et al. (2022) demonstrated that broccoli wrapped in PBAT/PLA had twice the weight loss compared to those wrapped in LLDPE. In the present research, biodegradable PBAT-PLA film had a water vapor transmission rate 75 times higher than that of polyethylene film (Table 2). In pomegranates, it is essential to control film permeability to prevent dehydration, as observed in pomegranates of the 'Bhagwa' and 'Ganesh' cultivars packaged in films with different water vapor permeability (Rao and Shivashankara, 2018; Nanda et al., 2001).

The mechanical properties of pomegranate are highly complex due to its structure and morphology, primarily resulting from the mechanical resistance of the skin, pulp firmness, juice viscosity, and fruit turgor (Arendse et al., 2014; Ekrami-Rad et al., 2011). In the present research, fruit firmness decreased during storage in both cultivars and treatments (Fig. 3E, F). However, the packaged fruits showed the highest levels of firmness at the end of the experiment. Thus, the fruits wrapped in LLDPE maintained the greatest firmness (23.81 ± 1.48 and 16.54 ± 0.44 N mm⁻¹ for 'Mollar de Elche' and 'Bigful' cultivars, respectively), while fruits packaged in the PBAT-PLA biofilm had lower levels of firmness (17.47 ± 0.87 and 16.60 ± 0.69 N mm⁻¹ for 'Mollar de Elche' and 'Bigful' cultivars, respectively), and the lowest firmness levels were

found in control fruits (13.39 ± 0.66 and 11.42 ± 0.89 N mm⁻¹ for 'Mollar de Elche' and 'Bigful' cultivars, respectively) (Fig. 3E, F). Furthermore, according to Pearson correlations, the firmness of pomegranates from both cultivars was significantly and negatively correlated with electrolyte leakage, weight loss, and respiration rate, with correlation coefficients (r) of -0.702 , -0.806 , and -0.738 , respectively (Table 3).

Firmness changes shown by both cultivars was similar to that obtained by Mirdehghan et al. (2006). In this regard, fruits that exhibited the greatest symptoms of chilling injury had the greatest loss of firmness during storage. However, fruits treated with polyamines did not show symptoms of chilling injury and had lower losses of firmness (Mirdehghan et al., 2007a). The firmness of pomegranates during postharvest depends on storage conditions, temperature, relative humidity, as well as the appearance of physiopathies such as chilling injury or decay (Kader et al., 1984; Elyatem and Kader, 1984). Firmness decrease in pomegranate may be also due to the integrity loss of the cell wall (Ekrami-Rad et al., 2011). Pectic substances are the major component of the middle lamella of the cell wall are transformed into soluble pectins, leading to a decrease in fruit firmness (Mirdehghan et al., 2006). However, modified atmosphere packaging has allowed for the maintenance of firmness in pomegranate cultivars such as 'Wonderful' (Shaarawi and Nagy, 2017), and 'Primosole' (D'Aquino et al., 2010). Ali

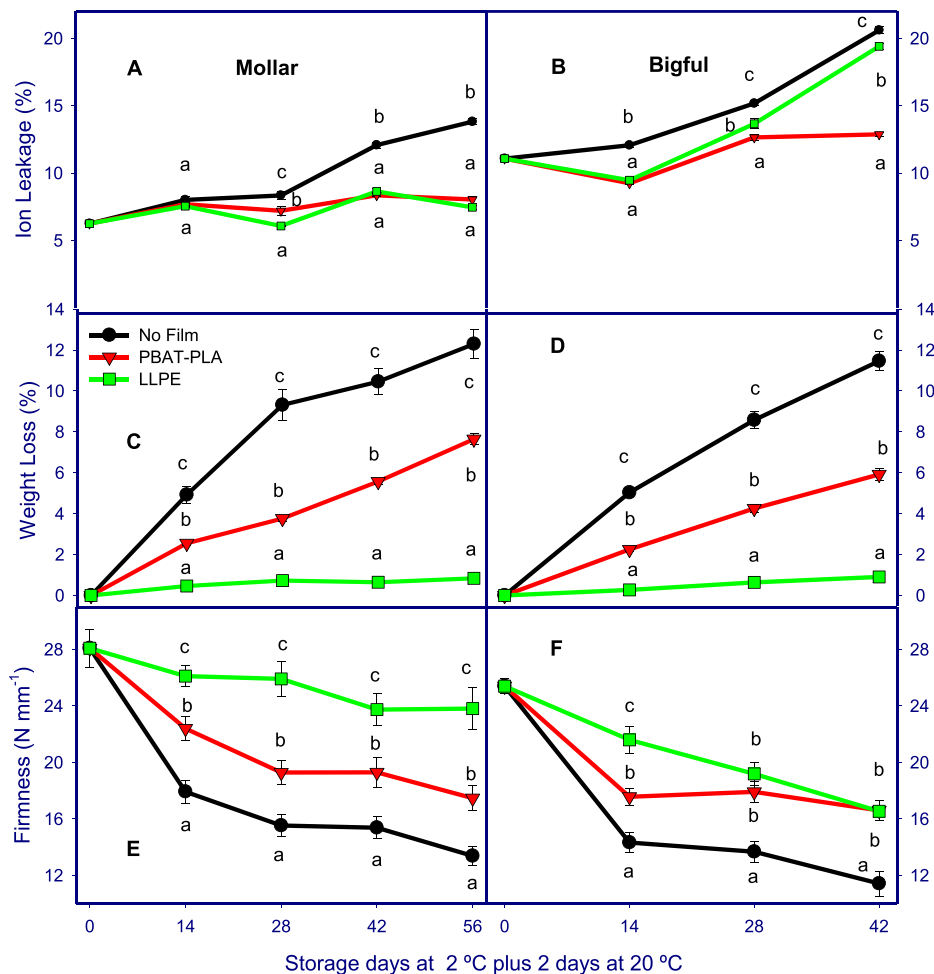


Fig. 3. Effect of packaging condition on ion leakage (IL), weight loss (WL), and firmness of 'Mollar de Elche' (A, C, E) and 'Bigful' (B, D, F) pomegranates. Mean values and standard errors (represented by vertical bars) are shown from three replicates of 5 fruits. Different letters denote significant differences within the same day ($P < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

et al. (2004) found that modified atmosphere packaging of star fruit delayed the depolymerization of pectins by suppressing the activity of hydrolytic enzymes, and also contributed to the fruit's higher tolerance to the incidence of chilling injury.

External and internal color of pomegranate peel was significantly correlated ($P < 0.001$) with a coefficient of $r = 0.913$ (Table 3). In both cases, the Hue angle of the peels pomegranate color decreased significantly during the storage period (Table 4), with changes in external and internal color positively correlated with the appearance of external and internal CI ($r = -0.455$ and $r = -0.958$, respectively). However, the decrease in Hue angle of the internal color was higher than that of the external color in both cultivars, and these were even higher in the 'Bigful' cultivar (Table 4). Nevertheless, the films significantly prevented internal color changes in pomegranate peels during storage at 2 °C (Table 4). These color changes could be attributed to the deterioration of the structure and function of the cell membranes in peel tissues, which causes the decompartmentalization of substrates and enzymes, resulting in enzymatic browning of phenols by the action of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes (Zhang et al., 2015). This hypothesis is supported by the fact that external and internal color changes were also significantly ($P < 0.001$) and negatively correlated with electrolyte leakage in peel tissues ($r = -0.688$ and $r = -0.851$). In addition,

external and internal color changes are also significantly ($P < 0.001$) and negatively correlated with respiration rate as an indicator of stress ($r = -0.78$ and $r = -0.909$), and with total polyphenol content ($r = -0.958$ and $r = -0.873$) and total anthocyanins ($r = -0.968$ and $r = -0.831$) which are substrates of browning reactions, and the latter was positively correlated with maturity index ($r = 0.984$ and $r = 0.873$) (Table 3). During pomegranate storage, Hue angle and L^* color parameters on the external and internal husk decreased being indicators of skin darkening and CI (Koushesh Saba and Zarei, 2019). However, pomegranates wrapped in biodegradable and polyethylene films showed lower external color changes, as previously reported in 'Hicaznar' pomegranates packaged in MAP (Candir et al., 2019). On the other hand, the Hue angle of pomegranate arils decreased significantly during storage, being significantly lower in the arils of the packaged pomegranates compared to the control throughout the entire storage period (Table 4). The arils of the packaged pomegranates acquired redder tones than the control.

The variation in TSS (total soluble solids) and TA (titratable acidity) was different between the two cultivars and the films used. In this sense, the TSS content and TA of 'Bigful' cultivar significantly decreased during storage, reaching values of $15.03 \pm 0.06\%$ and $0.43 \pm 0.01 \text{ g } 100^{-1} \text{ mL}$ citric acid equivalent in the control fruits at the of experiment, while in



Table 4
External and internal husk color, aril color, total soluble solid (TSS) and maturity index (MI).

	Mollar de Elche				Bigful			
	Days	Control	PBAT-PLA	LLPE	Days	Control	PBAT-PLA	LLPE
External husk color Hue	0	65.06 ± 3.40 aBA	65.06 ± 3.40 ab	65.06 ± 3.40 a	0	28.47 ± 0.48 b	28.47 ± 0.48 a	28.47 ± 0.48 a
	14	61.13 ± 3.08 aBA	65.44 ± 2.45 aBA	65.19 ± 3.28 aA	14	26.48 ± 0.58 bA	29.07 ± 0.86 aB	28.41 ± 0.62 aB
	28	60.70 ± 2.55 aA	66.97 ± 3.27 aBA	65.10 ± 1.82 aA	28	24.84 ± 0.70 aA	25.18 ± 0.46 aAB	26.68 ± 0.93 aB
	42	67.33 ± 2.02 bA	69.02 ± 1.37 bA	66.95 ± 2.05 aA	42	25.04 ± 1.07 aA	25.91 ± 0.93 aA	26.71 ± 1.09 aA
	56	62.77 ± 2.70 aBA	63.24 ± 2.17 aA	64.03 ± 3.20 aA	56	-	-	-
Internal husk color Hue	0	91.85 ± 0.90 c	91.85 ± 0.90 c	91.85 ± 0.90 ab	0	84.93 ± 0.75 d	84.93 ± 0.75 d	84.93 ± 0.75 d
	14	90.45 ± 0.46 bcA	91.41 ± 0.73 bcB	92.79 ± 0.43 bB	14	66.25 ± 2.69 cA	79.81 ± 1.57 cB	76.53 ± 2.53 cB
	28	89.30 ± 0.78 bA	90.09 ± 0.42 aB	91.41 ± 0.84 abB	28	55.09 ± 1.65 bA	62.24 ± 2.47 bB	59.20 ± 1.19 bB
	42	87.47 ± 0.75 aA	90.34 ± 0.68 abB	92.30 ± 0.66 abC	42	50.33 ± 1.60 aA	50.62 ± 1.15 aA	50.90 ± 1.06 aA
	56	87.18 ± 1.03 aA	89.74 ± 0.85 aB	90.36 ± 1.45 ab	56	-	-	-
Aril color Hue	0	33.39 ± 1.50 b	33.39 ± 1.50 c	33.39 ± 1.50 c	0	7.14 ± 1.06 a	7.14 ± 1.06 c	7.14 ± 1.06 b
	14	20.11 ± 1.55 aB	14.85 ± 1.86 aA	16.98 ± 1.69 aA	14	9.08 ± 1.50 abB	1.36 ± 1.44 aA	3.84 ± 1.31 aA
	28	22.52 ± 1.79 aB	15.40 ± 1.45 aA	15.44 ± 1.81 aA	28	10.08 ± 0.91 bB	5.71 ± 1.24 bcA	5.10 ± 1.54 aA
	42	20.99 ± 1.25 aA	18.75 ± 1.15 bA	19.69 ± 0.97 bA	42	10.59 ± 0.85 bB	5.25 ± 1.27 abcA	5.55 ± 1.00 aA
	56	22.08 ± 1.07 aB	19.15 ± 1.25 bA	18.97 ± 1.53 abA	56	-	-	-
TSS	0	15.06 ± 0.14 a	15.06 ± 0.14 a	15.06 ± 0.14 a	0	15.68 ± 0.13 b	15.68 ± 0.13 c	15.68 ± 0.13 c
	14	15.40 ± 0.09 bB	15.47 ± 0.02 bB	14.98 ± 0.12 aA	14	15.16 ± 0.08 aA	15.05 ± 0.05 bA	15.03 ± 0.06 bA
	28	15.32 ± 0.08 bB	15.47 ± 0.08 bB	14.98 ± 0.09 aA	28	15.28 ± 0.12 aA	15.11 ± 0.04 bA	15.06 ± 0.05 bA
	42	15.22 ± 0.27 bA	15.09 ± 0.24 bA	15.30 ± 0.16 bA	42	15.03 ± 0.20 aA	14.96 ± 0.09 aA	14.81 ± 0.15 aA
	56	15.87 ± 0.06 cB	15.85 ± 0.02 cB	15.40 ± 0.11 bA	56	-	-	-
IM	0	69.27 ± 0.91 a	69.27 ± 0.91 a	69.27 ± 0.91 a	0	31.13 ± 0.41 a	31.13 ± 0.41 a	31.13 ± 0.41 a
	14	73.17 ± 0.33 bC	70.83 ± 0.98 aB	69.68 ± 0.76 aA	14	33.52 ± 0.21 bC	32.98 ± 0.33 bB	30.59 ± 0.63 aA
	28	72.71 ± 2.63 abB	70.98 ± 0.97 aB	67.20 ± 0.91 aA	28	35.17 ± 0.76 cC	32.14 ± 0.99 abA	33.56 ± 0.68 bB
	42	73.20 ± 1.44 bB	69.92 ± 0.66 aA	68.32 ± 0.98 aA	42	35.18 ± 0.42 bcB	33.26 ± 0.71 cA	33.98 ± 0.28 bA
	56	74.60 ± 2.12 bB	70.70 ± 1.12 aA	70.93 ± 2.72 aAB	56	-	-	-

Different capital letters indicate significant differences among treatment for each sampling date ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant during storage for each treatment ($P < 0.05$).

‘Mollar de Elche’ cultivar the TSS content increased, reaching values of $15.87 \pm 0.06\%$ while TA did not vary during storage of the control fruits. However, the TSS and acidity content in both cultivars were significantly lower than in controls throughout the storage (Table4). In

this sense, while the correlation of TSS with the rest of the variables was very low for the color of the arils ($P < 0.01$), and for internal damage, internal color of the peel and anthocyanin content ($P < 0.05$); the correlation of TA and maturity index was very significant ($P < 0.001$) and

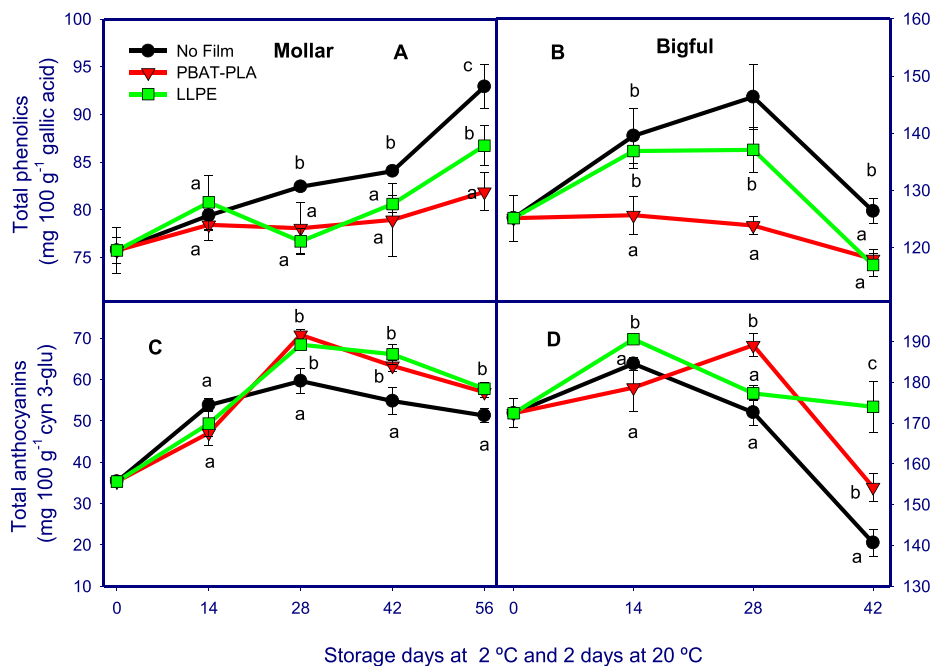


Fig. 4. Effect of packaging condition on the evolution of total phenolic compounds and total anthocyanins of ‘Mollar de Elche’ (A, C) and ‘Bigful’ (B, D) pomegranates. Mean values and standard errors (represented by vertical bars) are shown from three replicates of 5 fruits. Different letters denote significant differences within the same day ($P < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



high ($r > 0.6$) for internal damage, ion leakage, external and internal color of the peel, color of the arils, total polyphenol content, total anthocyanin content, and respiration rate (Table 3). The total phenolic and anthocyanin content in both cultivars were significantly ($P < 0.001$) correlated with each other ($r = 0.95$). In addition, total polyphenols and anthocyanins were significantly ($P < 0.001$) correlated with the same analyzed dependent variables, such as internal damage, ion leakage, external and internal color of the skin, aril color, maturity index, and fruit respiration rate.

The total phenolic and anthocyanin contents in aril was higher in 'Bigful' (Fig. 4) than in 'Mollar de Elche'. The concentrations of total phenolics compounds and anthocyanins were similar to that obtained by Mirdehghan et al. (2006) for 'Mollar de Elche' cultivar. The phenolic content was higher in the control fruits than in the packaged ones, while the concentration of anthocyanins was higher in the packaged pomegranates. It has been observed that the concentration of polyphenols and anthocyanins increased during the first two weeks of pomegranates storage at low temperatures, due to stimulation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and UDPglucose:flavonoid-3-O-glucosyl transferase (GT) activities (Miguel et al., 2004; Melgarejo et al., 2000; Heshi et al., 2001). In addition, the presence of CO₂ can stimulate the synthesis of anthocyanins in pomegranates. Holcroft et al. (1998) found that the concentration of anthocyanins in pomegranate juice increased when the pomegranates were stored in atmospheres enriched up to 10% of CO₂, with this increase remaining stable during the first 4 weeks of storage in agreement with the present study (Fig. 4C, D). However, the concentration of anthocyanins decreased after four weeks of storage. This decrease was higher for 'Bigful' than for 'Mollar de Elche' cultivar and higher in control than in wrapped fruit for both cultivars. It has been found that an excess of CO₂ (> 20%) can affect the color intensity and the activity of PAL and UPD glucose in pomegranate arils, thus decreasing the concentration of anthocyanins (Holcroft and Kader, 1999). On the contrary, if the CO₂ concentration surrounding fruit surface is 2–3 KPa (2–3%), total anthocyanin concentration was maintained at higher levels during the whole storage time in both pomegranates cultivars (Fig. 4C, D).

4. Conclusion

The use of stretchable skin films made of LLPE or PBAT-PLA blend for wrapping pomegranates similarly allowed for the control of CI appearance in both 'Bigful' and 'Mollar de Elche' cultivars during storage at 2 °C. An atmosphere enriched in CO₂ and poor in O₂ was achieved within the package, resulting in a lower respiration rate of the pomegranates, better integrity of the cell membranes, slower husk and arils color changes, and maintenance of the total content of phenolic compounds and anthocyanins. However, pomegranates wrapped in PBAT-PLA film showed greater weight loss and firmness reduction than those wrapped in LLDPE due to higher water vapor permeability of film. Nonetheless, this did not affect the overall appearance of the two pomegranate cultivars during storage. Additionally, PBAT-PLA films are biodegradable and compostable, unlike LLDPE. Wrapping pomegranates with these films would help to reduce the amount of plastic waste generated in the food industry and promote more sustainable practices.

CRedit authorship contribution statement

J.M. Lorente-Mento: Methodology, Software, Formal analysis, Investigation. **F. Guillén:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **J.M. Valverde:** Formal analysis, Data curation, Project administration, Funding acquisition. **D. Valero:** Validation, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **F. Badiche:** Investigation. **A. Robles:** Investigation. **H.M. Díaz-Mula:** Methodology, Software. **M. Serrano:** Validation, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **D. Martínez-Romero:** Conceptualization, Validation, Investigation, Data

curation, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

Funding for this work was provided by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the PID2022-137282OB-I00 Project, the European Commission with FEDER funds, and the Generalitat Valenciana via the PROMETEO2021/NAC/00075 project. The authors thank to Ildefonso Riquelme for providing fruit experiments.

