

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE DESÓRDENES FISIOLÓGICOS EN PALTAS (*PERSEA AMERICANA* MILL.) CV. HASS EN ALMACENAJE REFRIGERADO, EN DOS ESTADOS DE MADUREZ.

P. Undurraga¹, J. A. Olaeta¹, G. Opazo¹.

¹ **Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Valparaíso-Chile, Av. Brasil 2950 Valparaíso - Chile Correo electrónico: pundurra@ucv.cl**

RESUMEN

Paltas cv. Hass cosechados en dos estados de madurez 9-11% y 14-16% de aceite, se almacenaron a 3 y 7 °C en cámaras de refrigeración. A los 0, 10, 20 30 y 40 días de almacenaje se evaluó la actividad de las enzimas peroxidasa y polifenoloxidasa tanto en tejidos sanos como en aquellos que presentaron presencia de desórdenes fisiológicos. Se realizó además, un análisis histológico

Los análisis enzimáticos mostraron que la actividad de la enzima polifenoloxidasa fue mayor en aquel tejido que presentaba daños fisiológicos, a su vez la temperatura de almacenaje afectó la actividad de esta enzima, siendo mayor en aquellos frutos almacenados a 3 °C. La enzima peroxidasa presentó una mayor actividad en el tejido sano.

De los análisis histológicos se observó que la estructura y organización celular fue mejor en aquella fruta con niveles de madurez 9-11%, aunque en ambas temperaturas de almacenaje el grado de desorganización celular se incrementó con el tiempo una la pared celular disminuyó. Se observó también, una lignificación progresiva en las paredes celulares de frutos con madurez mas avanzada, lo que no ocurrió en frutos que tenían un porcentaje de 9-11% de aceite.

Palabras Clave: Aguacate, Palta, Daños fisiológicos, Peroxidasa, Polifenoloxidasa.

INTRODUCCIÓN

La palta es un fruto originario de regiones tropicales y por ello es sensible al daño por bajas temperaturas, que se manifiesta como desórdenes fisiológicos (Couey, 1982; Cutting *et al.*, 1992;

Carrillo, 1991). Los factores que inducen estas anomalías, se originan tanto en precosecha como en postcosecha, vinculándose directamente con la temperatura de almacenaje afectando su calidad. Las bajas temperaturas producen en los frutos un estrés oxidativo, donde este responde con procesos deletéreos intracelulares endógenos (Chrispeels et al. 1999), aumentando la capacidad de lignificación y de peroxidación de lípidos de la membrana lo que produce un desarrollo de manchas en la pulpa.(Meneghini, et al., 1978; Martins,1995) activando los sistemas enzimáticos principalmente las enzimas Polifenoloxidasas y Peroxidasas.

Para ello esta investigación plantea evaluar el efecto de la madurez, la temperatura y tiempo de almacenaje refrigerado, sobre la aparición de desórdenes fisiológicos y su relación con la organización celular y la actividad de las enzimas polifenoloxidasas y peroxidasas en palta cv. Hass.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos de palto del cultivar Hass de tamaños entre 160 - 250g., sanos, sin malformaciones, fueron cosechados con dos índices de madurez: 9-11% y 14-16% de aceite. Para cada estado de madurez se separaron 200 frutos y fueron embalados en mallas que contenían 5 frutos cada una (1 k aprox.), correspondiendo esta a la unidad experimental. Luego y para cada estado de madurez, fueron almacenados por 10, 20, 30 y 40 días en cámara de refrigeración., la mitad de ellos a una temperatura de $3 \pm 1^\circ\text{C}$, y 90 % HR., y la otra mitad a $7 \pm 1^\circ\text{C}$, también con 90% HR.

Después de cada periodo de almacenaje los frutos se partieron en forma longitudinal y se determinó la actividad de las enzimas: polifenoloxidasas y peroxidasas tanto en frutos sanos como en aquellos que presentaron desórdenes fisiológicos internos, en estos últimos la determinación se realizó tanto en el tejido sano como el que tenía daño. Para ello se pesaron 40 g de pulpa triturada y tratada con 130 mL., de solución tampón fosfato 0,06M a pH 6,5, luego fue agitada por 5 min. a 4°C y centrifugada a 4500 RPM, por 45 min. a 4°C . Al sobrenadante se agregó 0,6% de polivinilpirrolidona (PVP) y se agitó durante 1 hora a 4°C , el producto filtrado se utilizó como extracto enzimático.(Sánchez et al. (1986).

La actividad de la polifenoloxidasas se determinó usando: 2mL de extracto enzimático, 5mL de tampón fosfato 0,1M a pH 6,5 y 5mL de 4-metil catecol. La absorbancia será monitoreada a 410nm. La peroxidasas se determinó usando 0,3mL de extracto enzimático, y 2,7mL de una solución que contiene: tampón fosfato 0,066M a pH 6,5, guayacol y H_2O_2 . La absorbancia será monitoreada a 470nm (Bergmeyer, 1974)

Para los análisis histológicos las muestras fueron fijadas con F.A.A, sometiéndose a un proceso de deshidratación con soluciones alcohólicas de 50°, 60°, 70°, 95° y 100°, para posteriormente incluir en parafina el corte.

Las muestras deshidratadas se trataron con xilol y luego con parafina sólida para formar bloques, los que se utilizaron para la realización de los cortes histológicos. Estos bloques fueron cortados en un micrótopo rotatorio manual Leitz con un grosor de 15 μ . y Los cortes puestos en portaobjetos previamente tratados con albúmina y secados a 25°C durante 24 hrs. Luego a los cortes se les eliminó la parafina con xilol y se procedió a su rehidratación para ser teñidos con safranina al 1% y verde luz 0,2%. Las muestras teñidas se analizaron por microscopia óptica con microscopio Nikkon AFX-35 con aumentos de 10 y 20X.

Se utilizó un Diseño completamente al azar de 2x2x4 (madurez, temperatura, almacenaje) con 5 repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los daños fisiológicos desarrollados, correspondieron a Pardeamiento de pulpa y Oscurecimiento vascular, los que aparecieron solo en frutos con un 14-16% de aceite, almacenada a 3°C y 7 °C.

Tejido de paltas sin daño fisiológico y con estado madurez mas avanzado, presentaron una mayor actividad de la enzima polifenoloxidasas. Su actividad descreció después de 40 días de almacenaje refrigerado, alcanzando similar magnitud en ambas temperaturas de almacenaje (Cuadro1).

Cuadro 1. Actividad relativa de la enzima Polifenoloxidasas ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$), en tejido sano de paltas, almacenadas a 3° y 7°C

Días de almacenaje	9-11% aceite		14-16% aceite	
	3 °C	7 °C	3 °C	7 °C
10	5,97	5,30	15,40	32,35
20	5,53	4,83	16,68	11,40
30	6,60	4,73	25,60	15,00
40	0,79	1,67	21,80	11,76

En relación a la temperatura de almacenaje, se observa que en general la actividad de la enzima polifenoloxidasas fue mayor al almacenar la fruta a 3°C, en ambos estados de madurez (Cuadros 1 y 2). Tejidos con daño fisiológico presentaron siempre, en las fechas evaluadas, una mayor actividad de la enzima polifenol oxidasas que el tejido sano (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad relativa de la enzima