References

- Abdul Khalil, H.P.S., Banerjee, A., Saurabh, C.K., Tye, Y.Y., Suriani, A.B., Mohamed, A., Karim, A.A., Paridah, M.T., 2018. Biodegradable films for fruits and vegetables packaging application: preparation and properties. *Food Eng. Rev.* 10, 139–153. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9180-3>.
- Ali, Z.M., Chin, L.H., Marimuthu, M., Lazan, H., 2004. Low temperature storage and modified atmosphere packaging of carambola fruit and their effects on ripening related texture changes, wall modification and chilling injury symptoms. *Postharvest Biol. Technol.* 33, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.007>.
- Arendse, E., Fawole, O.A., Opara, U.L., 2014. Influence of storage temperature and duration on postharvest physico-chemical and mechanical properties of pomegranate fruit and arils. *J. Food.* 12, 389–398. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.900114>.
- Artés, F., Villacausa, R., Tudela, J.A., 2000. Modified atmosphere packaging of pomegranate. *J. Food Sci.* 65, 1112–1116. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0525-7>.
- Candir, E., Ozdemir, A.E., Aksoy, M.C., 2018. Effects of chitosan coating and modified atmosphere packaging on postharvest quality and bioactive compounds of pomegranate fruit cv. 'Hicaznar'. *Sci. Hortic.* 235, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.017>.
- Candir, E., Ozdemir, A.E., Aksoy, M.C., 2019. Effects of modified atmosphere packaging on the storage and shelf life of Hicaznar pomegranate fruits. *Turk. J. Agric. For.* 43, 241–253. <https://doi.org/10.3906/tar-1801-119>.
- D'Aquino, S., Palma, A., Schirra, M., Continella, A., Tribulato, E., La Malfa, S., 2010. Influence of film wrapping and fludioxonil application on quality of pomegranate fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 55, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.08.006>.
- Dedieu, I., Peyron, S., Gontard, N., Aouf, C., 2022. The thermo-mechanical recyclability potential of biodegradable biopolyesters: perspectives and limits for food packaging application. *Polym. Test.* 107620. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2022.107620>.
- Di Millo, B., Martínez-Blay, V., Pérez-Gago, M.B., Argente-Sanchis, M., Grimal, A., Baraldi, E., Palou, L., 2021. Antifungal hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)-lipid composite edible coatings and modified atmosphere packaging (MAP) to reduce postharvest decay and improve storability of 'Mollar de Elche' pomegranates. *Coatings* 11, 308. <https://doi.org/10.3390/coatings11030308>.
- Ekrami-Rad, N., Khazaei, J., Khoshtaghaza, M.H., 2011. Selected mechanical properties of pomegranate peel and fruit. *Int. J. Food Prop.* 14, 570–582. <https://doi.org/10.1080/10942910903291920>.
- Elyatem, S.M., Kader, A.A., 1984. Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. *Sci. Hortic.* 24, 287–298. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(84\)90113-4](https://doi.org/10.1016/0304-4238(84)90113-4).
- Fahmy, K., Nakano, K., 2014. Optimal design of modified atmosphere packaging for alleviating chilling injury in cucumber fruit. *Environ. Control Biol.* 52, 233–240. <https://doi.org/10.2525/ecb.52.233>.
- Fawole, O.A., Opara, U.L., 2013. Effects of storage temperature and duration on physiological responses of pomegranate fruit. *I nd. Crops Prod.* 47, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.028>.
- Flores, F.B., Martínez-Madrid, M.C., Ben-Amor, M., Pech, J.C., Latché, A., Romojaro, F., 2004. Modified atmosphere packaging confers additional chilling tolerance on ethylene inhibited cantaloupe *Charentais melon* fruit. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 614619. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0952-z>.
- 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 Biol. Technol.* 167, 111226. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111226>.
- García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M., 2020b. The effects of salicylic acid and its derivatives on increasing pomegranate fruit quality and bioactive compounds at harvest and during storage. *Front. Plant Sci.* 11, 668. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00668>.
- Gómez-Galindo, F., Herppich, W., Gekas, V., Sjöholm, I., 2004. Factors affecting quality and postharvest properties of vegetables: integration of water relations and metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 139–154. <https://doi.org/10.1080/10408690490424649>.
- Heshi, A.B., Garande, V.K., Wagh, A.N., Katore, H.S., 2001. Effect of pre-harvest sprays of chemicals on the quality of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.) cv G-137. *Agric. Sci. Digest.* 1, 25–27.
- Holcroft, D.M., Gil, M.I., Kader, A.A., 1998. Effect of carbon dioxide on anthocyanins, phenylalanine ammonia lyase and glucosyltransferase in the arils of stored pomegranates. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123, 136–140. <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.1.136>.
- Holcroft, D.M., Kader, A.A., 1999. Carbon dioxide-induced changes in color and anthocyanin synthesis of stored strawberry fruit. *HortScience* 34, 1244–1248. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.34.7.1244>.
- Kader, A., Chordas, A., Elyatam, S., 1984. Responses of pomegranates to ethylene treatment and storage temperature. *California Agric.* 38, 14–15. <https://doi.org/10.3773/ca.v038n07p14>.
- Kashash, Y., Mayuoni-Kirshenbaum, L., Goldenberg, L., Choi, H.J., Porat, R., 2016. Effects of harvest date and low-temperature conditioning on chilling tolerance of 'Wonderful' pomegranate fruit. *Sci. Hortic.* 209, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.038>.
- Kashash, Y., Doron-Faigenboim, A., Bar-Ya'akov, I., Hatib, K., Beja, R., Trainin, T., Porat, R., 2018. Diversity among pomegranate varieties in chilling tolerance and transcriptome responses to cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 67, 760–771. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06321>.
- Kashash, Y., Doron-Faigenboim, A., Holland, D., Porat, R., 2019. Effects of harvest time on chilling tolerance and the transcriptome of 'Wonderful' pomegranate fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 147, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.09.005>.
- Khalid, M.Y., Arif, Z.U., 2022. Novel biopolymer-based sustainable composites for food packaging applications: a narrative review. *Food Packag. Shelf Life* 33, 100892. <https://doi.org/10.1016/j.foodpack.2022.100892>.
- Koushesh Saba, M., Zarei, L., 2019. Preharvest methyl jasmonate's impact on postharvest chilling sensitivity, antioxidant activity, and pomegranate fruit quality. *J. Food Biochem.* 43, e12763. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12763>.
- Lin, Y., Lin, Y., Lin, H., Shi, J., Chen, Y., Wang, H., 2017. Inhibitory effects of propyl gallate on membrane lipids metabolism and its relation to increasing storability of harvested longan fruit. *Food Chem.* 217, 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.065>.
- Lorente-Mento, J.M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D., Serrano, M., 2021. Melatonin treatment to pomegranate trees enhances fruit bioactive compounds and quality traits at harvest and during postharvest storage. *Antioxidants* 10, 820. <https://doi.org/10.3390/antiox10060820>.
- Lorente-Mento, J.M., Carrión-Antolí, A., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., Martínez-Romero, D., 2023. Relationship among sugars, organic acids, mineral composition, and chilling injury sensitivity on six pomegranate cultivars stored at 2 °C. *Foods* 12, 1364. <https://doi.org/10.3390/foods12071364>.
- Lufu, R., Ambaw, A., Opara, U.L., 2020. Water loss of fresh fruit: influencing pre-harvest, harvest and postharvest factors. *Sci. Hortic.* 272, 109519. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109519>.
- Ma, X., Wang, Y., Wang, J., Xu, Y., 2017. Effect of PBAT on property of PLA/PHB film used for fruits and vegetables. In: *MATEC Web of Conferences* (Vol. 88, p. 02009). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20178802009>.
- McCollum, T.G., McDonald, R.E., 1991. Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. *HortScience* 26, 1191–1192. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.26.9.1191>.
- Meighani, H., Ghasemzad, M., Bakshi, D., 2015. Effect of different coatings on post-harvest quality and bioactive compounds of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits. *J. Food Sci. Technol.* 52, 4507–4514. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1484-6>.
- Melgarejo, P., Salazar, D.M., Artes, F., 2000. Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 185–190.
- Miguel, G., Fontes, C., Antunes, D., Neves, A., Martins, D., 2004. Anthocyanin concentration of "Assaria" pomegranate fruits during different cold storage conditions. *J. Biomed. Biotechnol.* 5, 338–342. <https://doi.org/10.1155/S1110724304043076>.
- Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., 2007a. Pre-storage application of polyamines by pressure or immersion improves shelf-life of pomegranate stored at chilling temperature by increasing endogenous polyamine levels. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.010>.
- Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J.M., Zapata, P.J., Valero, D., 2007b. Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: role of polyamines. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.001>.
- Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valero, D., 2006. Pre-storage heat treatment to maintain nutritive and functional properties during postharvest cold storage of pomegranate. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8495–8500. <https://doi.org/10.1021/jf0615146>.
- Nanda, S.D.V.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 Biol. Technol.* 22, 61–69. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00181-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00181-2).
- Opara, U.L., Atukuri, J., Fawole, O.A., 2015. Application of physical and chemical postharvest treatments to enhance storage and shelf life of pomegranate fruit - A review. *Sci. Hortic.* 197, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.046>.
- Pareek, S., Valero, D., Serrano, M., 2015. Postharvest biology and technology of pomegranate. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2360–2379. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7069>.
- Paulsen, E., Lema, P., Martínez-Romero, D., García-Viguera, C., 2022. Use of PLA/PBAT stretch-cling film as an ecofriendly alternative for individual wrapping of broccoli heads. *Sci. Hortic.* 304, 111260. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111260>.
- Pinela, J., Barreira, J.C., Barros, L., Verde, S.C., Antonio, A.L., Oliveira, M.B.P., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C., 2016. Modified atmosphere packaging and post-packaging irradiation of *Rumex induratus* leaves: a comparative study of postharvest quality changes. *J. Food Sci. Technol.* 53, 2943–2956. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2260-6>.
- Porat, R., Kosto, I., Daus, A., 2016. Bulk storage of 'Wonderful' pomegranate fruit using modified atmosphere bags. *Isr. J. Plant Sci.* 63, 45–50. <https://doi.org/10.1080/07929978.2016.1152839>.
- Rao, D.S., Shivashankara, K.S., 2018. Effect of modified atmosphere packaging on the extension of storage life and quality maintenance of pomegranate (cv. 'Bhagwa') at ambient and low temperatures. *J. Food Sci. Technol.* 55, 2103–2113. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3125-y>.
- Rui, H., Cao, S., Shang, H., Jin, P., Wang, K., Zheng, Y., 2010. Effects of heat treatment on internal browning and membrane fatty acid in loquat fruit in response to chilling stress. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1557–1561. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3993>.
- Sayyari, M., Valero, D., Serrano, M., 2017. Pre-storage salicylic acid treatment affects functional properties, unsaturated/saturated fatty acids ratio and chilling resistance of pomegranate during cold storage. *Int. Food Res. J.* 24, 637.
- Selcuk, N., Erkan, M., 2013. The effects of modified atmosphere packaging on the antioxidant activity and postharvest physiology of 'Canernar-1' pomegranates. *Akd. Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi* 26, 81–87.
- Selcuk, N., Erkan, M., 2014. Changes in antioxidant activity and postharvest quality of sweet pomegranates cv. Hicranar under modified atmosphere packaging. *Postharvest Biol. Technol.* 92, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.007>.
- Selcuk, N., Erkan, M., 2015. Changes in phenolic compounds and antioxidant activity of sour-sweet pomegranates cv. 'Hicaznar' during long-term storage under modified atmosphere packaging. *Postharvest Biol. Technol.* 109, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.018>.
- Shaarawi, S.A., Nagy, K.S., 2017. Effect of modified atmosphere packaging on fruit quality of 'Wonderful' pomegranate under cold storage conditions. *Middle East J. Agric. Res.* 6, 495–505.
- Shogren, R., 1997. Water vapor permeability of biodegradable polymers. *J. Environ. Polym. Degrad.* 5, 91–95. <https://doi.org/10.1007/bf02763592>.
- Siegenthaler, K.O., Künkel, A., Skupin, G., Yamamoto, M., 2012. Ecoflex® and ecovio®: biodegradable, performance-enabling plastics. *Adv. Polym. Sci.* 245, 91–136. <https://doi.org/10.1007/12-2010-106>.
- Singh, S.P., Rao, D.S., 2005. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on the alleviation of chilling injury and dietary antioxidants levels in 'Solo' papaya during low temperature storage. *Eur. J. Hortic. Sci.* 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00200-4](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00200-4).
- Valero, D., Serrano, M., 2010. *Postharvest Biology and Technology For Preserving Fruit Quality*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/9781439802670>.
- Valverde, J.M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M., Valero, D., 2005. Improvement of table grapes quality and safety by the combination of modified atmosphere packaging (MAP) and eugenol, menthol, or thymol. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7458–7464. <https://doi.org/10.1021/jf050913i>.
- Vazquez-Hernandez, M., Blanch, M., Sanchez-Ballesta, M.T., Merodio, C., Escribano, M. I., 2020. High CO₂ alleviates cell ultrastructure damage in Autumn Royal table grapes by modulating fatty acid composition and membrane and cell oxidative status during long-term cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 160, 111037. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111037>.
- Wang, H., Chen, Y.H., Sun, J.Z., Lin, Y.F., Lin, Y.X., Lin, M., Lin, H.T., 2018. The changes in metabolisms of membrane lipids and phenolics induced by *Phomopsis longanae* Chi infection in association with pericarp browning and disease occurrence of postharvest Longan fruit. *J. Agric. Food Chem.* 66, 12794–12804. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04616>.
- Xanthopoulos, G.T., Athanasiou, A.A., Lentzou, D.I., Boudouvis, A.G., Lambrinos, G.P., 2014. Modelling of transpiration rate of grape tomatoes. Semi-empirical and analytical approach. *Biosyst. Eng.* 124, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.06.005>.
- Zhang, Z., Huber, D.J., Qu, H., Yun, Z., Wang, H., Huang, Z., Huang, H., Jiang, Y., 2015. Enzymatic browning and antioxidant activities in harvested litchi fruit as influenced by apple polyphenols. *Food Chem.* 171, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.001>.
- Zhang, R., Lan, W., Ding, J., Ahmed, S., Qin, W., He, L., Liu, Y., 2019. Effect of PLA/BAT antibacterial film on storage quality of passion fruit during the shelf-life of passion fruit during shelf-life. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules2418>.



5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS



5.1 Efecto de los tratamientos sobre el rendimiento del cultivo

El rendimiento agrícola es uno de los factores clave para la sostenibilidad y viabilidad económica de las explotaciones agrícolas, especialmente en el contexto actual de cambio climático y creciente demanda de alimentos. Aumentar la productividad por unidad de superficie es fundamental para satisfacer las necesidades de consumo global y, al mismo tiempo, mitigar el impacto ambiental. En este sentido, el uso de compuestos bioactivos, como la melatonina y el GABA, podría representar una estrategia prometedora en la agricultura moderna para mejorar tanto el rendimiento como la calidad de los cultivos, permitiendo a los agricultores obtener frutos de mayor valor comercial y resistencia a condiciones adversas. En el caso de la granada, un fruto de alta demanda por su calidad y sabor, así como por sus propiedades saludables, la optimización del rendimiento no solo incrementaría la eficiencia productiva, sino que también contribuiría a la resiliencia del cultivo en entornos semiáridos, como el sur de España.

En este estudio, la aplicación de melatonina ha mostrado resultados alentadores en cuanto al rendimiento del cultivo (Publicación II). Este rendimiento fue mayor con la concentración de 0,1 mM de melatonina en comparación con la dosis 0,3 y 0,5 mM, lo cual se atribuyó a un incremento en el tamaño del fruto, tanto en diámetro como en peso (datos no mostrados). Este efecto deriva de un aumento en el porcentaje de arilos y el grosor de la cáscara. Además, el número de frutos cosechados por árbol también aumentó con el tratamiento de melatonina. Al aplicar los tratamientos en la fase de crecimiento del fruto, es posible que la melatonina haya ayudado a reducir la abscisión natural de los frutos, un fenómeno frecuente durante el desarrollo y provocado por factores ambientales como el viento o la lluvia. La melatonina también ha demostrado efectos positivos en la mitigación del estrés biótico y abiótico en diversas especies vegetales (Kołodziejczyk y Posmyk, 2016; Arnao y Hernández-Ruiz., 2019). En el sur de España, con un clima semiárido, este compuesto podría favorecer la productividad del árbol al mejorar su tolerancia al estrés por calor y sequía, incrementando así la tasa de fotosíntesis neta. Resultados similares se han observado en uva tratada con melatonina en pre-verano, donde se constató un mayor tamaño y peso debido al incremento de la fuerza de sumidero del fruto, lo cual facilitó una mayor absorción de azúcares y un mayor



desarrollo en el momento de la cosecha (Meng et al., 2015). Asimismo, en albaricoques cv. "Canino" el tratamiento de pulverización foliar con melatonina incrementó el peso y rendimiento del fruto (Abd El-Naby et al., 2019). Resultados similares fueron descritos por Carrión-Antolí et al. (2022), donde el uso de melatonina, aplicada en precosecha, aumentó el rendimiento del cultivo. De igual manera, en limones, Badiche et al. (2024) reportaron que el tratamiento con 0,1 mM de melatonina mediante pulverización foliar promovió un incremento en el tamaño de los frutos y un aumento del rendimiento de la cosecha. En mandarina, también se ha descrito que la concentración de 0,1 mM de melatonina incrementó el peso de los frutos cuando fue aplicada en precosecha (Mollaei y Rastegar, 2024).

En cuanto al tratamiento con ácido γ -aminobutírico (GABA), los resultados de los experimentos realizados demuestran claramente que los tratamientos con GABA en árboles de granado de la variedad Mollar de Elche generaron incrementos significativos ($P < 0,05$) en el rendimiento del cultivo, medido en kilogramos por árbol (Publicación III). La respuesta más destacada se obtuvo con la aplicación de 100 mM de GABA, que resultó en un aumento del rendimiento total del 50 % en 2019 y del 31 % en 2020, en comparación con los árboles control. Este incremento se atribuyó, en el primer año, tanto al mayor número de frutos por árbol como al aumento en el peso de estos, los cuales fueron un 20 % y un 30 % superiores, respectivamente, respecto a los controles. No obstante, en 2020, el aumento del rendimiento se debió exclusivamente a una mayor cantidad de frutos (29 %) en los árboles tratados con GABA en comparación con los árboles control. Los tratamientos con GABA comenzaron 30 días después de la floración, una fase en la que los frutos ya estaban formados, lo que sugiere que el GABA fortaleció la conexión entre los frutos y las ramas, reduciendo la caída prematura, un problema frecuente durante el desarrollo y especialmente en la fase final de maduración debido a factores ambientales como el viento y la lluvia, comunes en el área de estudio. El incremento en el rendimiento total observado en los árboles tratados podría estar asociado con un aumento en la disponibilidad de fotoasimilados, distribuidos eficazmente entre los frutos en desarrollo. Estudios previos han evidenciado que el GABA incrementa la tasa fotosintética en plantas bajo estrés, mejorando la tolerancia y favoreciendo el crecimiento (Li et al., 2021b). En césped rastrero (*Agrostis stolonifera* T.), por ejemplo, los



tratamientos con GABA atenuaron los efectos adversos del estrés térmico, incrementando tanto la fotosíntesis como la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD), dehidroascorbato reductasa (DHAR), lo que redujo el daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tejidos fotosintéticos (Zeng et al., 2021). Sin embargo, bajo condiciones normales, estos efectos no fueron tan significativos. De manera similar, en plántulas de pimiento, el GABA aumentó la tasa fotosintética bajo condiciones de estrés por baja luminosidad, aunque no se observaron cambios notables en condiciones óptimas (Li et al., 2017). En contraste, en habas (*Vicia faba*), el tratamiento con GABA incrementó la fotosíntesis tanto en plantas bajo estrés como en condiciones control, lo que sugiere un beneficio más amplio (Shomali et al., 2021).

Las condiciones climáticas también pudieron haber influido en los resultados, ya que las temperaturas diurnas y nocturnas fueron más altas en 2019 que en 2020. Este aumento de temperatura podría explicar el mayor rendimiento obtenido en 2019, ya que el GABA pudo haber mitigado el estrés térmico de ese año. En conjunto, estos factores justificarían los incrementos de 38 kg y 16 kg por árbol en 2019 y 2020, respectivamente, en comparación con los árboles de control. Finalmente, es crucial considerar el costo del tratamiento con GABA, que alcanzó aproximadamente 34 euros por árbol para una dosis de 100 mM (3 L por árbol x 3 aplicaciones). Dado que el precio del kg de granada “Mollar de Elche” en España oscila entre 1 y 1,5 euros, los resultados de 2019 indican que este tratamiento podría ser económicamente viable. La reducción en la pureza del GABA para fines agronómicos podría, además, hacer que el tratamiento sea más accesible para los productores.

5.2 Efecto de los tratamientos sobre la calidad organoléptica del fruto

Durante el almacenamiento de los frutos, se producen transformaciones fisiológicas y bioquímicas características del proceso de maduración poscosecha. Entre los cambios más destacados se encuentran una disminución progresiva en la firmeza del fruto, que lo hace más susceptible al daño físico, y una reducción en los niveles de acidez, afectando así su perfil organoléptico. Simultáneamente, se incrementa la pérdida de peso,



principalmente debido a la transpiración y la respiración del fruto. Estos cambios son particularmente evidentes en la variedad Mollar de Elche y también se observan en otras especies vegetales, lo que refleja patrones comunes de maduración poscosecha (Sharma et al., 2010; Balbontín et al., 2018; Maghoumi et al., 2023).

5.2.1 Pérdida de peso

La pérdida de peso en los frutos es un fenómeno clave en la calidad poscosecha, influenciado por una variedad de factores como la respiración, la transpiración, la humedad relativa de la atmósfera y la temperatura de almacenamiento. Este proceso está relacionado no solo con la deshidratación de los frutos, sino también con la firmeza, el contenido de compuestos bioactivos y la incidencia de daños por frío. Las estrategias para mitigar la pérdida de peso incluyen tratamientos pre y poscosecha, como el uso de compuestos como melatonina, GABA, 1-Metilciclopropeno (1-MCP) y jasmonato de metilo (JaMe), así como el envasado en películas plásticas, todos ellos diseñados para reducir la transpiración y preservar la calidad de los frutos.

La pérdida de peso varía entre los cultivares, especialmente cuando se comparan en diferentes condiciones ambientales y de almacenamiento. Entre los factores que influyen notablemente en esta pérdida de humedad se encuentran el tamaño del fruto, la tasa de respiración, la relación corteza-árilos, el contenido de humedad, el grosor de la corteza (Miguel et al., 2004) y la alta porosidad de su piel, lo que permite un rápido movimiento del vapor de agua desde los espacios intercelulares hasta el ambiente externo (Elyatem y Kader, 1984). La pérdida de peso también puede tener una relación directa con la presencia de daños por frío en diferentes variedades de granada. Liu et al. (2023) observaron que en granada cv. “Jingpitian” y “Lishanhong” presentaron las menores pérdidas de peso, a pesar de mostrar los mayores síntomas de daños por frío tras ser almacenadas a 4 °C durante 90 días. En contraste, la variedad Tunisia soft seed experimentó mayores pérdidas de peso, pero una incidencia muy baja de daños por frío. Por otra parte, las variedades con mayor pérdida de peso tendieron a exhibir menor firmeza en los frutos. No obstante, al analizar los cambios dentro de una misma variedad durante el almacenamiento, se ha demostrado que el aumento de la pérdida de peso y la



disminución de firmeza están correlacionados con los síntomas de daños por frío en la corteza, como se ha descrito en la granada cv. “Mollar de Elche” (Passafiume et al., 2019; García-Pastor et al., 2020a).

En este contexto, los tratamientos aplicados antes de la cosecha han mostrado resultados prometedores para mitigar estos efectos. En particular, la aplicación de GABA permitió reducir de manera efectiva las pérdidas de peso durante el almacenamiento (Publicación IV). Por otro lado, las granadas tratadas con 1-MCP + JaMe también presentaron una evolución significativamente más lenta en la pérdida de peso bajo condiciones de almacenamiento en frío, confirmando que la combinación de estos compuestos es más eficaz que su aplicación individual (Publicación V). Este resultado se respalda con estudios previos donde se observó que ambos tratamientos contribuyen a la preservación de la integridad de las membranas celulares y a la reducción de la pérdida de peso del fruto (Boonyariththongchai y Supapvanich, 2017; Mitra et al., 2020). La mayor deshidratación observada en las granadas tratadas con 1-MCP y los frutos control al final del almacenamiento, puede explicarse por la incapacidad de estos tratamientos para reducir la transpiración y la respiración de estos frutos no climatéricos. Estos resultados fueron similares a los observados en estudios previos donde el 1-MCP y JaMe, aplicados por separado, no lograron reducir significativamente la pérdida de peso (Sayyari et al., 2011; García-Pastor et al., 2020a; Maghoumi et al., 2022).

En cuanto a la estrategia de envasado de los frutos en las películas plásticas, la pérdida de peso fue significativamente menor en las granadas envueltas en los plásticos en comparación con los frutos control (Publicación VI). Este resultado coincide con otras investigaciones que destacaron que los envases que crean atmósferas modificadas pueden reducir la transpiración y la pérdida de agua en frutas durante el almacenamiento, lo que es fundamental para preservar su frescura y calidad comercial (Lufu et al., 2020b). La película de polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), en particular, mostró una capacidad superior para limitar la pérdida de peso, con pérdidas inferiores al 1 % en comparación con las granadas control. La reducción de las pérdidas de peso se relaciona directamente con la permeabilidad a los gases de la película plástica. La película PBAT (polibutileno adipato-co-tereftalato) y PLA (ácido poliláctico), aunque efectiva, es más



permeable que la LLDPE, lo que podría explicar las diferencias observadas en las pérdidas de peso (Publicación VI).

En general, la transpiración está influenciada por factores ambientales como la humedad relativa y la temperatura, pero también por la permeabilidad de la epidermis del fruto (Nanda et al., 2001; Rao y Shivashankara, 2018; Lufu et al., 2020b). Al envolver las granadas en películas plásticas que permiten una menor transpiración, se puede reducir significativamente la pérdida de peso, lo que tiene un impacto directo en la vida útil del fruto y en su valor comercial. Esta tasa de transpiración puede verse afectada por las condiciones de almacenamiento y el tipo de envasado utilizado (Fawole y Opara, 2013b). La película LLDPE, con una permeabilidad al vapor de agua mucho más baja, la convierte en una opción ideal para minimizar la deshidratación del fruto. La película biodegradable PBAT-PLA, aunque ofrece beneficios ecológicos, tiene una permeabilidad al vapor de agua mucho mayor que la LLDPE, lo que permite una mayor transpiración y, por ende, una mayor pérdida de peso en las granadas envasadas con este material.

5.2.2 Firmeza

En cuanto a la firmeza, el tratamiento con melatonina (Publicación II) en precosecha tuvo un efecto positivo sobre este parámetro, un atributo clave para determinar la calidad de la granada, junto con el color de la piel y de los arilos, así como los niveles de SST y AT en los arilos (Nuncio-Jáuregui et al., 2014; Pareek et al., 2015; Valero et al., 2015). Los frutos tratados con melatonina mostraron una mayor firmeza en el momento de la cosecha en comparación con los frutos control, lo que indicó un retraso en el proceso de maduración (Sayyari et al., 2009; Sayyari et al., 2016; García-Pastor et al., 2020b). Este mantenimiento de la firmeza es indicativo de una mayor resistencia estructural, contribuyendo a una vida útil prolongada del fruto. La capacidad de este tratamiento para ralentizar el ablandamiento natural, asociado a la pérdida de integridad de los tejidos y al proceso de maduración, resalta su potencial para preservar la calidad poscosecha de la granada (Sayyari et al., 2009; Sayyari et al., 2016; García-Pastor et al., 2020b).

Por otro lado, las granadas tratadas con GABA mostraron una mayor firmeza en comparación con los frutos control (Publicación IV). Estos resultados destacan que la



aplicación de GABA en precosecha, especialmente a una concentración de 100 mM, mejoró notablemente este parámetro de calidad. Es importante señalar que, hasta la fecha, no existen estudios previos sobre la aplicación de GABA en precosecha en la granada cv. “Mollar de Elche”, lo que impide realizar una comparación directa de los resultados obtenidos. Sin embargo, la literatura científica proporciona evidencia sobre los efectos beneficiosos del GABA en la poscosecha de otras especies frutales. Por ejemplo, en manzanas tratadas con GABA, se ha reportado una mayor preservación de la firmeza durante el almacenamiento en frío en comparación con los frutos no tratados (Cheng et al., 2023). De manera similar, en frutos de aonla (*Emblica officinalis*), se observaron efectos positivos en la firmeza tras tratamientos con GABA (Ali et al., 2022).

Por otro lado, el tratamiento combinado de 1-MCP y JaMe dio como resultado frutos con valores significativamente superiores de firmeza en comparación con las granadas del grupo control y aquellas tratadas con aplicaciones individuales de ambas sustancias (Publicación V), lo cual puede deberse a la capacidad de estos compuestos para reforzar la estructura de la pared celular y retardar el proceso de ablandamiento, típico de la maduración y el deterioro. El 1-MCP mantiene la firmeza a través de una menor producción de etileno (Kader et al., 1984; Li et al., 2016). Por otro lado, el JaMe también contribuye a retrasar la producción de etileno y la senescencia de las granadas al reducir la actividad de las enzimas oxidativas. Esto favorece el mantenimiento de las membranas celulares y la preservación de la estructura de los tejidos. De este modo, tanto el 1-MCP como el JaMe desempeñan un papel clave en la reducción de las pérdidas de agua del fruto, lo que se traduce en una mayor firmeza durante el almacenamiento (Wang et al., 2021b). En cuanto al estudio llevado a cabo con las películas plásticas (Publicación VI), la firmeza del fruto estuvo significativamente influenciada por el tipo de película de envasado utilizada. Los frutos envueltos en LLDPE mantuvieron la mayor firmeza durante todo el experimento, lo que se relaciona directamente con la menor pérdida de agua y la reducción en la transpiración. La firmeza del fruto está íntimamente ligada al estado de turgencia celular, que depende de la cantidad de agua retenida en los tejidos. En este estudio, los frutos control, que presentaron las mayores pérdidas de peso, también mostraron la menor firmeza, lo que refleja una disminución en la turgencia celular y un aumento en la deshidratación. Estos hallazgos concuerdan con investigaciones previas



que sugieren que una mayor pérdida de agua durante el almacenamiento provoca una disminución de la firmeza del fruto (Arendse et al., 2014). Además, las diferencias en la firmeza entre los distintos cultivares pueden estar influenciadas por las propiedades mecánicas inherentes de cada fruto, como la resistencia de la piel, que varía según la estructura y morfología del fruto (Ekrami-Rad et al., 2011). El uso de películas plásticas selectivas ha demostrado ser una estrategia eficaz para limitar la transpiración y la pérdida de peso, lo que contribuye a mejorar la firmeza en frutas como la granada (Meighani et al., 2015; Rao y Shivashankara, 2018). Además, investigaciones como las de Ali et al. (2004) han señalado que el envasado en atmósfera modificada puede suprimir la actividad de enzimas hidrolíticas responsables de la degradación de las pectinas, lo que contribuye a la preservación de la firmeza del fruto durante el almacenamiento prolongado. Así, el uso de películas como el LLDPE ofrece una doble ventaja: la reducción de la transpiración y la inhibición de la actividad enzimática, lo que contribuye al mantenimiento de la firmeza de las granadas durante su conservación.

5.2.3 Tasa de respiración

En cuanto a la tasa de respiración, actualmente, no existen informes previos sobre los efectos de los tratamientos con melatonina en precosecha para retrasar el proceso de maduración y mantener los atributos de calidad durante el almacenamiento de la granada cv. "Mollar de Elche", lo que limita la comparación de resultados. Sin embargo, en otros frutos, como los albaricoques cv. "Colorado" y "Mikado", se ha observado que el tratamiento con 0,1 mM de melatonina ralentizó el proceso de maduración durante el almacenamiento a 1 y 8 °C, atribuible a una reducción en la producción de etileno en ambos cultivares y a ambas temperaturas (Medina-Santamarina et al., 2021). Este efecto también ha sido reportado en otros frutos climatéricos como el mango (Liu et al., 2020), plátano (Hu et al., 2017), melocotón (Gao et al., 2016), nectarina (Bal, 2021), manzana (Onik et al., 2021) y pera (Liu et al., 2019), donde la melatonina aplicada en poscosecha redujo la expresión de genes relacionados con la biosíntesis del etileno, como ACC-sintasa y ACC-oxidasa. En el caso de la granada, siendo un fruto no climatérico, la producción de etileno durante el almacenamiento fue muy baja en todos los tratamientos (datos no mostrados), lo que indica que el retraso en el proceso de maduración no está



directamente relacionado con la inhibición de la producción de etileno. A pesar de la baja actividad de etileno, se observó que el tratamiento con melatonina contribuyó a la reducción de la tasa respiratoria y la preservación de la firmeza y otros parámetros de calidad del fruto. En frutos no climatéricos como la cereza, donde la producción de etileno también es limitada, se ha descrito que la melatonina en poscosecha retrasó el proceso de maduración (Bal, 2021; Carrión-Antolí et al., 2022). Esto sugiere que la melatonina podría influir en otras rutas metabólicas, reduciendo la tasa de respiración y, en consecuencia, ralentizando el metabolismo general del fruto y, por lo tanto, el deterioro asociado al almacenamiento.

Por otro lado, los tratamientos con 1-MCP y JaMe aplicados de manera individual no resultaron en una disminución significativa de la actividad metabólica, pero sí cuando se combinaron ambas sustancias, lo que puede atribuirse a un efecto sinérgico entre sus propiedades (Publicación V). Este fenómeno ha sido documentado en otros frutos no climatéricos, como cerezas (Sharma et al., 2010; Balbontín et al., 2018), manzanas (Mitra et al., 2020), piñas (Boonyaritthongchai y supapvanich, 2017) y granadas (García-Pastor et al., 2020b; Maghoubi et al., 2022). La explicación de este efecto sinérgico radica en las acciones complementarias de 1-MCP y JaMe. El 1-MCP actúa bloqueando la acción del etileno, retrasando así la senescencia y prolongando la vida útil de los frutos, como se ha observado en estudios con granadas (Kader et al., 1984; Li et al., 2016). Por otro lado, el JaMe mejora el estado energético celular y estimula las respuestas antioxidantes, lo que incrementa la capacidad del fruto para resistir el estrés oxidativo (Aghdam et al., 2018). En el estudio, estas respuestas antioxidantes, junto con el aumento de la resiliencia frente a la peroxidación de las membranas celulares, coinciden con observaciones previas en frutas mínimamente procesadas (Min et al., 2020; Wang et al., 2021a; El-Beltagi et al., 2023).

Por otro lado, el uso de películas de envasado como PBAT-PLA y LLDPE ha demostrado que las atmósferas modificadas pasivas generadas pueden reducir la exposición al oxígeno y aumentar las concentraciones de CO₂, lo que a su vez disminuye la tasa de respiración y ralentiza los procesos de senescencia (Selcuk y Erkan, 2013; 2014; Candir et al., 2018; Artés et al., 2000). La eficacia de estas películas para crear una atmósfera



modificada pasiva se reflejó en la concentración de gases dentro del sistema de envasado. Las películas más permeables, como PBAT-PLA, permitieron una mayor entrada de O_2 en comparación con LLDPE, lo cual es coherente con las propiedades de los materiales empleados. En particular, el envasado con LLDPE generó una atmósfera con una mayor concentración en CO_2 y menor O_2 , lo que sugiere que este material es más efectivo para crear condiciones de almacenamiento que favorezcan una reducción en la tasa de respiración y, por ende, una mayor prolongación de la vida útil del fruto (Publicación VI).

Es importante señalar que en ningún caso se alcanzaron concentraciones de O_2 inferiores al 1-3 %. Este es el umbral necesario para evitar la aparición de procesos fermentativos que podrían deteriorar la calidad del fruto. Cuando el oxígeno desciende por debajo de este nivel crítico, el fruto entra en respiración anaeróbica, lo que genera compuestos como etanol y acetaldehído, responsables de sabores y olores indeseables, además de afectar negativamente su calidad sensorial y estructural. La variación en las concentraciones de gases también está relacionada con las características metabólicas del fruto. Estudios previos han mostrado que la tasa de respiración y la producción de etileno se incrementan notablemente cuando los frutos son transferidos a temperatura ambiente después de la conservación en frío, como se ha observado en la variedad Wonderful (Elyatem y Kader, 1984; Kader et al., 1984). Este cambio brusco en la temperatura puede acelerar la actividad metabólica del fruto, lo que subraya la importancia de mantener un entorno adecuado durante el almacenamiento.

5.2.4 Color

El color de la granada es uno de los aspectos de calidad más importantes para su aceptación en el mercado. La granada cv. 'Mollar de Elche', altamente valorada por los consumidores, se caracteriza por arilos con un tono rojo más claro en comparación con otros cultivares cultivados en España, como White, CG8, Katirbasi o Wonderful (Mena et al., 2012; Fernandes et al., 2017). También presenta diferencias en comparación con cultivares procedentes de Túnez, Turquía, Croacia o Irán (Pareek et al., 2015; Radunić et al., 2015; Li et al., 2015; Cano-Lamadrid et al., 2018; García-Pastor et al., 2020b). Esta



diferencia de color disminuye su valor comercial en los mercados internacionales, donde se prefieren cultivares con tonos rojos más intensos. No obstante, los datos obtenidos muestran que la melatonina aplicada en precosecha resultó eficaz en la mejora de este atributo (Publicación II). Los frutos tratados con melatonina presentaron arilos con un tono rojo más intenso, tanto al momento de la cosecha como durante el periodo de almacenamiento, lo cual estuvo asociado a un incremento en la concentración total de antocianinas.

El tratamiento con GABA mostró un impacto significativo en los parámetros de color tanto en la corteza como en los arilos de la granada cv. “Mollar de Elche”. Los resultados mostraron un incremento en el valor CIE a^* y en el contenido de antocianinas en los arilos, en función de la dosis aplicada, destacándose la concentración de 100 mM como la más efectiva (Publicación IV). Durante el almacenamiento, el color continuó intensificándose, lo que es típico en el proceso de maduración poscosecha en la variedad Mollar de Elche y otras especies vegetales (Sharma et al., 2010; Balbontín et al., 2018; Maghoubi et al., 2023). Este incremento en el color es de gran relevancia, ya que las antocianinas, junto con otros compuestos fenólicos, no solo son responsables del color, sino que también aportan propiedades antioxidantes. Estas propiedades antioxidantes, ampliamente documentadas en estudios recientes (Asgary et al., 2017; Panth et al., 2017; Wang et al., 2020), han demostrado tener beneficios para la salud, por lo que los tratamientos con GABA y melatonina no solo mejoran la apariencia del fruto, sino que también lo convierten en un alimento más saludable y atractivo para los consumidores.

Por otro lado, el tratamiento poscosecha con 1-MCP y JaMe, cuando se aplican de manera conjunta (Publicación V), ofrece una notable capacidad para conservar la luminosidad de la corteza del fruto, lo que se refleja en un mantenimiento más prolongado del valor CIE L^* en los primeros meses de almacenamiento. Esta acción ralentiza los cambios cromáticos típicos de la senescencia del fruto, probablemente debido a la reducción en la tasa de transpiración y respiración, preservando así la integridad de la corteza (Nunes y Emond, 2007). Si bien no se observaron diferencias significativas en el ángulo de tono CIE hue^* entre los tratamientos, los valores más bajos sugieren un oscurecimiento natural de la corteza, un fenómeno común durante la maduración



poscosecha y la oxidación de compuestos fenólicos (Pathare et al., 2013). El impacto más evidente de estos tratamientos se observó en el color de los arilos, medido a través de la relación CIE a^*/b^* . Los frutos tratados con JaMe, ya sea solo o en combinación con 1-MCP, presentaron un color rojo más intenso, asociado con mayores concentraciones de antocianinas. El JaMe, conocido por promover la biosíntesis de antocianinas en distintos frutos, incluyendo la granada (Giménez et al., 2015), fue clave en la mejora observada del color de los arilos en nuestro estudio. Además, la capacidad de este tratamiento para fortalecer las defensas antioxidantes del fruto contribuyó tanto a la conservación del color como a la protección contra la peroxidación de las membranas celulares, como se ha observado en investigaciones previas (Min et al., 2020; Wang et al., 2021a).

En cuanto al uso de las películas plásticas para el envasado de las granadas demostró ser una técnica eficaz para mitigar la degradación del color, un fenómeno común durante el almacenamiento en frío (Publicación VI). La disminución en el ángulo hue*, tanto interno como externo, refleja el deterioro de las membranas celulares, lo que facilita el pardeamiento enzimático de los compuestos fenólicos (Zhang et al., 2015). Este proceso fue más pronunciado en la superficie interna de la corteza, lo que sugiere una mayor susceptibilidad de los tejidos internos al daño por frío. La menor resistencia de los tejidos internos y su mayor actividad enzimática explican esta vulnerabilidad. Sin embargo, estas películas fueron efectivas en la prevención de los cambios de color en el interior del fruto. Esto resalta el potencial de los envases con atmósfera modificada para reducir el daño oxidativo y la degradación de los compuestos fenólicos responsables del color. La protección proporcionada por las películas plásticas se debe a su capacidad para reducir la tasa de respiración del fruto al minimizar la exposición al oxígeno, lo que limita la actividad de las enzimas oxidativas y previene el pardeamiento (D'Aquino et al., 2010). En cultivares especialmente susceptibles a los daños por frío, donde los cambios de color interno son más pronunciados, el uso de este tipo de envasado resulta particularmente beneficioso. Además de preservar la apariencia visual del fruto, las películas plásticas ayudan a prolongar la vida útil del producto durante el almacenamiento en frío, manteniendo la calidad del fruto y minimizando las pérdidas comerciales.



5.2.5 Sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT)

Son parámetros esenciales de calidad que influyen directamente en la dulzura y acidez del fruto y, por tanto, en su sabor final. Durante el almacenamiento, un aumento en los SST junto con una disminución en la AT incrementa la relación SST/AT, lo que es percibido organolépticamente como un signo de sobremaduración, afectando negativamente la frescura, jugosidad y sabor, aspectos clave para la aceptación por parte de los consumidores (Kulkarni y Aradhya, 2005; Valero y Serrano, 2010; Pareek et al., 2015; Valero et al., 2015; García-Pastor et al., 2020b).

En los experimentos realizados durante los años 2019 y 2020, el tratamiento en los granados con melatonina mostró un impacto significativo en la evolución de estos parámetros de calidad en los frutos (Publicación II). Aunque los valores de SST en los frutos tratados y en los frutos control fueron similares, se observó que la disminución de la AT fue considerablemente menor en los frutos tratados con melatonina. Como resultado, los frutos tratados lograron mantener una relación SST/AT más equilibrada durante un período de almacenamiento prolongado, lo que contribuyó a preservar la frescura y el sabor del fruto durante más tiempo en comparación con los frutos no tratados. En los frutos control, el almacenamiento a 10 °C solo conservó su calidad óptima para el consumo durante 30 días. En cambio, los frutos de los árboles tratados con melatonina mostraron una extensión del período de almacenamiento de alta calidad hasta 60 días. Destacablemente, después de 60 días de almacenamiento, los frutos tratados con melatonina presentaron un nivel de AT en los arilos superiores a los observados en los frutos control tras solo 30 días de almacenamiento. En otros frutos, se ha observado que la melatonina puede mejorar diversos aspectos relacionados con la calidad del fruto. En pera, el tratamiento con 0,1 mM mediante pulverización foliar incrementó los sólidos solubles totales, lo que resultó en una mejora significativa de los atributos sensoriales del fruto (Zhao et al., 2023). Por otro lado, en cereza, la aplicación mediante pulverización foliar de melatonina a 0,3 mM aumentó los sólidos solubles totales y la acidez total (Carrión-Antolí et al., 2022).



Por otro lado, los tratamientos precosecha con GABA no tuvieron un impacto significativo en los niveles de SST o AT en el momento de la recolección, independientemente de la fecha de cosecha o la concentración aplicada (Publicación III). En los experimentos realizados, tanto los frutos tratados con GABA como los controles mostraron niveles similares de SST. Esto indica que la acumulación de azúcares no se vio afectada por la aplicación de este compuesto. Este hallazgo coincide con estudios previos en mango (Rastegar et al., 2020b), donde tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de SST o AT tras el tratamiento con GABA. Durante el almacenamiento sí se observaron disminuciones en los niveles de AT (Publicación IV). Este comportamiento es típico del proceso de maduración poscosecha en granadas de la variedad Mollar de Elche y otros frutos, caracterizados por una pérdida progresiva de la acidez (Sharma et al., 2010; Balbontín et al., 2018; Maghoubi et al., 2023). Sin embargo, un aspecto destacable del tratamiento con GABA es que los frutos tratados lograron mantener los valores de AT más cercanos a los niveles de cosecha incluso después de 60 días de almacenamiento, en comparación con los frutos control. Este hallazgo coincide con otros estudios en manzanas (Cheng et al., 2023) y frutos de aonla (*Embllica officinalis*) (Ali et al., 2022), donde también se observó preservación de la acidez. Además, los frutos tratados con 100 mM de GABA mantuvieron una relación SST/AT más equilibrada, lo que evitó que los frutos se percibieran como sobremaduros, conservando la frescura, jugosidad y sabor que demandan los consumidores (Fadavi et al., 2005; Kulkarni y Aradhya, 2005; García-Pastor et al., 2020b; Maghoubi et al., 2023). Este resultado sugiere que, si bien el GABA no altera de manera significativa los niveles de SST o AT en la recolección, su capacidad para ralentizar el deterioro de estos parámetros durante el almacenamiento puede ser clave para extender la vida útil poscosecha y mantener una calidad sensorial superior.

Por otro lado, el tratamiento combinado en poscosecha de 1-MCP y JaMe mostró un incremento significativo en los SST en comparación con los frutos control (Publicación V). Este resultado no solo refuerza su capacidad para preservar la calidad visual y estructural, como se ha comentado anteriormente, sino también su valor nutricional. Este resultado sugiere que la combinación de 1-MCP y JaMe es particularmente eficaz para promover una mayor acumulación de azúcares durante el almacenamiento, un hallazgo que coincide con investigaciones previas que demuestran la capacidad del JaMe para



estimular el metabolismo secundario en los frutos, favoreciendo la síntesis de azúcares y compuestos bioactivos (García-Pastor et al., 2020b). Los frutos tratados únicamente con 1-MCP presentaron los niveles más bajos de SST, lo que atribuye a la capacidad de este compuesto para ralentizar el metabolismo, disminuyendo la acumulación de azúcares durante la senescencia. Esto sugiere que, si bien 1-MCP es eficaz para reducir la respiración y retrasar la maduración, su capacidad para aumentar los SST es limitada en comparación con el JaMe o su combinación con 1-MCP. El efecto sinérgico de ambos tratamientos parece ser clave para alcanzar un equilibrio entre la ralentización del proceso de senescencia y el mantenimiento del valor nutricional del fruto, asegurando tanto la calidad visual como la nutricional. En cuanto a la AT, se observó una disminución moderada durante el almacenamiento (Publicación V), lo que se explica por el uso de los ácidos orgánicos en los procesos respiratorios del fruto (Mirdehghan et al., 2007; Matityahu et al., 2014). No obstante, el tratamiento combinado de 1-MCP y JaMe permitió mantener niveles más altos de AT en comparación con el resto de los tratamientos, lo que sugiere que este tratamiento no solo preserva los niveles de azúcares, sino que también mantiene la acidez del fruto. El tratamiento con JaMe de forma individual también mostró óptimos resultados, siendo más eficaz en la preservación de la acidez en comparación con el tratamiento con 1-MCP. Este resultado está en consonancia con estudios previos que sugieren que el JaMe puede proteger los ácidos orgánicos, como la vitamina C, lo que contribuye a mantener la acidez y, en consecuencia, la calidad del fruto durante el almacenamiento (El-Beltagi et al., 2023). No obstante, el uso combinado de 1-MCP y JaMe parece ofrecer un efecto sinérgico, al permitir que tanto los SST como la AT se mantengan en niveles óptimos, lo que refuerza la calidad organoléptica del fruto durante períodos prolongados de almacenamiento.

5.2.6 Daños por frío

El daño por frío es un problema fisiológico significativo en frutas como la granada, que se produce cuando se almacenan a bajas temperaturas durante períodos prolongados. Este fenómeno afecta la estabilidad de las membranas celulares, generando alteraciones en su permeabilidad y fluidez. Como resultado, tanto las membranas plasmáticas como las de los orgánulos, incluido el tonoplasto, sufren una pérdida de integridad que provoca la



fuga de electrolitos y compromete la funcionalidad celular debido a la desintegración progresiva de las membranas en estas condiciones de frío (Valero y Serrano, 2010). Estos cambios permiten la difusión de solutos, como protones y formas protonadas de ácidos orgánicos, hacia la pared celular, lo que genera un desequilibrio osmótico que desestabiliza los tejidos y contribuye al deterioro de la calidad del fruto (Vallarino y Osorio, 2019). La sensibilidad al daño por frío varía entre los cultivares de granada y varios estudios sugieren que estas diferencias están influenciadas tanto por factores genéticos como metabólicos. En nuestro estudio, se encontró que cultivares como Kingdom y Wonderful registraron los índices más altos de daños por frío, tanto en la superficie interna como externa de la piel, mientras que otros cultivares, como Purple Queen, mostraron mayor tolerancia al daño por frío. En general, se observó que el daño por frío era más intenso en la superficie interna de la corteza en comparación con la externa (Publicación I). El contenido de SST y AT también puede estar estrechamente relacionados con la presencia de daños por frío y, por consiguiente, con la pérdida de calidad del fruto. Este fenómeno se respalda con estudios previos que han demostrado una reducción similar de SST y AT en frutos sometidos a condiciones de almacenamiento prolongado a bajas temperaturas (Mirdehghan et al., 2006). Los resultados obtenidos muestran que los cultivares más sensibles al daño por frío, como Kingdom y Wonderful, experimentaron una significativa disminución en la concentración de sacarosa, mientras que los cultivares menos sensibles, como Bigful, Acco, Purple Queen y Mollar de Elche, mostraron un aumento en los niveles de sacarosa (Publicación I). La correlación negativa entre el contenido de sacarosa y los índices de daños por frío en la corteza interna y externa ($r = -0.8$ y $r = -0.67$, respectivamente) evidencia que la degradación de la sacarosa está fuertemente ligada a la susceptibilidad de los daños por frío. Esto sugiere que, en los cultivares más vulnerables, la sacarosa es utilizada o descompuesta como respuesta al estrés por frío, afectando de manera adversa a la calidad del fruto. A su vez, la correlación positiva entre la glucosa y los índices de daños por frío ($r = 0.71$ y $r = 0.75$) sugiere que el contenido de glucosa podría ser un indicador de resistencia al daño por frío. Este hallazgo plantea la posibilidad de que la acumulación de glucosa esté vinculada a mecanismos de defensa que contribuyan a la tolerancia del fruto frente al estrés por frío. Por otro lado, Liu et al. (2023) encontraron que los cultivares más susceptibles al



daño por frío presentaban mayores valores de AT después de 90 días de almacenamiento a 4 °C. No obstante, para validar esta observación en otras variedades de granada, serían necesarios estudios más amplios.

El contenido de antocianinas y ácidos orgánicos también parecen jugar un papel en la tolerancia al daño por frío. Los cultivares más sensibles al daño por frío presentan mayores concentraciones de antocianinas, probablemente debido a una alta actividad de enzimas clave en la biosíntesis de estos compuestos, como la enzima PAL y la flavonoide-3-O-glucosiltransferasa (GT) (Lufu et al., 2023). Este alto contenido de antocianinas podría estar relacionado con una mayor presión osmótica dentro de las vacuolas de los arilos en variedades como Wonderful y Kingdom. Esta elevada presión osmótica reduce el potencial hídrico y favorece la difusión de agua a través de las membranas del tonoplasto y la plasmalema (Cui et al., 2004; Shiratake y Martinoia, 2007).

El perfil de ácidos orgánicos también muestra una correlación con la sensibilidad a los daños por frío. En las variedades más susceptibles, como Kingdom, el ácido cítrico es el ácido predominante, mientras que en cultivares más resistentes, como Acco, los ácidos cítrico, málico y ascórbico presentan concentraciones similares (Publicación I). Durante el almacenamiento en frío, el ácido málico se degrada en las variedades más sensibles, mientras que en las más resistentes se mantiene estable. Además, se ha observado que el ácido oxálico aumenta en las variedades resistentes, lo cual podría jugar un papel en la regulación de la presión osmótica y la estabilidad de los tejidos bajo estrés (Huang et al., 2021).

El contenido mineral es otro factor clave en la sensibilidad al daño por frío. Cultivares como Wonderful y Kingdom, con una concentración de minerales alrededor de 17 g kg⁻¹, muestran una mayor susceptibilidad al daño por frío, con una correlación positiva significativa entre el contenido mineral y la sensibilidad al daño por frío tanto para daños externos ($r= 0,76$) como internos ($r= 0,69$) (Publicación I). Este mayor contenido mineral podría estar asociado con una estabilidad celular menor en condiciones de frío, lo que sugiere que el perfil mineral de la cáscara podría influir en la capacidad de la fruta para soportar el almacenamiento en frío prolongado (Shiratake y Martinoia, 2007). Por otro



lado, los polifenoles y flavonoides, incluyendo las antocianinas, también parecen tener un rol importante en el comportamiento frente al daño por frío. En cultivares con mayor contenido de estos compuestos, como la variedad Bigful, se ha observado un oscurecimiento en la superficie interna de la corteza. Esto podría deberse a la migración de polifenoles y flavonoides desde la vacuola al citoplasma, donde las enzimas como la polifenol oxidasa (PPO) tienen alta actividad, promoviendo el oscurecimiento a través de la oxidación enzimática de estos compuestos (Jiang et al., 2004; Mishra et al., 2022).

A pesar de las investigaciones sobre el uso de melatonina y GABA para mitigar los daños por frío en las granadas, ninguno de estos compuestos logró reducir efectivamente estos efectos adversos en los frutos estudiados (Publicaciones N° 2, 3 y 4). Este hallazgo subraya la necesidad de explorar otras estrategias de conservación, como el empleo de 1-MCP y JaMe, que sí han demostrado ser eficaces para reducir los daños por frío y las alteraciones metabólicas asociadas, como el aumento del contenido de MDA y de la fuga de electrolitos, parámetros que son fundamentales para evaluar y cuantificar los efectos del frío en los frutos.

Durante el almacenamiento de los frutos, el aumento en el contenido de MDA se identificó como un indicador clave de la peroxidación lipídica y del daño a las membranas celulares, un proceso estrechamente relacionado con la senescencia y el estrés por frío (Deng et al., 2010). En el estudio, los frutos control presentaron el contenido de MDA más elevado, sugiriendo un mayor nivel de estrés oxidativo y daño en sus membranas. En contraste, los tratamientos con 1-MCP y JaMe, en especial cuando se aplicaron conjuntamente, redujeron significativamente los niveles de MDA en comparación con los frutos no tratados (Publicación V). Este hallazgo coincide con estudios previos que destacan la capacidad de ambos compuestos para estimular la actividad de enzimas antioxidantes que contrarrestan el daño oxidativo (Maghoumi et al., 2022; Zhang et al., 2023). La combinación de 1-MCP y JaMe parece actuar de forma sinérgica, disminuyendo la peroxidación lipídica y protegiendo la integridad de las membranas celulares.

Otro marcador relevante de daño en la membrana celular es la fuga de electrolitos, que refleja la pérdida de electrolitos a través de las membranas dañadas. Los niveles de este



parámetro aumentaron en todos los tratamientos durante el almacenamiento, indicando un deterioro progresivo de la integridad de las membranas debido a las bajas temperaturas. Sin embargo, los frutos tratados con la combinación de 1-MCP y JaMe mostraron los niveles más bajos, lo que sugiere una mayor estabilidad de las membranas y un retraso en el proceso de senescencia. Estos resultados coinciden con investigaciones previas que sugieren que tanto 1-MCP como JaMe contribuyen a preservar la integridad de las membranas al reducir el daño oxidativo y al potenciar la actividad de las enzimas antioxidantes (Maghoumi et al., 2022; Zhang et al., 2023). En particular, el 1-MCP se ha descrito como un agente eficaz para disminuir la acción del etileno, ayudando así a ralentizar procesos metabólicos relacionados con el daño por frío que contribuyen al deterioro de las membranas. (Li et al., 2017). Aunque los tratamientos individuales de 1-MCP o JaMe no previnieron totalmente el daño por frío externo, su combinación resultó más eficaz para mitigar los síntomas tanto en la corteza como en el mesocarpio. Este efecto parece deberse a la acción combinada del 1-MCP, que reduce la actividad basal del etileno, y del JaMe, que fortalece la tolerancia al estrés mediante la activación de respuestas antioxidantes (Aghdam et al., 2018). La consecuencia es una reducción de la peroxidación de lípidos y una mayor integridad de las membranas celulares, reflejada en menores niveles de daños por frío en los frutos tratados. La aparición de estos daños está estrechamente vinculada con un incremento en la permeabilidad de la membrana y cambios en la composición de lípidos y proteínas, tal como se documenta en estudios anteriores (Bouchereau et al., 1999). La capacidad del 1-MCP y JaMe para conservar la integridad de la membrana, reduciendo los niveles de fuga de electrolitos y MDA, podría ser clave para mitigar el daño por frío en las granadas. Aunque ningún tratamiento pudo eliminar completamente estos daños a 2 °C, los tratamientos combinados retrasaron significativamente su aparición, lo que indica que estas estrategias podrían ser más efectivas a temperaturas de almacenamiento ligeramente superiores.

El uso de películas plásticas como PBAT-PLA y LLDPE también resultó ser eficaz para reducir el daño por frío en las granadas durante el almacenamiento. En particular, se observó una disminución significativa en el daño interno y externo en los frutos envueltos



en estas películas en comparación con los frutos control (Publicación VI). Este resultado respalda estudios previos, que han demostrado que las atmósferas modificadas pasivas, generadas dentro del envasado del fruto, pueden ralentizar la aparición de los daños por frío al reducir la exposición al oxígeno y elevar las concentraciones de CO₂, lo que disminuye la tasa de respiración y retrasa la senescencia (Artés et al., 2000; Selcuk y Erkan, 2013; 2014; Candir et al., 2018). La selección adecuada de la película, junto con el control de las condiciones internas del envasado, puede extender la vida útil de la fruta y preservar su calidad, minimizando el daño por frío y protegiendo la integridad de los tejidos.

5.3 Efecto de los tratamientos sobre la calidad funcional del fruto

La granada es un fruto rico en una amplia variedad de compuestos bioactivos, destacando los fenoles como antocianinas, taninos hidrolizables, otros flavonoides complejos y el ácido ascórbico. Estos se encuentran en concentraciones considerablemente altas en comparación con otras frutas típicas de la dieta mediterránea, aunque su contenido varía según el cultivar, la etapa de maduración, las prácticas agrícolas y las condiciones ambientales (Pathare et al., 2013; Mphahlele et al., 2014; Matityahu et al., 2014; Radunić et al., 2015; Li et al., 2015; Boussaa et al., 2019; Chen et al., 2023). Estos compuestos destacan por su notable capacidad antioxidante, lo que refuerza los efectos beneficiosos del consumo de granada para la salud, como han señalado diversos estudios (Faria y Calhau, 2011; Asgary et al., 2017; Doostkam et al., 2020; Mattioli et al., 2020). Los compuestos fenólicos, en especial las antocianinas, son metabolitos secundarios que poseen propiedades protectoras frente a múltiples enfermedades crónicas y asociadas al envejecimiento, tales como hipertensión, obesidad, diabetes, afecciones cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos y cáncer (Mirdehghan et al., 2007; Panth et al., 2017; Sureda et al., 2018; Mattioli et al., 2020; Luo et al., 2021). La actividad antioxidante en los arilos de granada, al igual que en otras especies de frutas, se atribuye principalmente a compuestos hidrofílicos, como los fenoles (incluidas las antocianinas) y el ácido ascórbico (Serrano et al., 2005; Valero y Serrano, 2010; Radunić et al., 2015; Boussaa et al., 2019). Los resultados demostraron que el contenido total de antocianinas en los arilos al momento de la cosecha varió entre los



cultivares estudiados. Las mayores concentraciones se observaron en las grandas cv. “Bigful”, “Wonderful” y “Kingdom”, mientras que la variedad Mollar de Elche presentó un contenido significativamente más bajo de antocianinas (Publicación I). Estudios previos han demostrado que el contenido de antocianinas en los arilos de granada aumenta durante el almacenamiento en frío (Lufu et al., 2023) incluso cuando los frutos se conservan a temperaturas de 2 °C (Mirdehghan et al., 2007; Sayyari et al., 2011). Este incremento se atribuye a un aumento en la actividad de las enzimas PAL y GT, que desempeñan un papel clave en las rutas biosintéticas de fenoles y antocianinas (Aghdam et al., 2020; Lufu et al., 2023).

El tratamiento en precosecha con melatonina a concentraciones de 0,1, 0,3 y 0,5 mM ha demostrado aumentar el contenido de antocianinas en los frutos en comparación con las granadas no tratadas, lo que llevó a un aumento de la actividad antioxidante (Publicación II). Entre estas concentraciones, la aplicación de 0,1 mM destacó como la más efectiva, promoviendo un incremento significativo en el contenido de antocianinas. Si bien no existen estudios previos específicos sobre la granada cv. “Mollar de Elche”, la literatura reporta algunos efectos del tratamiento con melatonina en otras especies frutales. Por ejemplo, en plantas de tomate, la aplicación de 0,1 mM de melatonina aumentó los niveles de compuestos antioxidantes, como licopeno, β -caroteno, fenoles totales y flavonoides, además de mejorar la actividad antioxidante del fruto, especialmente bajo condiciones de estrés causado por lluvia ácida (Debnath et al., 2018). En albaricoque, la pulverización foliar con 0,1 mM de melatonina incrementó de forma significativa el contenido de compuestos fenólicos, lo cual se asocia a una mejora en la capacidad antioxidante de los frutos (Medina-Santamaría et al., 2021). Además, en frambuesa y arándano, el tratamiento con 0,1 mM incrementó significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes (Shah et al., 2023; 2024). En el caso del pimiento, tanto la pulverización foliar como el riego con una concentración de 0,1 mM incrementaron la actividad de enzimas antioxidantes, favoreciendo el desarrollo del fruto (Nasiri et al., 2024). De manera similar, la aplicación foliar de melatonina a concentraciones de 0,05 o 0,1 mM en cereza aumentó las concentraciones de fenoles totales, flavanoles, antocianinas y ácido ascórbico en los frutos durante la cosecha (Xia et al., 2020).



Por otro lado, el uso de la melatonina en tratamientos poscosecha para mejorar los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante se ha investigado más ampliamente en diferentes frutas. Por ejemplo, en la ciruela cv. “Santa Rosa” el tratamiento de inmersión poscosecha con 0,1 mM de melatonina resultó en mayores niveles de ácido ascórbico, fenoles totales y actividad antioxidante durante el almacenamiento en comparación con los frutos no tratados (Bal, 2019). Resultados similares se observaron en fresas tratadas con 0,1 o 1 mM de melatonina (Liu et al., 2018). Además, el tratamiento de inmersión en nectarinas con 0,25, 0,5 y 1 mM de melatonina durante 30 minutos, así como en melocotones con 0,1 mM durante 10 minutos, mitigó las pérdidas de polifenoles durante el almacenamiento a 1 °C (Gao et al., 2018; Bal, 2021). Asimismo, en cerezas, la inmersión con 0,1 mM de melatonina incrementó el contenido de antocianinas durante el almacenamiento, debido a una sobreexpresión inducida de los genes dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y antocianidina 3-O-glucosiltransferasa (UFGT), que codifican enzimas clave en las etapas finales de la biosíntesis de antocianinas (Miranda et al., 2020). En kiwi y fresa, el tratamiento por inmersión de los frutos con 0,1 mM de melatonina durante 30 y 5 minutos, respectivamente, incrementó significativamente el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante, (Liu et al., 2018; Wang et al., 2019). Efectos similares fueron observados en mango, donde la inmersión con 1 mM durante 10 minutos mejoró la actividad de las enzimas CAT y POX (Rastegar et al., 2020a). En papaya (Fan et al., 2022a), arándanos (Shang et al., 2021), guayaba (Fan et al., 2022b), manzana (Onik et al., 2021) y ciruela (Bal, 2019), la melatonina también mejoró la actividad de diferentes enzimas antioxidantes. Sin embargo, el perfil de antocianinas en la granada no se vio afectado por el tratamiento con melatonina, independientemente de la concentración aplicada, siendo la cianidina 3-glucósido la antocianina mayoritaria, seguida de la delfinidina 3-glucósido, la cianidina 3,5-di-glucósido y la pelargonidina 3-glucósido (Publicación II) de acuerdo con informes previos sobre la concentración de antocianinas individuales en este cultivar (Mena et al., 2012; Laribi et al., 2013; Radunić et al., 2015). El perfil de antocianinas parece ser similar en todos los cultivares de granada, aunque la proporción relativa de cada una es diferente. Así, la cianidina 3-glucósido también se reportó como la antocianina predominante en la granada cv. “Wonderful” (Gil et al., 1995), mientras que la delfinidina 3-glucósido fue la antocianina



mayoritaria en algunos cultivares croatas (Radunić et al., 2015), la pelargonidina 3,5-di-glucósido en cultivares iraníes (Mousavinejad et al., 2009) y la cianidina 3,5-di-glucósido en cultivares tunecinos (Hasnaoui et al., 2011).

Por otro lado, el tratamiento en precosecha con GABA incrementó significativamente el contenido de polifenoles y antocianinas totales en las granadas, destacando la concentración de 100 mM como la más efectiva (Publicación IV). El aumento en el contenido total e individual de antocianinas tras las aplicaciones de GABA antes de la cosecha dio lugar a frutos con un color rojo más intenso en los arilos, por lo que podría aumentar su aceptación por parte de los consumidores (Fadavi et al., 2005; Sayyari et al., 2009; Habibi et al., 2022). El perfil de antocianinas no se vio influenciado por los tratamientos con GABA antes de la cosecha, independientemente de la concentración ensayada. Sin embargo, es importante destacar que los tratamientos con GABA aumentaron las concentraciones de todas las antocianinas individuales. Cabe destacar que el contenido de antocianinas fue mayor en el experimento de 2020 que en el de 2019, tanto en los frutos tratados con GABA como en los controles. Estas diferencias podrían explicarse por las temperaturas registradas durante las últimas semanas de maduración de los frutos. Las temperaturas nocturnas fueron más bajas en 2020 que en 2019, y las diferencias entre las temperaturas diurnas y nocturnas fueron mayores en el segundo año, lo que ha demostrado aumentar la biosíntesis de antocianinas en otros frutos rojos, como la naranja sanguina (Butelli et al., 2012). Diversos estudios han informado que los tratamientos poscosecha con GABA aumentan o mantienen niveles más altos de compuestos fenólicos durante el almacenamiento en varias especies de frutas. Por ejemplo, el tratamiento poscosecha con GABA incrementó el contenido fenólico en mango (Rastegar et al., 2020a) y, en uvas de mesa, promovió aumentos en ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides y antocianidinas durante el almacenamiento, atribuidos a la menor actividad de la enzima PPO (Asgarian et al., 2022). De manera similar, la inmersión de naranja sanguina en GABA condujo a un mayor contenido de compuestos fenólicos y antocianinas durante el almacenamiento (Habibi et al., 2020), mientras que en los frutos de aonla (*Embllica officinalis*) el tratamiento mantuvo mayores niveles de compuestos fenólicos y flavonoides durante el almacenamiento en frío (Ali et al., 2022), al igual que en la carambola (Mekontso et al., 2021). Además, el GABA



aumentó los niveles de fenoles y antocianinas en cereza, lo cual se relacionó con un aumento en la actividad de la enzima PAL y una reducción en la actividad de la PPO (Aghdam et al., 2019). De manera similar, Carrión-Antolí et al. (2024) concluyeron que el tratamiento con 50 mM de GABA mediante pulverización foliar en cereza resultó en un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes.

Considerando que el contenido fenólico en los arilos de granada disminuye a medida que el fruto madura (Mphahlele et al., 2014), la reducción de la actividad de la PPO por efecto del GABA podría resultar en un mayor contenido fenólico en el momento de la cosecha. Además, algunos genes clave involucrados en la biosíntesis de flavonoides, como los que codifican las enzimas PAL, ligasa de 4-coumaroyl-CoA (4CL) y chalcona sintasa (CHS), han mostrado aumentar su expresión con los tratamientos de GABA en hojas de plántulas de álamo (Xie et al., 2019). En cuanto a granadas, Nazoori et al. (2020) demostraron que la inmersión de los frutos en GABA a concentraciones de 5 y 15 mM retrasó la pérdida de antocianinas y compuestos fenólicos durante el almacenamiento. Por otro lado, el tratamiento de arilos de la variedad Hicaznar con 2,5 y 5 mM de GABA no afectó el contenido fenólico total ni las antocianinas durante el almacenamiento (Öz et al., 2017).

En el estudio con los tratamientos de 1-MCP y JaMe, se observó un comportamiento diferenciado en los polifenoles presentes en los arilos. Inicialmente, estos compuestos mostraron un aumento durante los primeros días de almacenamiento, seguido de una disminución en todos los tratamientos, probablemente debido a la degradación mediada por la enzima PPO (El-Beltagi et al., 2023). Sin embargo, la aplicación de 1-MCP resultó eficaz en retrasar esta degradación, ya que los frutos tratados con 1-MCP mantuvieron un mayor contenido de polifenoles en los arilos en comparación con los demás lotes (Publicación V). Este efecto es consistente con investigaciones previas que sugieren que el 1-MCP puede inhibir la actividad de la enzima PPO, reduciendo la oxidación de los polifenoles y prolongando su estabilidad durante el almacenamiento (Maghoubi et al., 2022). En cuanto a las antocianinas, los resultados indican que el tratamiento con JaMe, ya sea aplicado solo o en combinación con 1-MCP, promovió un aumento significativo de aproximadamente el 20 % en el contenido de estos compuestos. El efecto positivo de JaMe en la acumulación de antocianinas se respalda con investigaciones anteriores que



sugieren que este compuesto puede estimular la biosíntesis de flavonoides y otros compuestos fenólicos durante la maduración de la fruta y en el almacenamiento poscosecha (Giménez et al., 2015). La combinación de 1-MCP y JaMe mostró ser particularmente eficaz en mantener altos niveles de antocianinas a lo largo del estudio. Esta interacción sinérgica puede deberse a los diferentes mecanismos de acción de ambos compuestos, ya que mientras que el JaMe estimula la acumulación de antocianinas, el 1-MCP puede inhibir la degradación de estas moléculas al reducir la actividad oxidativa de la PPO (Maghoumi et al., 2022). Este enfoque dual, que combina la capacidad de estimulación del JaMe con la protección antioxidante del 1-MCP, ofrece una estrategia prometedora para maximizar la calidad organoléptica y funcional de la granada.

En cuanto al estudio llevado a cabo con el envasado de las películas plásticas, se observó una correlación positiva entre el índice de madurez y el contenido total de antocianinas, lo que sugiere que la acumulación de antocianinas en los arilos está estrechamente relacionada con el avance en la maduración de los frutos (Publicación VI). Sin embargo, se registró una disminución en la concentración de antocianinas tras las primeras semanas de almacenamiento, especialmente en los frutos control, atribuible a la acción de las enzimas oxidativas que degradan estos compuestos si los frutos no presentan una protección adecuada (Holcroft y Kader, 1999). Las películas plásticas empleadas en el experimento demostraron ser eficaces en preservar las concentraciones de antocianinas, en línea con estudios previos que resaltan que las atmósferas modificadas pasivas pueden mantener estos niveles al limitar la exposición al oxígeno y disminuir la tasa de respiración (Holcroft et al., 1998). Este efecto es especialmente relevante para las variedades que son más susceptibles a la pérdida de estos compuestos. Además, se ha evidenciado que la presencia de niveles moderados de CO₂ en el entorno del fruto puede estimular la síntesis de antocianinas, favoreciendo la preservación del color y la calidad visual de las granadas envasadas (Holcroft et al., 1998).



6. CONCLUSIONES



La granada cv. “Mollar de Elche”, valorada por sus propiedades organolépticas, nutricionales y funcionales, enfrenta desafíos importantes durante su almacenamiento poscosecha, siendo el daño por frío uno de los más relevantes. Este fenómeno, que compromete la calidad visual y estructural del fruto, varía en intensidad según las características bioquímicas y estructurales de cada variedad. Factores como un alto contenido de antocianinas y ácido cítrico en los arilos pueden aumentar la sensibilidad al daño por frío, mientras que la acumulación de ácido oxálico y un mayor contenido de calcio en la cáscara parecen fortalecer la tolerancia. Estos hallazgos resaltan la importancia de desarrollar estrategias innovadoras y efectivas para mitigar el daño por frío, optimizar la conservación y preservar la calidad de los frutos durante su almacenamiento. En este contexto, el empleo de tratamientos precosecha con melatonina y ácido γ -aminobutírico (GABA), así como el uso poscosecha del 1-metilciclopropeno (1-MCP), jasmonato de metilo (JaMe) y películas plásticas, tanto convencionales como biodegradables, se perfila como una serie de estrategias prometedoras.

El uso de tratamientos precosecha con melatonina y GABA en árboles de granado de la variedad “Mollar de Elche” representó una estrategia innovadora para abordar desafíos relacionados con la mejora de la calidad de los frutos, la optimización del rendimiento del cultivo y la extensión de la vida útil postcosecha. Sin embargo, la elección entre estos tratamientos requiere una evaluación minuciosa de sus beneficios relativos, impactos económicos y aplicaciones comerciales en función de las prioridades del productor y las demandas del mercado.

La melatonina, aplicada a dosis de 0,1 mM, ha demostrado ser altamente efectiva para aumentar la concentración de compuestos bioactivos como los polifenoles totales y las antocianinas, los cuales son responsables del color rojo intenso de los arilos y de su actividad antioxidante. Además, su capacidad para preservar parámetros como la firmeza, la acidez y los sólidos solubles durante un almacenamiento de 60 días subraya su eficacia en la conservación postcosecha, haciendo de este tratamiento una herramienta valiosa para mercados donde la frescura y la calidad funcional son factores determinantes.



Por otro lado, el GABA, aplicado a concentraciones de 100 mM, destacó por su capacidad para intensificar la coloración de los frutos, un atributo esencial para la comercialización internacional de la variedad “Mollar de Elche”, cuya corteza y arilos presentan naturalmente una menor pigmentación en comparación con otras variedades como “Wonderful”. Este tratamiento no solo mejora la apariencia visual de los frutos, sino que también incrementa el rendimiento del cultivo, ya que se observó un aumento significativo en el número de frutos por árbol, lo que se traduce en un beneficio económico directo para los agricultores. Aunque el GABA también contribuyó a la reducción de la pérdida de peso y al mantenimiento de una firmeza adecuada durante el almacenamiento, su impacto en parámetros nutritivos y funcionales como los niveles de acidez y antioxidantes fue menos pronunciado en comparación con la melatonina.

Desde una perspectiva económica, es crucial considerar que la melatonina representa un costo significativamente mayor en comparación con el GABA, lo que podría limitar su uso, especialmente en explotaciones agrícolas pequeñas o con recursos financieros limitados. Sin embargo, su eficacia en concentraciones bajas y su capacidad para proporcionar un producto de calidad superior justifican su uso en nichos de mercado donde los consumidores están dispuestos a pagar un precio más alto por frutas con un mayor valor funcional debido a sus propiedades antioxidantes.

En contraste, el GABA ofrece una solución más económica y accesible, siendo ideal para productores que buscan maximizar el rendimiento del cultivo y mejorar la apariencia de los frutos para mercados mayoristas o internacionales donde el precio y la cantidad producida son factores prioritarios. Ambos tratamientos extienden la vida útil de los frutos durante el almacenamiento, aunque lo hacen a través de mecanismos diferentes. La melatonina estabiliza los compuestos bioactivos y mantiene la calidad organoléptica a lo largo del tiempo, mientras que el GABA retrasa el proceso de maduración, preservando una apariencia atractiva. Estas diferencias refuerzan la idea de que la elección del tratamiento debe estar alineada con los objetivos específicos del productor.



Por otro lado, la aplicación de estrategias en poscosecha para las granadas también han demostrado ser efectiva no solo en mantener la calidad de los frutos y prolongar su vida útil, sino también en alinearse con tecnologías que buscan reducir el impacto ambiental. El tratamiento combinado de 1-MCP y JaMe se presenta como una alternativa destacada para la conservación poscosecha de granadas almacenadas a temperaturas subóptimas. Esta combinación ha mostrado resultados superiores en comparación con el uso individual de cada compuesto, gracias a un efecto sinérgico que mejora la firmeza del fruto, reduce la pérdida de peso y aumenta la concentración de compuestos bioactivos como polifenoles y antocianinas. Estas mejoras se atribuyen a la capacidad del 1-MCP para inhibir la acción del etileno y retrasar la senescencia, mientras que JaMe activa mecanismos antioxidantes y fortalece la integridad de las membranas celulares. Estos beneficios son particularmente valiosos en mercados que exigen productos de alta calidad funcional y organoléptica.

Por otra parte, las películas plásticas utilizadas como envolturas poscosecha representan una solución práctica para reducir la pérdida de peso y mantener la calidad durante el almacenamiento. Las películas convencionales de polietileno lineal de baja densidad (LLDPE) destacaron por su efectividad en minimizar la pérdida de peso y preservar la firmeza de los frutos, superando a las películas biodegradables de ácido poliláctico y adipato de butileno-co-tereftalato (PLA-PBAT) en términos de desempeño técnico. No obstante, las películas biodegradables ofrecen una alternativa ambientalmente sostenible al ser compostables y contribuir a la reducción de residuos plásticos, aunque presentan un costo más elevado. Estas películas biodegradables, a pesar de su mayor permeabilidad al vapor de agua y al CO₂, lograron reducir significativamente los daños por frío en comparación con los frutos sin envolver, posicionándose como una opción alineada con las tendencias globales hacia la sostenibilidad en la cadena de suministro agrícola.

Desde una perspectiva económica, las diferencias de costos entre materiales y tratamientos químicos son cruciales. Las películas convencionales como el LLDPE son más accesibles y ampliamente utilizadas debido a su menor costo, lo que las hace atractivas para agricultores que priorizan la rentabilidad. Sin embargo, las películas



biodegradables, aunque más caras, responden a las demandas de mercados enfocados en la sostenibilidad ambiental y en consumidores preocupados por la huella ecológica de los productos que adquieren. De esta manera, el desarrollo y la implementación de tecnologías poscosecha más sostenibles, como las películas biodegradables, están directamente vinculadas con los principios de la Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), particularmente con los objetivos de producción y consumo responsables (ODS 12) y acción por el clima (ODS 13). Estas acciones no solo buscan garantizar la calidad y reducción de pérdidas en la cadena alimentaria, sino que también contribuyen a la transición hacia prácticas más sostenibles, promoviendo un equilibrio entre desarrollo económico, cuidado ambiental y bienestar social.



▶ 7. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN



En primer lugar, futuras líneas de investigación podrían centrarse en la integración de los beneficios de la melatonina y el GABA en un enfoque combinado que optimice tanto la calidad funcional como el rendimiento comercial de las granadas cv. “Mollar de Elche”. Esta estrategia permitiría maximizar las fortalezas individuales de ambos tratamientos: la melatonina como agente promotor de la estabilidad antioxidante y la conservación prolongada, y el GABA como potenciador del rendimiento y de las características visuales del fruto. El diseño experimental de esta línea de investigación podría incluir la evaluación de tratamientos secuenciales o combinados en diferentes etapas fenológicas del cultivo. Por ejemplo, se podría investigar la aplicación de melatonina durante etapas críticas del desarrollo del fruto, como el inicio de la maduración, para potenciar la acumulación de compuestos bioactivos como antocianinas y polifenoles, y, posteriormente, aplicar GABA en momentos próximos a la cosecha para incrementar el rendimiento y mejorar la apariencia externa del fruto. Este enfoque permitiría no solo equilibrar los beneficios individuales de cada tratamiento, sino también adaptarlos a las demandas específicas de los mercados objetivo.

Además, sería relevante explorar las interacciones entre estos dos compuestos a nivel fisiológico, considerando sus posibles efectos sinérgicos o antagónicos sobre parámetros clave como la estabilidad de las membranas celulares, la regulación del metabolismo de los azúcares y ácidos orgánicos, y la tolerancia al estrés abiótico. Esta información podría ser crucial para optimizar las concentraciones aplicadas y los tiempos de aplicación, minimizando los costos asociados y maximizando la eficacia. Desde una perspectiva económica y ambiental, esta línea de investigación también podría evaluar la viabilidad comercial de esta estrategia combinada en diferentes escalas de producción. Se podrían realizar estudios comparativos que analicen el balance costo-beneficio, teniendo en cuenta las diferencias en los precios de la melatonina y el GABA, así como su impacto en la rentabilidad del cultivo. Asimismo, sería interesante estudiar la aceptación de esta metodología en mercados con altos estándares de sostenibilidad y calidad funcional.

Una segunda línea de investigación futura podría enfocarse en la integración de las estrategias poscosecha evaluadas, combinando el uso de 1-metilciclopropeno (1-MCP) y jasmonato de metilo (JaMe) con tecnologías de envasado avanzadas, como las películas



biodegradables, para desarrollar un enfoque integral que maximice la calidad de los frutos, prolongue su vida útil y reduzca el impacto ambiental. Este enfoque permitiría explorar el efecto sinérgico entre los tratamientos químicos y las propiedades protectoras del envasado, optimizando tanto la conservación fisiológica como la reducción de la pérdida de peso y el daño por frío.

Una investigación de este tipo podría centrarse en evaluar cómo el uso combinado de 1-MCP y JaMe dentro de un sistema de envasado con películas biodegradables influye en parámetros clave como la firmeza, la estabilidad de los compuestos bioactivos (antocianinas y polifenoles), y las características organolépticas durante el almacenamiento prolongado. Además, sería relevante investigar cómo las propiedades de las películas, como su permeabilidad al vapor de agua y gases, podrían interactuar con los efectos de los tratamientos químicos para mejorar aún más la calidad del fruto.

Desde una perspectiva económica y ambiental, este enfoque también ofrecería una oportunidad para desarrollar soluciones sostenibles que sean viables tanto para grandes productores como para pequeñas explotaciones agrícolas. En este contexto, podría evaluarse el balance costo-beneficio de estas combinaciones y su aceptación en mercados que prioricen localidad y la sostenibilidad.



7. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

~ A ~

- Abd El-Naby, S. K. M. A., Mohamed, A. A. A., & El-Naggar, Y. I. M. (2019). Effect of melatonin, GA3 and NAA on vegetative growth, yield and quality of 'Canino' apricot fruits. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 18, 167-174.
doi : [10.24326/asphc.2019.3.16](https://doi.org/10.24326/asphc.2019.3.16)
- Abdul-Khalil, H. P. S., Banerjee, A., Saurabh, C. K., Tye, Y. Y., Suriani, A. B., Mohamed, A., Karim, A. A., & Paridah, M. T. (2018). Biodegradable films for fruits and vegetables packaging application: Preparation and properties. *Food Engineering Reviews*, 10(2), 139-153.
doi: [10.1007/s12393-018-9180-3](https://doi.org/10.1007/s12393-018-9180-3)
- Afaq, F., Adhami, V. M., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2003). Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Oncogene*, 22(7), 1035-1044.
doi: [10.1038/sj.onc.1206206](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206206)
- Agridata.tn. (2019). *Ministère de l'Agriculture, des Ressources Hydrauliques et de la Pêche*. Acceso, Mayo 2023.
Disponible en: <http://www.agridata.tn/fr>
- Aghdam, M. S., Jannatizadeh, A., Luo, Z., & Paliyath, G. (2018). Ensuring sufficient intracellular ATP supply and friendly extracellular ATP signaling attenuates stresses, delays senescence, and maintains quality in horticultural crops during postharvest life. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 67-81.
doi: [10.1016/j.tifs.2018.04.003](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.003)
- Aghdam, M. S., Kakavand, F., Rabiei, V., Zaare-Nahandi, F., & Razavi, F. (2019). γ -Aminobutyric acid and nitric oxide treatments preserve sensory and nutritional quality of cornelian cherry fruits during postharvest cold storage by delaying softening and enhancing phenols accumulation. *Scientia Horticulturae*, 246, 812-817.
doi: [10.1016/j.scienta.2018.11.064](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.064)
- Aghdam, M. S., Luo, Z., Li, L., Jannatizadeh, A., Fard, J. R., & Pirzad, F. (2020). Melatonin treatment maintains nutraceutical properties of pomegranate fruits during cold storage. *Food Chemistry*, 303, 125385.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125385>

- Aguirre-Joya, J. A., De Leon-Zapata, M. A., Alvarez-Perez, O. B., Torres-León, C., Nieto-Oropeza, D. E., Ventura-Sobrevilla, J. M., Aguilar, M. A., Ruelas-Chacón, X., Rojas, R., Ramos-Aguñaga, M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Chapter 1 - Basic and applied concepts of edible packaging for foods. En *Food Packaging and Preservation* (pp. 1-61). Academic Press.
doi: [10.1016/B978-0-12-811516-9.00001-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00001-4)
- Ahuja, I., de Vos, R. C. H., Bones, A. M., & Hall, R. D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, 15(12), 664-674.
doi: [10.1016/j.tplants.2010.08.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.002)
- AIJN (Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the EEC). (2012). *Reference Guide for Pomegranate Juice*. AIJN, Brussels.
Disponibile en: <https://aijn.eu/en/reference-guidelines/pomegranate>
- Aina, O., Bakare, O. O., Daniel, A. I., Gokul, A., Beukes, D. R., Fadaka, A. O., Keyster, M., & Klein, A. (2022). Seaweed-derived phenolic compounds in growth promotion and stress alleviation in plants. *Life*, 12(10), 1548.
doi: [10.3390/life12101548](https://doi.org/10.3390/life12101548)
- Albornoz, K., Rosas, R., & López, M. D. (2023). Influence of a preharvest melatonin application on postharvest chilling injury in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Horticultural Research*, 31(2), 97-104.
doi: [10.2478/johr-2023-0025](https://doi.org/10.2478/johr-2023-0025)
- Alexander, L., & Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: A model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2039-2055.
doi: [10.1093/jxb/erf072](https://doi.org/10.1093/jxb/erf072)
- Ali, Z. M., Chin, L. H., Marimuthu, M., & Lazan, H. (2004). Low temperature storage and modified atmosphere packaging of carambola fruit and their effects on ripening-related texture changes, wall modification, and chilling injury symptoms. *Postharvest Biology and Technology*, 33(2), 181-192.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2004.02.007](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.007)
- Ali, S., Anjum, M. A., Ejaz, S., Hussain, S., Ercisli, S., Saleem, M. S., & Sardar, H. (2021). Carboxymethyl cellulose coating delays chilling injury development and maintains eating quality of 'Kinnow' mandarin fruits during low temperature storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 77-85.
doi: [10.1016/j.ijbiomac.2020.12.028](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.028)

- Ali, S., Anjum, M. A., Nawaz, A., Ejaz, S., Anwar, R., Khalik, G., Hussain, S., Ullah, S., Hussain, R., Saleem, M. S., & Hasan, M. U. (2022). Postharvest γ -aminobutyric acid application mitigates chilling injury of aonla (*Embllica officinalis*Gaertn.) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 185, 111803.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2021.111803](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111803)
- Ali, A. E., Husselmann, L. H., Tabb, D. L., & Ludidi, N. (2023). Comparative proteomics analysis between maize and sorghum uncovers important proteins and metabolic pathways mediating drought tolerance. *Life*, 13(1), 170.
doi: [10.3390/life13010170](https://doi.org/10.3390/life13010170)
- Al-Muammar, M. N., & Khan, F. (2012). Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition*, 28(6), 595-604.
doi: [10.1016/j.nut.2011.11.013](https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.11.013)
- Alnefaie, R. M., El-Sayed, S. A., Ramadan, A. A., Elmezien, A. I., El-Taher, A. M., Randhir, T. O., & Bondok, A. (2023). Physiological and anatomical responses of faba bean plants infected with chocolate spot disease to chemical inducers. *Life*, 13(2), 392.
doi: [10.3390/life13020392](https://doi.org/10.3390/life13020392)
- Arab Organization for Agricultural Development (AOAD). (2018). *Yearbook of agricultural statistics*. Acceso, Mayo 2023.
Disponible en: https://www.aoad.org/priod_en.htm
- Arendse, E., Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2014). Influence of storage temperature and duration on postharvest physico-chemical and mechanical properties of pomegranate fruit and arils. *Journal of Food Science and Technology*, 12(4), 389-398.
doi: [10.1080/19476337.2014.900114](https://doi.org/10.1080/19476337.2014.900114)
- Arnao, M. B., & Hernandez-Ruiz, J. (2019). Melatonin: A new plant hormone and/or a plant master regulator? *Trends in Plant Science*, 24, 38-48.
doi: [10.1016/j.tplants.2018.10.010](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.010)
- Arranz, S., Silván, J. M., & Saura-Calixto, F. (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(11), 1646-1658.
doi: [10.1002/mnfr.200900580](https://doi.org/10.1002/mnfr.200900580)
- 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 A*, 207, 316-321.
doi: [10.1007/s002170050339](https://doi.org/10.1007/s002170050339)

- Artés, F., Villaescusa, R., & Tudela, J. A. (2000). Modified atmosphere packaging of pomegranate. *Journal of Food Science*, 65(7), 1112-1116.
doi: [10.1111/j.1365-2621.2000.tb10248.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10248.x)
- Article19. (2018). Economy-Morocco: *Pomegranate cultivation, an important sector in the Béni Mellal-Khénifra region*. Acceso, Mayo 2023.
Disponibile en: <http://article19.ma/accueil/archives/103808>
- Asgarian, Z. S., Karimi, R., Ghabooli, M., & Maleki, M. (2022). Biochemical changes and quality characterization of cold-stored 'Sahebi' grape in response to postharvest application of GABA. *Food Chemistry*, 373, 131401.
doi: [10.1016/j.foodchem.2021.131401](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131401)
- Asgary, S., Keshvari, M., Sahebkar, A., & Sarrafzadegan, N. (2017). Pomegranate consumption and blood pressure: A review. *Current Pharmaceutical Design*, 23(7), 1042-1050.
doi: [10.2174/1381612822666161010103339](https://doi.org/10.2174/1381612822666161010103339)

~ B ~

- Badiche-El Hilali, F., Valverde, J. M., García-Pastor, M. E., Serrano, M., Castillo, S., & Valero, D. (2023). Melatonin postharvest treatment in leafy 'Fino' lemon maintains quality and bioactive compounds. *Foods*, 12(15), 2979.
doi: [10.3390/foods12152979](https://doi.org/10.3390/foods12152979)
- Badiche, F., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M., & Valero, D. (2024). Preharvest use of γ -aminobutyric acid (GABA) as an innovative treatment to enhance yield and maintain quality in lemon fruit. *Acta Horticulturae*, (1399), 331-336.
doi: [10.17660/ActaHortic.2024.1399.41](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2024.1399.41)
- Bagheri, M., & Esna-Ashari, M. (2022). Effects of postharvest methyl jasmonate treatment on persimmon quality during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 294, 110756.
doi: [10.1016/j.scienta.2021.110756](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110756)
- Bal, E. (2019). Physicochemical changes in 'Santa Rosa' plum fruit treated with melatonin during cold storage. *Food Measure*, 13, 1713-1720.
doi: [10.1007/s11694-019-00088-6](https://doi.org/10.1007/s11694-019-00088-6)
- Bal, E. (2021). Effect of melatonin treatments on biochemical quality and postharvest life of nectarines. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 288-295.
doi: [10.1007/s11694-020-00636-5](https://doi.org/10.1007/s11694-020-00636-5)

- Balbontín, C., Gutiérrez, C., Wolff, M., & Figueroa, C. R. (2018). Effect of abscisic acid and methyl jasmonate preharvest applications on fruit quality and cracking tolerance of sweet cherry. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(3), 438-446.
doi: [10.4067/S0718-58392018000300438](https://doi.org/10.4067/S0718-58392018000300438)
- Barman, K., Asrey, R., Pal, R. K., Kaur, C., & Jha, S. K. (2011). Influence of putrescine and carnauba wax on functional and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 111-117.
doi: [10.1007/s13197-011-0483-0](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0483-0)
- Barry, C. S., & Giovannoni, J. J. (2007). Ethylene and fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(2), 143-159.
doi: [10.1007/s00344-007-9002-y](https://doi.org/10.1007/s00344-007-9002-y)
- Bartual-Martos, J. (2014). Técnicas de cultivo en granado. *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)*, 33(379), 359-363.
Disponible en: <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/3848?show=full>
- Basu, A., & Penugonda, K. (2009). Pomegranate juice: A heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews*, 67(1), 49-56.
doi: [10.1111/j.1753-4887.2008.00133.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00133.x)
- Baswal, A., Dhaliwal, H., Singh, Z., Mahajan, B., & Gill, K. (2020). Postharvest application of methyl jasmonate, 1-methylcyclopropene, and salicylic acid extends the cold storage life and maintains the quality of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* L. × *C. deliciosa* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 161, 111064.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2019.111064](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111064)
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), 728-739.
doi: [10.1038/nrn920](https://doi.org/10.1038/nrn920)
- Berl, S., & Waelsch, H. (1958). Determination of glutamic acid, glutamine, glutathione and gamma-aminobutyric acid and their distribution in brain tissue. *Journal of Neurochemistry*, 3(2), 161-169.
doi: [10.1111/j.1471-4159.1958.tb12623.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1958.tb12623.x)
- Bhardwaj, A., Alam, T., & Talwar, N. (2019). Recent advances in active packaging of agri-food products: A review. *Journal of Postharvest Technology*, 7(1), 33-62.
Disponible en: <https://acspublisher.com/journals/index.php/jpht/article/view/15377>
- Blankenship, S. M., & Dole, J. M. (2003). 1-Methylcyclopropene: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 28(1), 1-25.
doi: [10.1016/S0925-5214\(02\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00246-6)

- Boonyaritthongchai, P., & Supapvanich, S. (2017). Effects of methyl jasmonate on physicochemical qualities and internal browning of 'Queen' pineapple fruit during cold storage. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 58, 479-487.
doi: [10.1007/s13580-017-0362-3](https://doi.org/10.1007/s13580-017-0362-3)
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., & Shabala, S. (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1241-1257.
doi: [10.1093/jxb/ert430](https://doi.org/10.1093/jxb/ert430)
- Boshadi, T., Moradinezhad, F., & Jahani, M. (2018). Effect of pre- and postharvest application of salicylic acid on quality attributes and decay of pomegranate fruit (cv. Shishe-Kab). *Journal of Applied Horticulture*, 20(2), 154-160.
doi: [10.37855/jah.2018.v20i02.27](https://doi.org/10.37855/jah.2018.v20i02.27)
- Bouché, N., & Fromm, H. (2004). GABA in plants: Just a metabolite? *Trends in Plant Science*, 9(3), 110-115.
doi: [10.1016/j.tplants.2004.01.006](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.01.006)
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., & Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Science*, 140(2), 103-125.
doi: [10.1016/S0168-9452\(98\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00218-0)
- Boussaa, F., Zaouay, F., Burlo-Carbonell, F., Nuncio-Jáuregui, N., Gmati, M., El Arbi, B., Melgarejo, P., Hernandez, F., & Mars, M. (2019). Combined effects of cropping system and harvest date determine quality and nutritional value of pomegranate fruits (*Punica granatum* L. cv. Gabsi). *Scientia Horticulturae*, 249, 419-431.
doi: [10.1016/j.scienta.2019.02.007](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.007)
- Bown, A. W., & Shelp, B. J. (1997). The metabolism and functions of [gamma]-aminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115(1), 1-5.
doi: [10.1104/pp.115.1.1](https://doi.org/10.1104/pp.115.1.1)
- Bron, I. U., Massucato, R. P., Oliveira Resende, E. C., Carvalho, R. F., Pereira da Silva, B. M., Cia, P., Azevedo, R. A., & Jacomino, A. P. (2023). Methyl jasmonate does improve postharvest conservation of 'Golden' papaya fruit. *Ciencia Rural*, 53.
doi: [10.1590/0103-8478cr20210652](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210652)
- Burketová, L., Sindelářová, M., & Sindelář, L. (1999). Benzothiadiazole as an inducer of β -1,3-glucanase and chitinase isozymes in sugar beet. *Biologia Plantarum*, 42, 279-287.
doi: [10.1023/A:1002172921426](https://doi.org/10.1023/A:1002172921426)

Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., Reforgiato-Recupero, G., & Martin, C. (2012). Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *Plant Cell*, 24, 1242-1255.

doi: [10.1105/tpc.111.095232](https://doi.org/10.1105/tpc.111.095232)

~ C ~

Cai, H. F., Han, S., Yu, M. L., Ma, R. J., & Yu, Z. F. (2020). The alleviation of methyl jasmonate on loss of aroma lactones correlated with ethylene biosynthesis in peaches. *Journal of Food Science*, 85(8), 2389-2397.

doi: [10.1111/1750-3841.15339](https://doi.org/10.1111/1750-3841.15339)

Caicedo-López, L. H., Villagómez Aranda, A. L., Sáenz de la O, D., Gómez, C. E. Z., Márquez, E. E., & Zepeda, H. R. (2021). Elicitors: Bioethical implications for agriculture and human health. *Revista Bioética*, 29, 76-86.

doi: [10.1590/1983-80422021291448](https://doi.org/10.1590/1983-80422021291448)

Caleb, O. J., Mahajan, P. V., Opara, U. L., & Witthuhn, C. R. (2012a). Modelling the respiration rates of pomegranate fruit and arils. *Postharvest Biology and Technology*, 64(1), 49-54.

doi: [10.1016/j.postharvbio.2011.09.013](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.013)

Caleb, O. J., Opara, U. L., & Witthuhn, C. R. (2012b). Modified atmosphere packaging of pomegranate fruit and arils: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 15-30.

doi: [10.1007/s11947-011-0525-7](https://doi.org/10.1007/s11947-011-0525-7)

California Department of Food and Agriculture (CDFA). (2020). *California Department of Food and Agriculture*. Acceso, Mayo 2023.

Disponible en: <https://www.cdfa.ca.gov/Statistics/>

Candir, E., Ozdemir, A. E., & Aksoy, M. C. (2018). Effects of chitosan coating and modified atmosphere packaging on postharvest quality and bioactive compounds of pomegranate fruit cv. 'Hicaznar'. *Scientia Horticulturae*, 235, 235-243.

doi: [10.1016/j.scienta.2018.03.017](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.017)

Cano-Lamadrid, M., Galindo, A., Collado-González, J., Rodríguez, P., Cruz, Z. N., Legua, P., Burló, F., Morales, D., Carbonell-Barrachina, A., & Hernández, F. (2018). Influence of deficit irrigation and crop load on the yield and fruit quality in Wonderful and Mollar de Elche pomegranates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 3098-3108.

doi: [10.1002/jsfa.8810](https://doi.org/10.1002/jsfa.8810)

- Cao, G., Russell, R. M., Lischner, N., & Prior, R. L. (1998). Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *The Journal of Nutrition*, 128(12), 2383-2390.
doi: [10.1093/jn/128.12.2383](https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2383)
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H., & Tang, S. (2010). Effect of methyl jasmonate on cell wall modification of loquat fruit in relation to chilling injury after harvest. *Food Chemistry*, 118(3), 641-647.
doi: [10.1016/j.foodchem.2009.05.047](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.047)
- Carbonell-Barrachina, Á. A., Calín-Sánchez, A., Bagatar, B., Hernández, F., Legua, P., Martínez-Font, R., & Melgarejo, P. (2012). Potential of Spanish sour-sweet pomegranates (cultivar C25) for the juice industry. *Food Science and Technology International*, 18(2), 129-138.
doi: [10.1177/1082013211414783](https://doi.org/10.1177/1082013211414783)
- Carrión-Antolí, A., Lorente-Mento, J. M., Valverde, J. M., Castillo, S., Valero, D., & Serrano, M. (2022). Effects of melatonin treatment on sweet cherry tree yield and fruit quality. *Agronomy*, 12(1), 3.
doi: [10.3390/agronomy12010003](https://doi.org/10.3390/agronomy12010003)
- Carrión-Antolí, A., Badiche-El Hilali, F., Lorente-Mento, J. M., Díaz-Mula, H. M., Serrano, M., & Valero, D. (2024). Antioxidant systems and quality in sweet cherries are improved by preharvest GABA treatments leading to delay postharvest senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 260.
doi: [10.3390/ijms25010260](https://doi.org/10.3390/ijms25010260)
- Cavanagh, C., Morell, M., Mackay, I., & Powell, W. (2008). From mutations to MAGIC: Resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(2), 215-221.
doi: [10.1016/j.pbi.2008.01.002](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.01.002)
- Changwichan, K., Silalertruksa, T., & Gheewala, S. H. (2018). Eco-efficiency assessment of bioplastics production systems and end-of-life options. *Sustainability*, 10(4), 952.
doi: [10.3390/su10040952](https://doi.org/10.3390/su10040952)
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(6), 493-496.
doi: [10.4161/psb.4.6.8392](https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8392)

- Chen, C., Sun, C., Wang, Y., Gong, H., Zhang, A., Yang, Y., Guo, F., Cui, K., Fan, X., & Li, X. (2023). The preharvest and postharvest application of salicylic acid and its derivatives on storage of fruit and vegetables: A review. *Scientia Horticulturae*, 312, 111858.
doi: [10.1016/j.scienta.2023.111858](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111858)
- Cheng, P., Yue, Q., Zhang, Y., Zhao, S., Khan, A., Yang, X., He, J., Wang, S., Shen, W., Qian, Q., Du, W., Ma, F., Zhang, D., & Guan, Q. (2023). Application of γ -aminobutyric acid (GABA) improves fruit quality and rootstock drought tolerance in apple. *Journal of Plant Physiology*, 280, 153890.
doi: [10.1016/j.jplph.2022.153890](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153890)
- Cherian, S., Figueroa, C. R., & Nair, H. (2014). 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: A cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(15), 4705-4722.
doi: [10.1093/jxb/eru280](https://doi.org/10.1093/jxb/eru280)
- Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2), 153-177.
doi: [10.1007/s11101-012-9242-8](https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8)
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., et al. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671.
doi: [10.1038/nature06006](https://doi.org/10.1038/nature06006)
- Chinnusamy, V., & Zhu, J.-K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 133-139.
doi: [10.1016/j.pbi.2008.12.006](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.006)
- Choudhary, M. L., Dikshit, S. N., Shukla, N., & Saxena, R. R. (2008). Evaluation of guava (*Psidium guajava* L.) varieties and standardization of recipe for nectar preparation. *Journal of Horticultural Sciences*, 3(2).
doi: [10.24154/jhs.v3i2.581](https://doi.org/10.24154/jhs.v3i2.581)
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins-Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1118-1125.
doi: [10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9)
- Cong, F., Zhang, Y., & Dong, W. (2007). Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 71-75.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2007.04.005](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.04.005)

Cui, S. M., Sasada, Y., Sato, H., & Nii, N. (2004). Cell structure and sugar and acid contents in the arils of developing pomegranate fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73, 241-243.

doi: [10.2503/jshs.73.241](https://doi.org/10.2503/jshs.73.241)

~ D ~

D'Aquino, S., Palma, A., Schirra, M., Continella, A., Tribulato, E., & La Malfa, S. (2010). Influence of film wrapping and fludioxonil application on quality of pomegranate fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 55(2), 121-128.

doi: [10.1016/j.postharvbio.2009.08.006](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.08.006)

De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Martínez-Ruiz, N. R., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A., & Rodrigo-García, J. (2024). The preharvest application of stress response elicitors improves the content of bioactive compounds without modifying the sensory attributes of butterhead lettuce (*Lactuca sativa var. capitata*). *Foods*, 13(16), 2574.

doi: [10.3390/foods13162574](https://doi.org/10.3390/foods13162574)

Debnath, B., Hussain, M., Li, M., Lu, X., Sun, Y., & Qiu, D. (2018). Exogenous melatonin improves fruit quality features, health-promoting antioxidant compounds, and yield traits in tomato fruits under acid rain stress. *Molecules*, 23(8), 1868.

doi: [10.3390/molecules23081868](https://doi.org/10.3390/molecules23081868)

Dedieu, I., Peyron, S., Gontard, N., & Aouf, C. (2022). The thermo-mechanical recyclability potential of biodegradable biopolyesters: Perspectives and limits for food packaging application. *Polymer Testing*, 111, 107620.

doi: [10.1016/j.polymertesting.2022.107620](https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2022.107620)

Dempsey, D. A. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., & Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*, 9, 0156.

doi: [10.1199/tab.0156](https://doi.org/10.1199/tab.0156)

Deng, Y., Xu, L., Zeng, X., Li, Z., Qin, B., & He, N. (2010). New perspective of GABA as an inhibitor of formation of advanced lipoxidation end-products: Its interaction with malondialdehyde. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6(4), 318-324.

doi: [10.1166/jbn.2010.1130](https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1130)

Dhall, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 435-450.

doi: [10.1080/10408398.2010.541568](https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568)

Dong, C. J., & Shang, Q. M. (2013). Genome-wide characterization of phenylalanine ammonia-lyase gene family in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Planta*, 238(1), 35-49.
doi: [10.1007/s00425-013-1869-1](https://doi.org/10.1007/s00425-013-1869-1)

Doostkam, A., Bassiri-Jahromi, S., & Iravani, K. (2020). *Punica granatum* with multiple effects in chronic diseases. *International Journal of Fruit Science*, 20(3), 471-494.
doi: [10.1080/15538362.2019.1653809](https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1653809)

~ E ~

Ehsanimehr, N., Hosseinifarahi, M., Abdipour, M., Eshghi, S., & Jamali, B. (2024). Improving postharvest quality and vase life of cut rose flowers by pre-harvest foliar co-applications of γ -aminobutyric acid and calcium chloride. *Scientific Reports*, 14, 14520.
doi: [10.1038/s41598-024-64021-8](https://doi.org/10.1038/s41598-024-64021-8)

Ekrami-Rad, N., Khazaei, J., & Khoshtaghaza, M. H. (2011). Selected mechanical properties of pomegranate peel and fruit. *International Journal of Food Properties*, 14(3), 570-582.
doi: [10.1080/10942910903291920](https://doi.org/10.1080/10942910903291920)

El-Beltagi, H. S., Al-Otaibi, H. H., & Ali, M. R. (2023). A new approach for extending shelf-life of pomegranate arils with combined application of salicylic acid and methyl jasmonate. *Horticulturae*, 9(2), 225.
doi: [10.3390/horticulturae9020225](https://doi.org/10.3390/horticulturae9020225)

El-Gamal, N. G., Abd-El-Kareem, F., Fotouh, Y. O., & El-Mougy, S. (2007). Induction of systemic resistance in potato plants against late and early blight diseases using chemical inducers under greenhouse and field conditions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(2), 73-81.
Disponible en: <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/rjabs/rjabs/2007/73-81.pdf>

El-Shitany, N. A., El-Bastawissy, E. A., & El-Desoky, K. (2014). Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *International Immunopharmacology*, 19(2), 290-299.
doi: [10.1016/j.intimp.2014.02.004](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.004)

Elyatem, S. M., & Kader, A. A. (1984). Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. *Scientia Horticulturae*, 24(3-4), 287-298.

doi: [10.1016/0304-4238\(84\)90113-4](https://doi.org/10.1016/0304-4238(84)90113-4)

Ergun, M. (2012). Pomegranates. *Tropical and subtropical fruits: Postharvest physiology, processing and packaging*, 529-548.

doi: [10.1002/9781118324097.ch27](https://doi.org/10.1002/9781118324097.ch27)

~ F ~

Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M. H., & Bayat, M. (2005). Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Science and Technology International*, 11(2), 113-119.

doi: [10.1177/1082013205052765](https://doi.org/10.1177/1082013205052765)

Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., & Fernie, A. R. (2008). Highway or byway: The metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science*, 13(1), 14-19.

doi: [10.1016/j.tplants.2007.10.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.005)

Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Cruz-Castillo, J. G., & Walker, R. P. (2015). The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: Occurrence, metabolism and factors affecting their contents-A review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(2), 97-128.

doi: <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.01.004>

Fan, X. T., Blankenship, S. M., & Mattheis, J. P. (1999a). 1-methylcyclopropene inhibits apple ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6), 690-695.

doi: [10.21273/JASHS.124.6.690](https://doi.org/10.21273/JASHS.124.6.690)

Fan, X., Mattheis, J. P., & Blankenship, S. M. (1999b). Development of apple superficial scald, soft scald, core flush, and greasiness is reduced by MCP. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 3063-3068.

doi: [10.1021/jf981176b](https://doi.org/10.1021/jf981176b)

Fan, S., Li, Q., Feng, S., Lei, Q., Abbas, F., Yao, Y., Chen, W., Li, X., & Zhu, X. (2022a). Melatonin maintains fruit quality and reduces anthracnose in postharvest papaya via enhancement of antioxidants and inhibition of pathogen development. *Antioxidants*, 11(5), 804.

doi: [10.3390/antiox11050804](https://doi.org/10.3390/antiox11050804)

- Fan, S., Xiong, T., Lei, Q., Tan, Q., Cai, J., Song, Z., Yang, M., Chen, W., Li, X., & Zhu, X. (2022b). Melatonin treatment improves postharvest preservation and resistance of guava fruit (*Psidium guajava* L.). *Foods*, 11(3), 262.
doi: [10.3390/foods11030262](https://doi.org/10.3390/foods11030262)
- Fan, Z., Lin, B., Lin, H., Lin, M., Chen, J., & Lin, Y. (2022c). γ -Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and improves quality maintenance of cold-stored Chinese olive fruit. *Food Chemistry: X*, 13, 100208.
doi: [10.1016/j.fochx.2022.100208](https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100208)
- Faria, A., Calhau, C., De Freitas, V., & Mateus, N. (2006). Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2392-2397.
doi: [10.1021/jf0526487](https://doi.org/10.1021/jf0526487)
- Faria, A., & Calhau, C. (2011). The bioactivity of pomegranate: Impact on health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 626-634.
doi: [10.1080/10408391003748100](https://doi.org/10.1080/10408391003748100)
- Fawole, O. A., Opara, U. L., & Theron, K. (2012). Chemical and phytochemical properties and antioxidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2934-2940.
doi: [10.1007/s11947-011-0533-7](https://doi.org/10.1007/s11947-011-0533-7)
- Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2013a). Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review. *Scientia Horticulturae*, 159, 152-161.
doi: [10.1016/j.scienta.2013.05.016](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.016)
- Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2013b). Effects of storage temperature and duration on physiological responses of pomegranate fruit. *Industrial Crops and Products*, 47, 300-309.
doi: [10.1016/j.indcrop.2013.03.028](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.028)
- Feng, D., Gao, Q., Sun, X., Ning, S., Qi, N., Hua, Z., & Tang, J. (2023). Effects of foliage-applied exogenous γ -aminobutyric acid on seedling growth of two rice varieties under salt stress. *PLOS ONE*, 18(2), e0281846.
doi: [10.1371/journal.pone.0281846](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281846)
- Fenn, M. A., & Giovannoni, J. J. (2021). Phytohormones in fruit development and maturation. *The Plant Journal*, 105(2), 446-458.
doi: [10.1111/tpj.15112](https://doi.org/10.1111/tpj.15112)

Fernandes, L., Pereira, J. A., López-Cortés, I., Salazar, D., González-Álvarez, J., & Ramalhosa, E. (2017). Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *European Food Research and Technology*, 243, 1799-1814.

doi: [10.1007/s00217-017-2884-4](https://doi.org/10.1007/s00217-017-2884-4)

Financial Tribune. (2016). *First Iranian English economy daily: Pomegranate production estimated at over 1m tons*. Acceso, Mayo 2023.

Disponible en: <https://financiatribune.com>

Flores, G., & del Castillo, M. L. R. (2014). Influence of preharvest and postharvest methyl jasmonate treatments on flavonoid content and metabolomic enzymes in red raspberry. *Postharvest Biology and Technology*, 97, 77-82.

doi: [10.1016/j.postharvbio.2014.06.009](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.06.009)

Fonseca, S. C., Oliveira, F. A. R., & Brecht, J. K. (2002). Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: A review. *Journal of Food Engineering*, 52(2), 99-119.

doi: [10.1016/S0260-8774\(01\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00106-6)

Forde, B. G., & Lea, P. J. (2007). Glutamate in plants: Metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2339-2358.

doi: [10.1093/jxb/erm121](https://doi.org/10.1093/jxb/erm121)

Fray, R. G., & Grierson, D. (1993). Molecular genetics of tomato fruit ripening. *Trends in Genetics*, 9(12), 438-443.

doi: [10.1016/0168-9525\(93\)90108-t](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90108-t)

~ G ~

Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. *Journal of Pineal Research*, 51(1), 1-16.

doi: [10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x)

Gao, H., Zhang, Z. K., Chai, H. K., Cheng, N., Yang, Y., Wang, D. N., Yang, T., & Cao, W. (2016). Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 118, 103-110.

doi: [10.1016/j.postharvbio.2016.03.006](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.03.006)

- Gao, H., Lu, Z., Yang, Y., Wang, D., Yang, T., Cao, M., & Cao, W. (2018). Melatonin treatment reduces chilling injury in peach fruit through its regulation of membrane fatty acid contents and phenolic metabolism. *Food Chemistry*, 245, 659-666.
doi: [10.1016/j.foodchem.2017.10.008](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.008)
- Gapper, N. E., McQuinn, R. P., & Giovannoni, J. J. (2013). Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 82, 575-591.
doi: [10.1007/s11103-013-0050-3](https://doi.org/10.1007/s11103-013-0050-3)
- García-Pastor, M. E., Serrano, M., Guillen, 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 color and phenolics content in pomegranate. *Postharvest Biology and Technology*, 167, 111226.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2020.111226](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111226)
- García-Pastor, M. E., Zapata, P. J., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valero, D., & Serrano, M. (2020b). The effects of salicylic acid and its derivatives on increasing pomegranate fruit quality and bioactive compounds at harvest and during storage. *Frontiers in Plant Science*, 11, 668.
doi: [10.3389/fpls.2020.00668](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00668)
- Ge, Y., Tang, Q., Li, C., Duan, B., Li, X., Wei, M., & Li, J. (2019). Acibenzolar-S-methyl treatment enhances antioxidant ability and phenylpropanoid pathway of blueberries during low-temperature storage. *LWT - Food Science and Technology*, 110, 48-53.
doi: [10.1016/j.lwt.2019.04.069](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.069)
- Ghasemnezhad, M., & Javaherdashti, M. (2008). Effect of methyl jasmonate treatment on antioxidant capacity, internal quality, and postharvest life of raspberry fruit. *Caspian Journal of Environmental Sciences (CJES)*, 6(1), 73-78.
Disponibile en: <https://sid.ir/paper/550870/en>
- Gil, M. I., García-Viguera, C., Artés, F., & Tomás-Barberán, F. A. (1995). Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68(1), 77-81.
doi: [10.1002/jsfa.2740680113](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740680113)
- Gil, M. I., Sánchez, R., Marín, J. G., & Artés, F. (1996). Quality changes in pomegranates during ripening and cold storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202, 481-485.
doi: [10.1007/BF01197269](https://doi.org/10.1007/BF01197269)

- 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.
doi: [10.1021/jf000404a](https://doi.org/10.1021/jf000404a)
- Giménez, M. J., Valverde, J. M., Valero, D., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Serrano, M., Moral, J., & Castillo, S. (2015). Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees improve fruit quality at harvest and during storage. *Scientia Horticulturae*, 197, 665-673.
doi: [10.1016/j.scienta.2015.10.033](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.033)
- Gioia, C., Giacobazzi, G., Vannini, M., Totaro, G., Sisti, L., Colonna, M., Marchese, P., & Celli, A. (2021). End of life of biodegradable plastics: Composting versus re/upcycling. *ChemSusChem*, 14(19), 4167-4175.
doi: [/10.1002/cssc.202101226](https://doi.org/10.1002/cssc.202101226)
- Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 52, 725-749.
doi: [10.1146/annurev.arplant.52.1.725](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.725)
- Giovannoni, J., Nguyen, C., Ampofo, B., Zhong, S., & Fei, Z. (2017). The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 61-84.
doi: [10.1146/annurev-arplant-042916-040906](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040906)
- González-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3933-3939.
doi: [10.1021/jf100315d](https://doi.org/10.1021/jf100315d)
- González-Villagra, J., Bravo, L. A., Reyes-Díaz, M., Cohen, J. D., Ribera-Fonseca, A., López-Olivari, R., Jorquera-Fontena, E., & Tighe-Neira, R. (2023). Pre-harvest salicylic acid application affects fruit quality and yield under deficit irrigation in *Aristotelia chilensis* (Mol.) plants. *Plants*, 12(18), 3279.
doi: [10.3390/plants12183279](https://doi.org/10.3390/plants12183279)
- González-Villagra, J., Chichahual, C., Jorquera-Fontena, E., Falchetto-Gomes, P., Nunes-Nesi, A., & Reyes-Díaz, M. (2024). Salicylic acid improves yield, fruit quality, and post-harvest storage in sweet cherry (*Prunus avium* L.) cv. Lapins subjected to late-deficit irrigation. *Horticulturae*, 10(7), 707.
doi: [10.3390/horticulturae10070707](https://doi.org/10.3390/horticulturae10070707)

Gozzo, F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: From nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4487-4503.
doi: [10.1021/jf030025s](https://doi.org/10.1021/jf030025s)

Guo, Z., Gong, J., Luo, S., Zuo, Y., & Shen, Y. (2023). Role of gamma-aminobutyric acid in plant defense response. *Metabolites*, 13(6), 741.
doi: [10.3390/metabo13060741](https://doi.org/10.3390/metabo13060741)

~ H ~

Habibi, F., Ramezani, A., Guillén, F., Serrano, M., & Valero, D. (2020). Blood oranges maintain bioactive compounds and nutritional quality by postharvest treatments with γ -aminobutyric acid, methyl jasmonate, or methyl salicylate during cold storage. *Food Chemistry*, 306, 125634.
doi: [10.1016/j.foodchem.2019.125634](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125634)

Habibi, F., Valero, D., Serrano, M., & Guillén, F. (2022). Exogenous application of glycine betaine maintains bioactive compounds, antioxidant activity, and physicochemical attributes of blood orange fruit during prolonged cold storage. *Frontiers in Nutrition*, 9, 873915.
doi: [10.3389/fnut.2022.873915](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.873915)

Hao, Q., Wang, W., Han, X., Wu, J., Lyu, B., Chen, F., et al. (2018). Isochorismate-based salicylic acid biosynthesis confers basal resistance to *Fusarium graminearum* in barley. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 1995-2010.
doi: [10.1111/mpp.12675](https://doi.org/10.1111/mpp.12675)

Hasnaoui, N., Mars, M., Ghaffari, S., Trifi, M., Melgarejo, P., & Hernandez, F. (2011). Seed and juice characterization of pomegranate fruits grown in Tunisia: Comparison between sour and sweet cultivars revealed interesting properties for prospective industrial applications. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 374-381.
doi: [10.1016/j.indcrop.2010.11.006](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.006)

Hattori, A., Migitaka, H., Iigo, M., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T., & Reiter, R. J. (1995). Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemical and Molecular Biology International*, 35(3), 627-634.
Disponibile en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7773197/>

- Heber, D., Schulman, R.N., & Seeram, N.P. (2006). *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine* (1st ed.). CRC Press.
doi: [10.1201/9781420009866](https://doi.org/10.1201/9781420009866)
- Hernández, F., Melgarejo, P., Tomás-Barberán, F. A., & Artés, F. (1999). Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology*, 210, 39-42.
doi: [10.1007/s002170050529](https://doi.org/10.1007/s002170050529)
- Hijaz, F., Nehela, Y., & Killiny, N. (2018). Application of gamma-aminobutyric acid increased the level of phytohormones in *Citrus sinensis*. *Planta*, 248, 909-918.
doi: [10.1007/s00425-018-2947-1](https://doi.org/10.1007/s00425-018-2947-1)
- Holcroft, D. M., Gil, M. I., & Kader, A. A. (1998). Effect of carbon dioxide on anthocyanins, phenylalanine ammonia lyase, and glucosyltransferase in the arils of stored pomegranates. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(1), 136-140.
doi: [10.21273/JASHS.123.1.136](https://doi.org/10.21273/JASHS.123.1.136)
- Holcroft, D., & Kader, A. (1999). Carbon dioxide-induced changes in color and anthocyanin synthesis of stored strawberry fruit. *HortScience*, 34(7), 1244-1248.
doi: [10.21273/HORTSCI.34.7.1244](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.34.7.1244)
- Hong, M. Y., Seeram, N. P., & Heber, D. (2008). Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(12), 848-855.
doi: [10.1016/j.jnutbio.2007.11.006](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.006)
- Houston, D. M. J., Bugert, J. J., Denyer, S. P., & Heard, C. M. (2017). Potentiated virucidal activity of pomegranate rind extract (PRE) and punicalagin against Herpes simplex virus (HSV) when coadministered with zinc (II) ions, and antiviral activity of PRE against HSV and aciclovir-resistant HSV. *PLoS ONE*, 12(6), e0179291.
doi: [10.1371/journal.pone.0179291](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179291)
- Hu, Y., Ma, Y., Wu, S., Chen, T., He, Y., Sun, J., Jiao, R., Jiang, X., Huang, Y., Deng, L., & Bai, W. (2016). Protective effect of cyanidin-3-O-glucoside against ultraviolet B radiation-induced cell damage in human HaCaT keratinocytes. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 301.
doi: [10.3389/fphar.2016.00301](https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00301)

Hu, W., Yang, H., Tie, W., Yan, Y., Ding, Z., Liu, Y., Wu, C., Wang, J., Reiter, R. J., Tan, D. X., Shi, H., Xu, B., & Jin, Z. (2017). Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(46), 9987-9994.

doi: [10.1021/acs.jafc.7b03354](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03354)

Huang, X. Y., Wang, C. K., Zhao, Y. W., Sun, C. H., & Hu, D. G. (2021). Mechanisms and regulation of organic acid accumulation in plant vacuoles. *Horticulture Research*, 8, 227.

doi: [10.1038/s41438-021-00702-z](https://doi.org/10.1038/s41438-021-00702-z)

Hummer, K. E., Pomper, K. W., Postman, J., Graham, C. J., Stover, E., Mercure, E. W., Aradhya, M., Crisosto, C. H., Ferguson, L., Thompson, M. M., Byers, P., & Zee, F. (2011). Emerging fruit crops. In M. L. Badenes & D. H. Byrne (Eds.), *Fruit Breeding* (pp. 97-147).

doi: [10.1007/978-1-4419-0763-9_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_4)

I

International Trade Centre (ITC). (2020). *Trade statistics for international business development*. Acceso, Mayo 2023.

Disponible en: <https://www.trademap.org/Index.aspx>

Iqbal, B., Hussain, F., Khan, M. S., Iqbal, T., Shah, W., Ali, B., Al Syaad, K. M., & Ercisli, S. (2023). Physiology of gamma-aminobutyric acid treated *Capsicum annuum* L. (Sweet pepper) under induced drought stress. *PLOS ONE*, 18(8), e0289900.

doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289900>

J

Jacob, J., Rajiv, P., Gopalan, R., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2019). An overview of phytochemical and pharmacological potentials of *Punica granatum* L. *Pharmacognosy Journal*, 11(5), 1167-1171.

doi: [10.5530/pj.2019.11.181](https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.181)

Jafarzadeh, S., Mohammadi Nafchi, A., Salehabadi, A., Oladzad-abbasabadi, N., & Jafari, S. M. (2021). Application of bio-nanocomposite films and edible coatings for extending the shelf life of fresh fruits and vegetables. *Advances in Colloid and Interface Science*, 291, 102405.

doi: [10.1016/j.cis.2021.102405](https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102405)

- Jayarajan, S., & Sharma, R. R. (2021). Melatonin: A blooming biomolecule for postharvest management of perishable fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 318-328.
doi: [10.1016/j.tifs.2021.07.034](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.034)
- Jiang, Y., Joyce, D. C., & Terry, L. A. (2001). 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. *Postharvest Biology and Technology*, 23(3), 227-232.
doi: [10.1016/S0925-5214\(01\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00123-5)
- Jiang, Y., Duan, X., Joyce, D., Zhang, Z., & Li, J. (2004). Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chemistry*, 88(3), 443-446.
doi: [10.1016/j.foodchem.2004.02.004](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.004)
- Jiménez, O. R., Bornemann, A. C., Medina, Y. E., Romero, K., & Bravo, J. R. (2023). Prospects of biological inputs as a measure for reducing crop losses caused by climate change effects. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100689.
doi: [10.1016/j.jafr.2023.100689](https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100689)
- Jurenka, J. S. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Alternative Medicine Review*, 13(2), 128-144.
Disponibile en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18590349/>

~ K ~

- Kader, A. A., Chordas, A., & Elyatem, S. M. (1984). Responses of pomegranates to ethylene treatment and storage temperature. *California Agriculture*, 38(7), 14-15.
Disponibile en: <https://hilgardia.ucanr.edu/fileaccess.cfm?article=172201&p=KZIINR>
- Kahramanoglu, I. (2019). Trends in pomegranate sector: Production, postharvest handling and marketing. *International Journal of Agriculture, Forestry and Life Sciences*, 3(2), 239-246.
Disponibile en: <https://es.scribd.com/document/495164796/Trends-in-pomegranate-sector-production-postharvest-handling-and-marketing-569461-848133>
- Kawhena, T. G., Opara, U. L., & Fawole, O. A. (2021). Optimization of gum Arabic and starch-based edible coatings with lemongrass oil using response surface methodology for improving postharvest quality of whole “Wonderful” pomegranate fruit. *Coatings*, 11(4), 442.
doi: [10.3390/coatings11040442](https://doi.org/10.3390/coatings11040442)

- Kennedy, D. O., & Wightman, E. L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2(1), 32-50.
doi: [10.3945/an.110.000117](https://doi.org/10.3945/an.110.000117)
- Kerch, G. (2015). Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2, Part A), 159-166.
doi: [10.1016/j.tifs.2015.10.010](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.010)
- Khademi, O., Hosseini Molla, S. M., Talei, D., & Sepahvand, E. (2017). The effects of ethylene and 1-MCP on storability of pomegranate fruit cv. 'Malase Yosef Khani'. *Plant Production*, 40(2), 25-36.
doi: [10.22055/ppd.2017.13114](https://doi.org/10.22055/ppd.2017.13114)
- Khalid, M. Y., & Arif, Z. U. (2022). Novel biopolymer-based sustainable composites for food packaging applications: A narrative review. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 100892.
doi: [10.1016/j.fpsl.2022.100892](https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100892)
- Khan, M., Hussain, A., Yun, B.-W., & Mun, B.-G. (2024). Melatonin: The multifaceted molecule in plant growth and defense. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6799.
doi: [10.3390/ijms25126799](https://doi.org/10.3390/ijms25126799)
- Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., & Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6509-6515.
doi: [10.1021/jf0343074](https://doi.org/10.1021/jf0343074)
- Kinnersley, A. M., & Turano, F. (2000). Gamma Aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479-509.
doi: [10.1080/07352680091139277](https://doi.org/10.1080/07352680091139277)
- Kołodziejczyk, I., & Posmyk, M. M. (2016). Melatonin-A new plant biostimulator? *Journal of Elementology*, 21(4), 1187-1198.
doi: [10.5601/jelem.2015.20.3.1012](https://doi.org/10.5601/jelem.2015.20.3.1012)
- Korkmaz, N., Güçlü, S. F., Polat, M., Okatan, V., Colak, A. M., Varol, Ü., & Atilla, M. (2019). Effects of melatonin applications on yield and some fruit quality characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Acta Horticulturae*, 1254, 173-178.
doi: [10.17660/ActaHortic.2019.1254.26](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1254.26)

Körge, K., Bajić, M., Likožar, B., & Novak, U. (2020). Active chitosan–chestnut extract films used for packaging and storage of fresh pasta. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(8), 3043-3052.

doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14569>

Kou, X., Feng, Y., Yuan, S., Zhao, X., Wu, C., Wang, C., et al. (2021). Different regulatory mechanisms of plant hormones in the ripening of climacteric and non-climacteric fruits: A review. *Plant Molecular Biology*, 107, 477-497.

doi: [10.1007/s11103-021-01199-9](https://doi.org/10.1007/s11103-021-01199-9)

Kulkarni, A. P., & Aradhya, S. M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93(2), 319-324.

doi: [10.1016/j.foodchem.2004.09.029](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.029)

~ L ~

Laribi, A. I., Palou, L., Intrigliolo, D. S., Nortes, P. A., Rojas-Argudo, C., Taberner, V., Bartual, J., & Pérez-Gago, M. B. (2013). Effect of sustained and regulated deficit irrigation on fruit quality of pomegranate cv. 'Mollar de Elche' at harvest and during cold storage. *Agricultural Water Management*, 125, 61-70.

doi: [10.1016/j.agwat.2013.04.009](https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.04.009)

Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2006). The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(9), 611-625.

doi: [10.1016/j.jnutbio.2005.09.004](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.09.004)

Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic acid biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 338.

doi: [10.3389/fpls.2020.00338](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338)

Legua, P., Melgarejo, P., Martinez, M., & Hernandez, F. (2000). Evolution of sugars and organic acid content in three pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.). *Options Méditerranéennes*, 42, 99-104.

Disponible en: <http://om.ciheam.org/om/pdf/a42/00600258.pdf>

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260.

doi: [10.1016/j.foodchem.2005.02.033](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033)

- Li, J., Lin, X., Chen, A., Peterson, T., Ma, K., Bertzky, M., Ciais, P., Kapos, V., Peng, C., & Poulter, B. (2013). Global priority conservation areas in the face of 21st-century climate change. *PLoS ONE*, 8(1), 54839.
doi: [10.1371/journal.pone.0054839](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054839)
- Li, X., Wasila, H., Liu, L., Yuan, T., Gao, Z., Zhao, B., & Ahmad, I. (2015). Physicochemical characteristics, polyphenol compositions, and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food Chemistry*, 175, 575-584.
doi: [10.1016/j.foodchem.2014.12.003](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.003)
- Li, L., Lichter, A., Chalupowicz, D., Gamrasni, D., Goldberg, T., Nerya, O., Ben-Arie, R., & Porat, R. (2016). Effects of the ethylene-action inhibitor 1-methylcyclopropene on postharvest quality of non-climacteric fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 322-329.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2015.09.031](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.031)
- Li, Y., Fan, Y., Ma, Y., Zhang, Z., Yue, H., Wang, L., Li, J., & Jiao, Y. (2017). Effects of exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) on photosynthesis and antioxidant system in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under low light stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 436-449.
doi: [10.1007/s00344-016-9652-8](https://doi.org/10.1007/s00344-016-9652-8)
- Li, X., Li, M., Wang, L., Wang, J., Jin, P., & Zheng, Y. (2018). Methyl jasmonate primes defense responses against wounding stress and enhances phenolic accumulation in fresh-cut pitaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 145, 101-107.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2018.07.001](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.07.001)
- Li, S., Chen, K., & Grierson, D. (2021a). Molecular and hormonal mechanisms regulating fleshy fruit ripening. *Cells*, 10(5), 1136.
doi: [10.3390/cells10051136](https://doi.org/10.3390/cells10051136)
- Li, L., Dou, N., Zhang, H., & Wu, C. (2021b). The versatile GABA in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 16(3), 1862565.
doi: [10.1080/15592324.2020.1862565](https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565)
- Li, S., Cheng, Y., Yan, R., Liu, Y., Huan, C., & Zheng, X. (2022). Preharvest spray with melatonin improves postharvest disease resistance in cherry tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 193, 112055.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2022.112055](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112055)

- Liu, C., Zheng, H., Sheng, K., Liu, W., & Zheng, L. (2018). Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 47-55.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2018.01.016](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.016)
- Liu, J., Yang, J., Zhang, H., Cong, L., Zhai, R., Yang, C., Wang, Z., Ma, F., & Xu, L. (2019). Melatonin inhibits ethylene synthesis via nitric oxide regulation to delay postharvest senescence in pears. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(8), 2279-2288.
doi: [10.1021/acs.jafc.8b06580](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06580)
- Liu, S., Huang, H., Huber, D. J., Pan, Y., Shi, X., & Zhang, Z. (2020). Delay of ripening and softening in 'Guifei' mango fruit by postharvest application of melatonin. *Postharvest Biology and Technology*, 163, 111136.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2020.111136](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111136)
- 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.
doi: [10.1016/j.fbio.2023.102400](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102400)
- Lu, J., Ding, K., & Yuan, Q. (2008). Determination of punicalagin isomers in pomegranate husk. *Chromatographia*, 68, 303-306.
doi: [10.1365/s10337-008-0699-y](https://doi.org/10.1365/s10337-008-0699-y)
- Lufu, R., Berry, T. M., Ambaw, A., & Opara, U. L. (2018). The influence of liner packaging on weight loss and decay of pomegranate fruit. *Acta Horticulturae*, 1201, 259-263.
doi: [10.17660/ActaHortic.2018.1201.35](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1201.35)
- Lufu, R., Ambaw, A., Berry, T. M., & Opara, U. L. (2020a). Evaluation of the airflow characteristics, cooling kinetics and quality keeping performances of various internal plastic liners in pomegranate fruit packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100585.
doi: [10.1016/j.fpsl.2020.100585](https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100585)
- Lufu, R., Ambaw, A., & Opara, U. L. (2020b). Water loss of fresh fruit: Influencing pre-harvest, harvest, and postharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 272, 109519.
doi: [10.1016/j.scienta.2020.109519](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109519)
- Lufu, R., Ambaw, A., & Opara, U. L. (2023). Determination of moisture loss of pomegranate cultivars under cold and shelf storage conditions and control strategies. *Sustainable Food Technology*, 1, 79-91.
doi: [10.1039/D2FB00017B](https://doi.org/10.1039/D2FB00017B)

Luo, J., Si, H., Jia, Z., & Liu, D. (2021). Dietary anti-aging polyphenols and potential mechanisms. *Antioxidants*, 10(2), 283.

doi: [10.3390/antiox10020283](https://doi.org/10.3390/antiox10020283)

Lv, J. Y., Zhang, M. Y., Zhang, J. H., Ge, Y. H., Li, C. Y., Meng, K., & Li, J. R. (2018). Effects of methyl jasmonate on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and signaling pathway during postharvest ripening of apple fruit. *Scientia Horticulturae*, 229, 157-166.

doi: [10.1016/j.scienta.2017.11.007](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.007)

~ M ~

Madebo, M. P., Zheng, Y., & Jin, P. (2022). Melatonin-mediated postharvest quality and antioxidant properties of fresh fruits: A comprehensive meta-analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(4), 3205-3226.

doi: [10.1111/1541-4337.12961](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12961)

Maftoonazad, N., & Ramaswamy, H. S. (2005). Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 617-624.

doi: [10.1016/j.lwt.2004.08.007](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.007)

Maghoubi, M., Amodio, M. L., Fatchurrahman, D., Cisneros-Zevallos, L., & Colelli, G. (2022). Pomegranate husk scald browning during storage: A review on factors involved, their modes of action, and its association to postharvest treatments. *Foods*, 11(21), 3665.

doi: [10.3390/foods11213365](https://doi.org/10.3390/foods11213365)

Maghoubi, 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.

doi: [10.3390/foods12071462](https://doi.org/10.3390/foods12071462)

Mahajan, P. V., Oliveira, F. A. R., & Macedo, I. (2008). Effect of temperature and humidity on the transpiration rate of the whole mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 281-288.

doi: [10.1016/j.jfoodeng.2007.05.021](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.021)

Mannino, G., Pernici, C., Serio, G., Gentile, C., & Berteà, C. M. (2021). Melatonin and phyto-melatonin: Chemistry, biosynthesis, metabolism, distribution, and bioactivity in plants and animals-An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9996.

doi: [10.3390/ijms22189996](https://doi.org/10.3390/ijms22189996)

- Martínez, J. J., Melgarejo, P., Hernández, F. A., Salazar, D. M., & Martínez, R. (2006). Seed characterization of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 241-246.
doi: [10.1016/j.scienta.2006.07.018](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.018)
- Mataix Verdú, J., García Diz, M., Mañas Almendros, M., Martínez de Victoria, E., & Llopis González, J. (2009). Tabla de composición de alimentos (5ª ed.). Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada, Granada.
Disponibile en: <https://www.sennutricion.org/es/2013/05/11/tablas-de-composicin-de-alimentos-mataix-et-al>
- Matityahu, I., Glazer, I., Holland, D., Bar-Ya'akov, I., Ben-Arie, R., & Amir, R. (2014). Total antioxidative capacity and total phenolic levels in pomegranate husks correlate to several postharvest fruit quality parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1938-1949.
doi: [10.1007/s11947-013-1184-7](https://doi.org/10.1007/s11947-013-1184-7)
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., & Silva, P. (2020). Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules*, 25(17), 3809.
doi: [10.3390/molecules25173809](https://doi.org/10.3390/molecules25173809)
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., & Holub, B. J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7731-7737.
doi: [10.1021/jf020690l](https://doi.org/10.1021/jf020690l)
- Medina-Santamarina, J., Zapata, P. J., Valverde, J. M., Valero, D., Serrano, M., & Guillén, F. (2021). Melatonin treatment of apricot trees leads to maintenance of fruit quality attributes during storage at chilling and non-chilling temperatures. *Agronomy*, 11(5), 917.
doi: [10.3390/agronomy11050917](https://doi.org/10.3390/agronomy11050917)
- Meerts, I. A. T. M., Verspeek-Rip, C. M., Buskens, C. A. F., Keizer, H. G., Bassaganya-Riera, J., Jouni, Z. E., Van Huygevoort, A. H. B. M., Van Otterdijk, F. M., & Van De Waart, E. J. (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1085-1092.
doi: [10.1016/j.fct.2009.01.031](https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.031)
- Meighani, H., Ghasemnezhad, M., & Bakhshi, D. (2015). Effect of different coatings on post-harvest quality and bioactive compounds of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 4507-4514.
doi: [10.1007/s13197-014-1484-6](https://doi.org/10.1007/s13197-014-1484-6)

- Mekontso, F. N., Duan, W., Cisse, E. H. M., Chen, T., & Xu, X. (2021). Alleviation of postharvest chilling injury of carambola fruit by γ -aminobutyric acid: Physiological, biochemical, and structural characterization. *Frontiers in Nutrition*, 8, 752583.
doi: [10.3389/fnut.2021.752583](https://doi.org/10.3389/fnut.2021.752583)
- Melgarejo, P., Salazar, D., & Artés, F. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research and Technology*, 211, 185-190.
doi: [10.1007/s002170050021](https://doi.org/10.1007/s002170050021)
- Melgarejo Moreno, P., & Salazar Hernández, D. M. (2003). Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas: Algarrobo, granado y jinjolero (Vol. II). AMV Ediciones y Mundi-Prensa.
Disponible en: <https://dspace.umh.es/bitstream/11000/5410/1/>
- Melgarejo Moreno, P., Hernández García, F., & Legua Murcia, P. (2010). El granado. *Jornadas Nacionales sobre el Granado: Producción, Economía, Industrialización, Alimentación y Salud*, 8-37.
Disponible en: <https://issuu.com/agrihorti/docs/>
- Melgarejo, P., Núñez-Gómez, D., Melgarejo-Sánchez, P., Martínez-Nicolás, J. J., & Legua, P. (2022). Pomegranate definitions and research methodologies: Importance of using correct and unified terminology. *Acta Horticulturae*, 1349, 12.
doi: [10.17660/ActaHortic.2022.1349.12](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2022.1349.12)
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., & Martí, N. (2011). Phytochemical characterization for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1893-1906.
doi: [10.1002/jsfa.4411](https://doi.org/10.1002/jsfa.4411)
- Mena, P., Gironés-Vilaplana, A., Martí, N., & García-Viguera, C. (2012). Pomegranate varietal wines: Phytochemical composition and quality parameters. *Food Chemistry*, 133(1), 108-115.
doi: [10.1016/j.foodchem.2011.12.079](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.079)
- Meng, J. F., Xu, T. F., Song, C. Z., Yu, Y., Hu, F., Zhang, L., Zhang, Z. W., & Xi, Z. M. (2015). Melatonin treatment of pre-veraison grape berries to increase size and synchronicity of berries and modify wine aroma components. *Food Chemistry*, 185, 127-134.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.140>

- Microsoft. (2024). *Bing Image Creator* (Herramienta de generación de imágenes).
Disponible en: <https://www.bing.com/create>
- Miguel, G., Fontes, C., Antunes, M. D. C., Neves, A., & Martins, D. (2004). Anthocyanin concentration of “Assaria” pomegranate fruits during different cold storage conditions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 338-342.
doi: [10.1155/S1110724304403076](https://doi.org/10.1155/S1110724304403076)
- Min, D., Li, Z., Ai, W., Li, J., Zhou, J., Zhang, X., Mu, D., Li, F., Li, X., & Guo, Y. (2020). The co-regulation of ethylene biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle by methyl jasmonate contributes to aroma formation of tomato fruit during postharvest ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(39), 10822-10832.
doi: [10.1021/acs.jafc.0c04519](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04519)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (2019). *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Acceso, Mayo 2023.
Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/>
- Ministry of Agriculture, Irrigation and Livestock (MAIL). (2019). *Ministry of Agriculture, Irrigation and Livestock*. Acceso, Mayo 2023.
Disponible en: <https://www.mail.gov.af/en>
- Miranda, S., Vilches, P., Suazo, M., Pávez, L., García, K., Méndez, M. A., González, M., Meisel, L.-A., Defilippi, B. G., & del Pozo, T. (2020). Melatonin triggers metabolic and gene expression changes leading to improved quality traits of two sweet cherry cultivars during cold storage. *Food Chemistry*, 319, 126360.
doi: [10.1016/j.foodchem.2020.126360](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126360)
- Mirdehghan, S. H., Rahemi, M., Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., & Valero, D. (2006). Prestorage heat treatment to maintain nutritive and functional properties during postharvest cold storage of pomegranate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8495-8500.
doi: [10.1021/jf0615146](https://doi.org/10.1021/jf0615146)
- Mirdehghan, S. H., & Rahemi, M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111(2), 120-127.
doi: [10.1016/j.scienta.2006.10.001](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.001)
- Mirdehghan, S. H., Rahemi, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Zapata, P. J., Serrano, M., & Valero, D. (2019). Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: Role of polyamines. *Postharvest Biology and Technology*, 44(1), 19-25.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2006.11.001](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.001)

- Mishra, V., Kaplan, Y., & Ginzberg, I. (2022). Mitigating chilling injury of pomegranate fruit skin. *Scientia Horticulturae*, 304, 111329.
doi: [10.1016/j.scienta.2022.111329](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111329)
- Mitra, A., Selvam, S. P., Shehabudheen, S., Anitha, P. M., & Kumar, M. M. (2020). Efficiency evaluation of cinnamon essential oil loaded nanoliposomal coating for the post-harvest management of apple (*Malus domestica*). *International Journal of Emerging Technology*, 11(3), 554-559.
Disponibile en: <https://www.researchtrend.net/ijet/pdf/>
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 443-462.
doi: [10.1146/annurev-arplant-042809-112116](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112116)
- Mittler, R., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 118-125.
doi: [10.1016/j.tibs.2011.11.007](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007)
- Moing, A., Renaud, C., Raymond, P., & Roudeillac, P. (2001). Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(4), 394.
doi: [10.21273/JASHS.126.4.394](https://doi.org/10.21273/JASHS.126.4.394)
- Mollaei, M. A. S., & Rastegar, S. (2024). Preharvest melatonin and postharvest xanthan gum coating maintain the quality of Orlando tangelos during storage. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 20(3), 49-64.
doi: <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.87553.1324>
- Moreno-Escamilla, J. O., Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., Núñez-Gastélum, J. A., González-Aguilar, G. A., & Rodrigo-García, J. (2017). Effect of different elicitors and preharvest day application on the content of phytochemicals and antioxidant activity of butterhead lettuce (*Lactuca sativa var. capitata*) produced under hydroponic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(26), 5244-5254.
doi: [10.1021/acs.jafc.7b01702](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01702)
- Moreno-Escamilla, J. O., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Núñez-Gastélum, J. A., González-Aguilar, G. A., & Rodrigo-García, J. (2018). Chapter 3 - Effect of elicitors in the nutritional and sensorial quality of fruits and vegetables. En *Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality*, 71-91.
doi: [10.1016/B978-0-12-809807-3.00003-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809807-3.00003-2)

- Motelica, L., Fikai, D., Fikai, A., Oprea, O. C., Kaya, D. A., & Andronescu, E. (2020). Biodegradable antimicrobial food packaging: Trends and perspectives. *Foods*, 9(10), 1438.
doi: [10.3390/foods9101438](https://doi.org/10.3390/foods9101438)
- Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., & Khodaparast, M. H. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*, 115(4), 1274-1278.
doi: [10.1016/j.foodchem.2009.01.044](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.044)
- Mphahlele, R. R., Stander, M. A., Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2014). Effect of fruit maturity and growing location on the postharvest contents of flavonoids, phenolic acids, vitamin C, and antioxidant activity of pomegranate juice (cv. Wonderful). *Scientia Horticulturae*, 179, 36-45.
doi: [10.1016/j.scienta.2014.09.007](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.007)
- Mubarok, S., Okabe, Y., Fukuda, N., Ariizumi, T., & Ezura, H. (2016). Favorable effects of the weak ethylene receptor mutation *Sletr1-2* on postharvest fruit quality changes in tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 120, 1-9.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2016.04.022](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.022)
- Mubarok, S., Ezura, H., Qonit, M. A. H., Prayudha, E., Anas, Suwali, N., Kusumiya, & Kurnia, D. (2019a). Alteration of nutritional and antioxidant level of ethylene receptor tomato mutants, *Sletr1-1* and *Sletr1-2*. *Scientia Horticulturae*, 256, 108546.
doi: [10.1016/j.scienta.2019.108546](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108546)
- Mubarok, S., Dahlania, S., & Suwali, N. (2019b). Dataset on the change of postharvest quality of *Physalis peruviana L.* as an effect of ethylene inhibitor. *Data in Brief*, 24, 103849.
doi: [10.1016/j.dib.2019.103849](https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103849)
- Mubarok, S., Ezura, H., Anas, Kusumiya, R., Rosni, N., Suminar, E., & Wiguna, G. (2019c). Impacts of *Sletr1-1* and *Sletr1-2* mutations on the hybrid seed quality of tomatoes. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(5), 1170-1176.
doi: [10.1016/S2095-3119\(19\)62614-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62614-6)
- Mubarok, S., Rahman, I. M., Kamaluddin, N. N., & Solihin, E. (2022). Impact of 1-methylcyclopropene combined with chitosan on postharvest quality of tropical banana 'Lady Finger'. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 1171-1185.
doi: [10.1080/10942912.2022.2074028](https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2074028)

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.

doi: [10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911)

~ N ~

Nanda, S. D. V. 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.

doi: [10.1016/S0925-5214\(00\)00181-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00181-2)

Nasiri, S., Rezaei, M., & Mojerlou, S. (2024). Impacts of preharvest treatment with salicylic acid and melatonin in suppressing gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.) in bell pepper. *Journal of Crop Health*, 76, 981-994.

doi: [10.1007/s10343-024-01007-6](https://doi.org/10.1007/s10343-024-01007-6)

National Horticultural Board (NHB). (2020). *Area production statistics of horticulture crops*. Ministry of Agriculture and Farmers Welfare, India. Acceso, Mayo 2023.

Disponible en: <https://www.nhb.gov.in>

Nazoori, F., Zamanibahramabadi, E., Mirdehghan, S. H., & Rafie, A. (2020). Extending the shelf life of pomegranate (*Punica granatum* L.) by GABA coating application. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2760-2772.

doi: [10.1007/s11694-020-00521-1](https://doi.org/10.1007/s11694-020-00521-1)

Ncube, L. K., Ude, A. U., Ogunmuyiwa, E. N., Zulkifli, R., & Beas, I. N. (2020). Environmental impact of food packaging materials: A review of contemporary development from conventional plastics to polylactic acid-based materials. *Materials*, 13(21), 4994.

doi: [10.3390/ma13214994](https://doi.org/10.3390/ma13214994)

Nguyen, M. P. (2020). Synergistic effect of calcium chloride and chitosan treatment on physicochemical characteristics of pineapple (*Ananas comosus*) fruit during cool storage. *International Journal of Lifescience and Pharma Research*, 10(3), 24-28.

doi: [10.22376/ijpbs/lpr.2020.10.3.L24-28](https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2020.10.3.L24-28)

Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, A., Carbonell-Barrachina, A., & Hernández, F. (2014). Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity, and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar, and ripening stage. *Scientia Horticulturae*, 165, 181-189.

doi: [10.1016/j.scienta.2013.11.021](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.021)

Nunes, C. N., & Emond, J. P. (2007). Relationship between weight loss and visual quality of fruits and vegetables. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 120, 235-245.

doi: <https://www.researchgate.net/publication/276848674>

~ O ~

Onik, J. C., Wai, S. C., Li, A., Lin, Q., Sun, Q., Wang, Z., & Duan, Y. (2021). Melatonin treatment reduces ethylene production and maintains fruit quality in apple during postharvest storage. *Food Chemistry*, 337, 127753.

doi: [10.1016/j.foodchem.2020.127753](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127753)

Opara, L. U., Al-Ani, M. R., & Al-Shuaibi, Y. S. (2009). Physico-chemical properties, vitamin C content, and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). *Food and Bioprocess Technology*, 2, 315-321.

doi: [10.1007/s11947-008-0095-5](https://doi.org/10.1007/s11947-008-0095-5)

OpenAI. (2024). *ChatGPT* (versión GPT-4) [Modelo de IA].

Disponible en: <https://openai.com/chatgpt>

Öz, A. T., Hiçyılmaz, Ş., & Yarşi, T. (2017). Effects of the alternative postharvest treatments on 'Hicaznar' pomegranate fruit phytochemicals, organic acids, and sugar content. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), 445-449.

Disponible en: <https://archives.ijper.org/sites/default/files/10.5530ijper.51.3s.65.pdf>

Ozgen, M., Durgaç, C., Serçe, S., & Kaya, C. (2008). Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chemistry*, 111(3), 703-706.

doi: [10.1016/j.foodchem.2008.04.043](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.043)

~ P ~

Paladines-Quezada, D. F., Moreno-Olivares, J. D., Fernández-Fernández, J. I., Bleda-Sánchez, J. A., Martínez-Moreno, A., & Gil-Muñoz, R. (2019). Elicitors and pre-fermentative cold maceration: Effects on polyphenol concentration in Monastrell grapes and wines. *Biomolecules*, 9(11), 671.

doi: [10.3390/biom9110671](https://doi.org/10.3390/biom9110671)

Pan, L., Zhao, X., Chen, M., Fu, Y., Xiang, M., & Chen, J. (2020). Effect of exogenous methyl jasmonate treatment on disease resistance of postharvest kiwifruit. *Food Chemistry*, 305, 125483.

doi: [10.1016/j.foodchem.2019.125483](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125483)

- Pan, L., Chen, X., Xu, W., Fan, S., Wan, T., Zhang, J., & Cai, Y. (2022). Methyl jasmonate induces postharvest disease resistance to decay caused by *Alternaria alternata* in sweet cherry fruit. *Scientia Horticulturae*, 292, 110624.
doi: [10.1016/j.scienta.2021.110624](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110624)
- Pang, L., Wu, Y., Pan, Y., Ban, Z., Li, L., & Li, X. (2020). Insights into exogenous melatonin associated with phenylalanine metabolism in postharvest strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 111244.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2020.111244](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111244)
- Panth, N., Manandhar, B., & Paudel, K. R. (2017). Anticancer activity of *Punica granatum* (Pomegranate): A review. *Phytotherapy Research*, 31(4), 568-578.
doi: [10.1002/ptr.5784](https://doi.org/10.1002/ptr.5784)
- Pareek, S., Valero, D., & Serrano, M. (2015). Postharvest biology and technology of pomegranate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), 2360-2379.
doi: [10.1002/jsfa.7069](https://doi.org/10.1002/jsfa.7069)
- Park, S. H., & Kim, S. H. (2014). Poly(ethylene terephthalate) recycling for high value added textiles. *Fashion and Textiles*, 1, 1.
doi: [10.1186/s40691-014-0001-x](https://doi.org/10.1186/s40691-014-0001-x)
- Passafiume, R., Perrone, A., Sortino, G., Gianguzzi, G., Saletta, F., Gentile, C., & Farina, V. (2019). Chemical-physical characteristics, polyphenolic content, and total antioxidant activity of three Italian-grown pomegranate cultivars. *NFS Journal*, 16, 9-14.
doi: [10.1016/j.nfs.2019.06.001](https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.06.001)
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 36-60.
doi: [10.1007/s11947-012-0867-9](https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9)
- Paulsen, E., Lema, P., Martínez-Romero, D., & García-Viguera, C. (2022). Use of PLA/PBAT stretch-cling film as an ecofriendly alternative for individual wrapping of broccoli heads. *Scientia Horticulturae*, 304, 111260.
doi: [10.1016/j.scienta.2022.111260](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111260)
- Pham, V. H. (2015). Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), 25-35.
doi: [10.1080/10408398.2012.708909](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.708909)

Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M., & Mittler, R. (2003). Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *The Plant Journal*, 34(2), 187-203.

doi: [10.1046/j.1365-313x.2003.01715.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01715.x)

Pott, D. M., Vallarino, J. G., & Osorio, S. (2020). Metabolite changes during postharvest storage: Effects on fruit quality traits. *Metabolites*, 10(5), 187.

doi: [10.3390/metabo10050187](https://doi.org/10.3390/metabo10050187)

Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., & Artık, N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(5), 567-575.

doi: [10.1006/jfca.2002.1071](https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1071)

Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2014). Chronic diseases caused by chronic inflammation require chronic treatment: Anti-inflammatory role of dietary spices. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 5, 238.

doi: [10.4172/2155-9899.1000238](https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000238)

~ R ~

Rabnawaz, M., Wyman, I., Auras, R., & Cheng, S. (2017). A roadmap towards green packaging: The current status and future outlook for polyesters in the packaging industry. *Green Chemistry*, 19(20), 4737-4753.

doi: [10.1039/C7GC02521A](https://doi.org/10.1039/C7GC02521A)

Radunić, M., Jukić Špika, M., Goreta Ban, S., Gadže, J., Díaz-Pérez, J. C., & Maclean, D. (2015). Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. *Food Chemistry*, 177, 53-60.

doi: [10.1016/j.foodchem.2014.12.102](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.102)

Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., Domingos, P., Ullah, S., Wege, S., Shabala, S., Feijó, J. A., Ryan, P. R., & Gilliam, M. (2015). GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communications*, 6, 7879.

doi: [10.1038/ncomms8879](https://doi.org/10.1038/ncomms8879)

Rao, D. S., & Shivashankara, K. S. (2018). Effect of modified atmosphere packaging on the extension of storage life and quality maintenance of pomegranate (cv. 'Bhagwa') at ambient and low temperatures. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 2103-2113.

doi: [10.1007/s13197-018-3125-y](https://doi.org/10.1007/s13197-018-3125-y)

- Rapisarda, P., Lo Bianco, M., Pannuzzo, P., & Timpanaro, N. (2008). Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), 348-354.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2008.02.002](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.002)
- Rastegar, S., Khankahdani, H. H., & Rahimzadeh, M. (2020a). Effects of melatonin treatment on the biochemical changes and antioxidant enzyme activity of mango fruit during storage. *Scientia Horticulturae*, 259, 108835.
doi: [10.1016/j.scienta.2019.108835](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108835)
- Rastegar, S., Khankahdani, H. H., & Rahimzadeh, M. (2020b). Effect of γ -aminobutyric acid on the antioxidant system and biochemical changes of mango fruit during storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 778-789.
doi: [10.1007/s11694-019-00326-x](https://doi.org/10.1007/s11694-019-00326-x)
- Reglamento de Ejecución (UE) 2016/83 de la Comisión, de 19 de enero de 2016, por el que se inscribe una denominación en el Registro de Denominaciones de Origen Protegidas y de Indicaciones Geográficas Protegidas [Granada Mollar de Elche/Granada de Elche (DOP)]. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L17, 8–9.
Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu>
- Rekhter, D., Lüdke, D., Ding, Y., Feussner, K., Feussner, I., & otros autores. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science*, 365(6452), 498-502.
doi: [10.1126/science.aaw1720](https://doi.org/10.1126/science.aaw1720)
- Renault, H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., & Deleu, C. (2010). *The Arabidopsis pop2-1* mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 10, 20.
doi: [10.1186/1471-2229-10-20](https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-20)
- Rossi, V., Cleeve-Edwards, N., Lundquist, L., Schenker, U., Dubois, C., Humbert, S., & Jolliet, O. (2015). Life cycle assessment of end-of-life options for two biodegradable packaging materials: Sound application of the European waste hierarchy. *Journal of Cleaner Production*, 86, 132-145.
doi: [10.1016/j.jclepro.2014.08.049](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.08.049)
- Rothwell, J. A., Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Medina-Remón, A., M'hiri, N., García-Lobato, P., Manach, C., Knox, C., Eisner, R., Wishart, D. S., & Scalbert, A. (2013). Phenol-Explorer 3.0: A major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013, bat070.
doi: [10.1093/database/bat070](https://doi.org/10.1093/database/bat070)

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8(10), 1809-1819.
doi: [10.1105/tpc.8.10.1809](https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809)

~ S ~

Sabbah, M., Di Pierro, P., Dell'Olmo, E., Arciello, A., & Porta, R. (2019). Improved shelf-life of Nabulsi cheese wrapped with hydrocolloid films. *Food Hydrocolloids*, 96, 29-35.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.010>

Saeedi, M., Mirdehghan, S. H., Nazoori, F., Esmailizadeh, M., & Koushesh Saba, M. (2022). Impact of calcium and γ -aminobutyric acid (GABA) on qualitative attributes and shelf life characteristics of fresh in-hull pistachio during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 187, 111863.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2022.111863](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111863)

Sanders, M. E. (1998). Overview of functional foods: Emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 341-347.
doi: [10.1016/S0958-6946\(98\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00056-9)

Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Serrano, M., & Valero, D. (2009). Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, 53(3), 152-154.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2009.03.005](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.03.005)

Sayyari, M., Valero, D., Babalar, M., Kalantari, S., Zapata, P. J., & Serrano, M. (2010). Prestorage oxalic acid treatment maintained visual quality, bioactive compounds, and antioxidant potential of pomegranate after long-term storage at 2 degrees C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6804-6808.
doi: [10.1021/jf100196h](https://doi.org/10.1021/jf100196h)

Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, D., & Guillén, F. (2011). Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chemistry*, 124(3), 964-970.
doi: [10.1016/j.foodchem.2010.07.036](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.036)

Sayyari, M., Aghdam, M. S., Salehi, F., & Ghanbari, F. (2016). Salicyloyl chitosan alleviates chilling injury and maintains antioxidant capacity of pomegranate fruits during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 211, 110-117.
doi: [10.1016/j.scienta.2016.08.015](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.08.015)

- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: Antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 215S-217S.
doi: [10.1093/ajcn/81.1.215S](https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S)
- Schreiner, M. (2005). Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition*, 44, 85-94.
doi: [10.1007/s00394-004-0498-7](https://doi.org/10.1007/s00394-004-0498-7)
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., & Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6), 360-367.
doi: [10.1016/j.jnutbio.2005.01.006](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.006)
- Selcuk, N., & Erkan, M. (2013). The effects of modified atmosphere packaging on the antioxidant activity and postharvest physiology of 'Canernar-1' pomegranates. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26(2), 81-87.
Disponibile en: <https://www.researchgate.net/publication/285912189>
- Selcuk, N., & Erkan, M. (2014). Changes in antioxidant activity and postharvest quality of sweet pomegranates cv. Hicrannar under modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 92, 29-36.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2014.01.007](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.007)
- Selcuk, N., & Erkan, M. (2015). Changes in phenolic compounds and antioxidant activity of sour-sweet pomegranates cv. 'Hicaznar' during long-term storage under modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 30-39.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2015.05.018](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.018)
- Seo, H., Song, J., Cheong, J.-J., et al. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy*, 98(8), 4788-4793.
doi: [10.1073/pnas.081557298](https://doi.org/10.1073/pnas.081557298)
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., & Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2741-2745.
doi: [10.1021/jf0479160](https://doi.org/10.1021/jf0479160)

- Shah, H. M. S., Singh, Z., Ul Hasan, M., Afrifa-Yamoah, E., & Woodward, A. (2023). Preharvest melatonin application alleviates red drupelet reversion, improves antioxidant potential, and maintains postharvest quality of 'Elvira' blackberry. *Postharvest Biology and Technology*, 203, 112418.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2023.112418](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112418)
- Shah, H. M. S., Singh, Z., Ul Hasan, M., Kaur, J., Afrifa-Yamoah, E., & Woodward, A. (2024). Melatonin application suppresses oxidative stress and maintains fruit quality of cold stored 'Esperanza' raspberries by regulating antioxidant system. *Postharvest Biology and Technology*, 207, 112597.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2023.112597](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112597)
- Shang, H., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y., & Zheng, Y. (2011). Effect of exogenous γ -aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1264-1268.
doi: [10.1021/jf104424z](https://doi.org/10.1021/jf104424z)
- Shang, F., Liu, R., Wu, W., Han, Y., Fang, X., Chen, H., & Gao, H. (2021). Effects of melatonin on the components, quality, and antioxidant activities of blueberry fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 147, 111582.
doi: [10.1016/j.lwt.2021.111582](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111582)
- Sharma, M., Jacob, J. K., Subramanian, J., & Paliyath, G. (2010). Hexanal and 1-MCP treatments for enhancing the shelf life and quality of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 125(3), 239-247.
doi: [10.1016/j.scienta.2010.03.020](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.020)
- Sharma, A., & Zheng, B. (2019). Melatonin mediated regulation of drought stress: Physiological and molecular aspects. *Plants*, 8(7), 190.
doi: [10.3390/plants8070190](https://doi.org/10.3390/plants8070190)
- Shelp, B. J., Bown, A. W., & McLean, M. D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science*, 4(11), 446-452.
doi: [10.1016/s1360-1385\(99\)01486-7](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01486-7)
- Shelp, B. J., Bozzo, G. G., Zarei, A., Simpson, J. P., Trobacher, C. P., & Allan, W. L. (2012). Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants. II. Integrated analysis. *Botany*, 90(9), 781-793.
doi: [10.1139/B2012-041](https://doi.org/10.1139/B2012-041)
- Shiratake, K., & Martinoia, E. (2007). Transporters in fruit vacuoles. *Plant Biotechnology*, 24, 127-133.
doi: [10.5511/plantbiotechnology.24.127](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.127)

- Shomali, A., Aliniaiefard, S., Didaran, F., Lotfi, M., Mohammadian, M., Seif, M., Strobel, W. R., Sierka, E., & Kalaji, H. M. (2021). Synergistic effects of melatonin and gamma-aminobutyric acid on protection of photosynthesis system in response to multiple abiotic stressors. *Cells*, *10*(7), 1631.
doi: [10.3390/cells10071631](https://doi.org/10.3390/cells10071631)
- Shwartz, E., Glazer, I., Bar-Ya'akov, I., Matityahu, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., & Amir, R. (2009). Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. *Food Chemistry*, *115*(3), 965-973.
doi: [10.1016/j.foodchem.2009.01.036](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.036)
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Dalla Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *19*(12), 634-643.
doi: [10.1016/j.tifs.2008.07.003](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003)
- Sisler, E. C., Dupille, E., & Serek, M. (1996). Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Regulation*, *18*, 79-86.
doi: [10.1007/BF00028491](https://doi.org/10.1007/BF00028491)
- Sisler, E. C., Serek, M., Dupille, E., & others. (1999). Inhibition of ethylene responses by 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation*, *27*, 105-111.
doi: [10.1023/A:1006153016409](https://doi.org/10.1023/A:1006153016409)
- Sisler, E. C., & Serek, M. (2006). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, *100*(3), 577-582.
doi: [10.1111/j.1399-3054.1997.tb03063.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03063.x)
- State Statistical Committee of the Republic of Azerbaijan (SSCRA). (2019). *The State Statistical Committee of the Republic of Azerbaijan*. Acceso, Mayo 2023.
Disponible en: <https://www.stat.gov.az/source/agriculture/?lang=en>
- Stehle, J. H., Saade, A., Rawashdeh, O., Ackermann, K., Jilg, A., Sebestény, T., & Maronde, E. (2011). A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function, and chronobiological diseases. *Journal of Pineal Research*, *51*(1), 17-43.
doi: [10.1111/j.1600-079X.2011.00856.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00856.x)

Steward, F. C., Thompson, J. F., & Dent, C. E. (1949). γ -Aminobutyric acid: A constituent of the potato tuber. *Science*, 110(2861), 439-440.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., & Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235-270.

doi: [10.1146/annurev.phyto.35.1.235](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.235)

Stover, E., & Mercure, E. (2007). The pomegranate: A new look at the fruit of paradise. *HortScience*, 42(5), 1088-1092.

doi: [10.21273/HORTSCI.42.5.1088](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.5.1088)

Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449-7454.

doi: [10.1021/jf0207530](https://doi.org/10.1021/jf0207530)

Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Zhang, H., Li, D., Shi, J., Ren, L., Weeda, S., Zhao, B., & Ren, S. (2015). Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 657-668.

doi: [10.1093/jxb/eru332](https://doi.org/10.1093/jxb/eru332)

Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Cao, Y., Li, X., Zhang, H., Zhang, L., Tan, D. X., & Guo, Y. D. (2016). A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato. *Journal of Pineal Research*, 61(2), 138-153.

doi: [10.1111/jpi.12315](https://doi.org/10.1111/jpi.12315)

Sureda, A., Bibiloni, M. M., Julibert, A., Bouzas, C., Argelich, E., Llompart, I., Pons, A., & Tur, J. A. (2018). Adherence to the Mediterranean diet and inflammatory markers. *Nutrients*, 10(1), 62.

doi: [10.3390/nu10010062](https://doi.org/10.3390/nu10010062)

~ T ~

Tan, D. X., Manchester, L. C., Liu, X., Rosales-Corral, S. A., Acuna-Castroviejo, D., & Reiter, R. J. (2012). Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of Pineal Research*, 54(2), 127-138.

doi: [10.1111/jpi.12026](https://doi.org/10.1111/jpi.12026)

- Tao, X. Y., Wu, Q., Li, J. Y., Wang, D., Nassarawa, S. S., & Ying, T. J. (2021). Ethylene biosynthesis and signal transduction are enhanced during accelerated ripening of postharvest tomato treated with exogenous methyl jasmonate. *Scientia Horticulturae*, 281, 109965.
doi: [10.1016/j.scienta.2021.109965](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109965)
- Tao, X., Wu, Q., Li, J., Huang, S., Cai, L., Mao, L., Luo, Z., Li, L., & Ying, T. (2022). Exogenous methyl jasmonate regulates phenolic compounds biosynthesis during postharvest tomato ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 184, 111760.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2021.111760](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111760)
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *International Scholarly Research Notices*, 2013(1), 762412.
doi: [10.1155/2013/762412](https://doi.org/10.1155/2013/762412)
- Thakur, R., Pristijono, P., Scarlett, C. J., Bowyer, M., Singh, S. P., & Vuong, Q. V. (2019). Starch-based films: Major factors affecting their properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 1079-1089.
doi: [10.1016/j.ijbiomac.2019.03.190](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.190)
- Torrens-Spence, M. P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C. M., Pluskal, T., Shen, A., & Weng, J. K. (2019). PBS3 and EPS1 complete salicylic acid biosynthesis from isochorismate in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 12(12), 1577-1586.
doi: [10.1016/j.molp.2019.11.005](https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.11.005)
- Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance-Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*, 17, 48-59.
doi: [10.1016/j.cpb.2019.03.002](https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002)
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
doi: [10.3390/nu2121231](https://doi.org/10.3390/nu2121231)
- Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Journal of Nutrition*, 133(7), 2125-2130.
doi: [10.1093/jn/133.7.2125](https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2125)
- Turkish Statistical Institute (TurkStat). (2019). *Other fruit balance sheets*. Ankara: Statistic Data Portal. Acceso, Mayo 2023.
Disponibile en: <https://www.tuik.gov.tr/Home/Index>

~ U ~

Ueno, H. (2000). Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3), 67-79.

doi: [10.1016/S1381-1177\(00\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00114-4)

United States Department of Agriculture (USDA), National Nutrient Database for Standard Reference. Acceso, Mayo 2023.

Disponibile en: <https://agdatacommons.nal.usda.gov/>

Usanmaz, S. (2014). Yield and pomological characteristics of three pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars: Wonderful, Acco and Herskovitz. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2(3), 61-65.

doi: [10.11648/j.ajaf.20140203.12](https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20140203.12)

~ V ~

Valdenegro, M., Huidobro, C., Monsalve, L., Bernales, M., Fuentes, L., & Simpson, R. (2018). Effects of ethrel, 1-MCP and modified atmosphere packaging on the quality of 'Wonderful' pomegranates during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(13), 4854-4865.

doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9015>

Valero, D., & Serrano, M. (2010). *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality* (1st ed.). CRC Press.

doi: [10.1201/9781439802670](https://doi.org/10.1201/9781439802670)

Valero, D., Mirdehghan, S. H., Sayyari, M., & Serrano, M. (2015). Vapor treatments, chilling, storage, and antioxidants in pomegranates. *Processing and Impact on Active Components in Food*, 189-196.

doi: [10.1016/B978-0-12-404699-3.00023-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00023-8)

Vallarino, J. G., & Osorio, S. (2019). Organic acids. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 207-224.

doi: [10.1016/B978-0-12-813278-4.00010-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00010-5)

Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., & González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(6), 496-511.

doi: [10.1080/10408390701537344](https://doi.org/10.1080/10408390701537344)

Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P., & Bassaganya-Riera, J. (2013). Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 789764.
doi: [10.1155/2013/789764](https://doi.org/10.1155/2013/789764)

Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654.
doi: [10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x](https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x)

Vučić, V., Grabež, M., Trchounian, A., & Arsić, A. (2019). Composition and potential health benefits of pomegranate: A review. *Current Pharmaceutical Design*, 25(16), 1817-1827.
doi: [10.2174/1381612825666190708183941](https://doi.org/10.2174/1381612825666190708183941)

~ W ~

Wan, R., Song, J., Lv, Z., Qi, X., Feng, Z., Yang, Z., Cao, X., Shi, J., Jian, Z., Tong, R., Hu, Q., & Chen, Y. (2023). Effects of 1-MCP treatment on postharvest fruit of five pomegranate varieties during low-temperature storage. *Horticulturae*, 9(9), 1031.
doi: [10.3390/horticulturae9091031](https://doi.org/10.3390/horticulturae9091031)

Wang, Y., Luo, Z., Huang, X., Yang, K., Gao, S., & Du, R. (2014). Effect of exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) treatment on chilling injury and antioxidant capacity in banana peel. *Scientia Horticulturae*, 168, 132-137.
doi: [10.1016/j.scienta.2014.01.022](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.022)

Wang, X., Liang, D., Xie, Y., Lv, X., Wang, J., & Xia, H. (2019). Melatonin application increases accumulation of phenol substances in kiwifruit during storage. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(5), 361-367.
doi: [10.9755/ejfa.2019.v31.i5.1954](https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i5.1954)

Wang, P., Zhang, Q., Hou, H., Liu, Z., Wang, L., Rasekhamgham, R., HamedKord-Varkaneh, H., Santos, H. O., & Yao, G. (2020). The effects of pomegranate supplementation on biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction: A meta-analysis and systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, 49, 102358.
doi: [10.1016/j.ctim.2020.102358](https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102358)

- Wang, H., Cheng, X., Wu, C., Fan, G., Li, T., & Dong, C. (2021a). Retardation of postharvest softening of blueberry fruit by methyl jasmonate is correlated with altered cell wall modification and energy metabolism. *Scientia Horticulturae*, 276, 109752.
doi: [10.1016/j.scienta.2020.109752](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109752)
- Wang, S.-Y., Shi, X.-C., Liu, F.-Q., & Laborda, P. (2021b). Effects of exogenous methyl jasmonate on quality and preservation of postharvest fruits: A review. *Food Chemistry*, 353, 129482.
doi: [10.1016/j.foodchem.2021.129482](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129482)
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth, and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697.
doi: [10.1093/aob/mcm079](https://doi.org/10.1093/aob/mcm079)
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*, 111(6), 1021-1058.
doi: [10.1093/aob/mct067](https://doi.org/10.1093/aob/mct067)
- Watkins, C. B., Nock, J. F., & Whitaker, B. D. (2000). Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 19(1), 17-32.
doi: [10.1016/S0925-5214\(00\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00070-3)
- Watkins, C. B. (2002). Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. *Fruit quality and its biological basis*, 180-224.
Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/313645851>
- Watkins, C. B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables: Review. *Biotechnology Advances*, 24(4), 389-409.
doi: [10.1016/j.biotechadv.2006.01.005](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.005)
- Wiguna, G., Damayanti, F., Mubarok, S., Ezura, H., & Anas, A. (2021). Genetic control of fruit shelf life and yield in crossbreeding of *Sletr1-2* mutant with Indonesian tropical tomatoes: Combining ability of *Sletr1-2* mutant. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(10), 4671-4675.
doi: [10.13057/biodiv/d221060](https://doi.org/10.13057/biodiv/d221060)

- Wu, S., & Tian, L. (2017). Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). *Molecules*, 22(10), 1606.
doi: [10.3390/molecules22101606](https://doi.org/10.3390/molecules22101606)
- Wu, Y., Liu, X., Fu, B., Zhang, Q., Tong, Y., Wang, J., & Yin, X. (2020a). Methyl jasmonate enhances ethylene synthesis in kiwifruit by inducing NAC genes that activate ACS1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), 3267-3276.
doi: [10.1021/acs.jafc.9b07379](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07379)
- Wu, X., Jia, Q., Ji, S., Gong, B., Li, J., Lü, G., & Gao, H. (2020b). Gamma-aminobutyric acid (GABA) alleviates salt damage in tomato by modulating Na⁺ uptake, the GAD gene, amino acid synthesis and reactive oxygen species metabolism. *BMC Plant Biology*, 20, 465.
doi: [10.1186/s12870-020-02669-w](https://doi.org/10.1186/s12870-020-02669-w)

~ X ~

- Xia, H., Shen, Y., Shen, T., Wang, X., Zhang, X., Hu, P., Liang, D., Lin, L., Deng, H., Wang, J., Deng, Q., & Lv, X. (2020). Melatonin accumulation in sweet cherry and its influence on fruit quality and antioxidant properties. *Molecules*, 25(3), 753.
doi: [10.3390/molecules25030753](https://doi.org/10.3390/molecules25030753)
- Xie, T., Ji, J., Chen, W., Yue, J., Du, C., Sun, J., Chen, L., Jiang, Z., & Shi, S. (2019). γ -Aminobutyric acid is closely associated with accumulation of flavonoids. *Plant Signaling & Behavior*, 14(7), 1604015.
doi: [10.1080/15592324.2019.1604015](https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1604015)

~ Y ~

- Yamasaki, K., Motomura, Y., Yagi, Y., Nomura, H., Homura, S., Kikuchi, S., & Nakai, M. (2013). Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(4), 23603.
doi: [10.4161/psb.23603](https://doi.org/10.4161/psb.23603)
- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., & Farmer, E. E. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell*, 19(8), 2470-2483.
doi: [10.1105/tpc.107.050708](https://doi.org/10.1105/tpc.107.050708)

- Yan, W., Cao, M., Shi, L., Wu, W., Xu, F., Chen, W., & Yang, Z. (2024). γ -Aminobutyric acid delays fruit softening in postharvest kiwifruit by inhibiting starch and cell wall degradation. *Postharvest Biology and Technology*, 213, 112916.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2024.112916](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2024.112916)
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 35, 155-189.
doi: [10.1146/annurev.pp.35.060184.001103](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103)
- Yang, J., Sun, C., Zhang, Y., Fu, D., Zheng, X., & Yu, T. (2017). Induced resistance in tomato fruit by γ -aminobutyric acid for the control of alternaria rot caused by *Alternaria alternata*. *Food Chemistry*, 221, 1014-1020.
doi: [10.1016/j.foodchem.2016.11.061](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.061)
- Yokoo, S., Inoue, S., Suzuki, N., Amakawa, N., Matsui, H., Nakagami, H., Takahashi, A., Arai, R., & Katou, S. (2018). Comparative analysis of plant isochorismate synthases reveals structural mechanisms underlying their distinct biochemical properties. *Bioscience Reports*, 38(2), BSR20171457.
doi: [10.1042/BSR20171457](https://doi.org/10.1042/BSR20171457)
- Yousuf, B., Qadri, O. S., & Srivastava, A. K. (2018). Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 198-209.
doi: [10.1016/j.lwt.2017.10.051](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.051)
- Yuan, Z., & Zhao, X. (2019). Pomegranate genetic resources and their utilization in China. *Acta Horticulturae*, 1254, 49-56.
doi: [10.17660/ActaHortic.2019.1254.8](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1254.8)
- Yuan, F., Wang, C., Yi, P., Li, L., Wu, G., Huang, F., Huang, M., & Gan, T. (2023). The effects of combined 1-methylcyclopropene and melatonin treatment on the quality characteristics and active oxygen metabolism of mango fruit during storage. *Foods*, 12(10), 1979.
doi: [10.3390/foods12101979](https://doi.org/10.3390/foods12101979)

~ Z ~

- Zarfeshany, A., Asgary, S., & Javanmard, S. H. (2012). Potent health effects of pomegranate. *Advanced Biomedical Research*, 3(1), 100.
doi: [10.4103/2277-9175.129371](https://doi.org/10.4103/2277-9175.129371)

- Zembouai, I., Bruzaud, S., Kaci, M., Benhamida, A., Corre, Y. M., & Grohens, Y. (2014). Mechanical recycling of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/polylactide based blends. *Journal of Polymers and the Environment*, 22, 449-459.
doi: [10.1007/s10924-014-0684-5](https://doi.org/10.1007/s10924-014-0684-5)
- Zeng, W., Hassan, M. J., Kang, D., Peng, Y., & Li, Z. (2021). Photosynthetic maintenance and heat shock protein accumulation relating to γ -aminobutyric acid (GABA)-regulated heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *South African Journal of Botany*, 141, 405-413.
doi: [10.1016/j.sajb.2021.05.028](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.028)
- Zhai, R., Liu, J., Liu, F., Zhao, Y., Liu, L., Fang, C., Wang, H., Li, X., Wang, Z., Ma, F., & Xu, L. (2018). Melatonin limited ethylene production, softening, and reduced physiology disorder in pear (*Pyrus communis* L.) fruit during senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 38-46.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2018.01.017](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.017)
- Zhang, Z., Huber, D. J., Qu, H., Yun, Z., Wang, H., Huang, Z., Huang, H., & Jiang, Y. (2015). Enzymatic browning and antioxidant activities in harvested litchi fruit as influenced by apple polyphenols. *Food Chemistry*, 171, 191-199.
doi: [10.1016/j.foodchem.2014.09.001](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.001)
- Zhang, R., Lan, W., Ding, J., Ahmed, S., Qin, W., He, L., & Liu, Y. (2019a). Effect of PLA/BAT antibacterial film on storage quality of passion fruit during shelf-life. *Molecules*, 24(18), 3378.
doi: [10.3390/molecules24183378](https://doi.org/10.3390/molecules24183378)
- Zhang, M., Liu, W., Li, C., Shao, T., Jiang, X., Zhao, H., & Ai, W. (2019b). Postharvest hot water dipping and hot water forced convection treatments alleviate chilling injury for zucchini fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 249, 219-227.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.058>
- Zhang, Y., & Li, X. (2019). Salicylic acid: Biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 29-36.
doi: [10.1016/j.pbi.2019.02.004](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.004)
- Zhang, W., Cao, J., Fan, X., & Jiang, W. (2020). Applications of nitric oxide and melatonin in improving postharvest fruit quality and the separate and crosstalk biochemical mechanisms. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 531-541.
doi: [10.1016/j.tifs.2020.03.024](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.024)

- Zhang, H., Pu, J., Liu, H., Wang, M., Du, Y., Tang, X., Luo, X., Wang, Y., & Deng, Q. (2023). Effects of L-Cysteine and γ -Aminobutyric Acid Treatment on Postharvest Quality and Antioxidant Activity of Loquat Fruit during Storage. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10541.
doi: [10.3390/ijms241310541](https://doi.org/10.3390/ijms241310541)
- Zhang, Y., Lin, B., Tang, G., Chen, Y., Deng, M., Lin, Y., Li, M., He, W., Wang, Y., Zhang, Y., Luo, Y., Chen, Q., Wang, X., & Tang, H. (2024). Application of γ -aminobutyric acid improves the postharvest marketability of strawberry by maintaining fruit quality and enhancing antioxidant system. *Food Chemistry: X*, 21, 101252.
doi: [10.1016/j.fochx.2024.101252](https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101252)
- Zhao, X., Yuan, Z., Fang, Y., Yin, Y., & Feng, L. (2014). Flavonols and flavones changes in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peel during fruit development. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16, 1649-1659.
Disponible en: <https://jast.modares.ac.ir/article-23-9928-en.pdf>
- Zhao, X., Chen, S., Wang, S., Shan, W., Wang, X., Lin, Y., et al. (2020). Defensive responses of tea plants (*Camellia sinensis*) against tea green leafhopper attack: A multi-omics study. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1705.
doi: [10.3389/fpls.2019.01705](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01705)
- Zhao, L., Yan, S., Wang, Y., Xu, G., & Zhao, D. (2023). Evaluation of the effect of preharvest melatonin spraying on fruit quality of 'Yuluxiang' pear based on principal component analysis. *Foods*, 12(18), 3507.
doi: [10.3390/foods12183507](https://doi.org/10.3390/foods12183507)
- Zhou, C., Dong, W., Jin, S., Liu, Q., Shi, L., Cao, S., Li, S., Chen, W., & Yang, Z. (2022). γ -Aminobutyric acid treatment induced chilling tolerance in postharvest peach fruit by upregulating ascorbic acid and glutathione contents at the molecular level. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1059979.
doi: [10.3389/fpls.2022.1059979](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1059979)
- Zhu, L. J., Yu, H. T., Dai, X. M., Yu, M. L., & Yu, Z. F. (2022). Effect of methyl jasmonate on the quality and antioxidant capacity by modulating ascorbate-glutathione cycle in peach fruit. *Scientia Horticulturae*, 303, 111216.
doi: [10.1016/j.scienta.2022.111216](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111216)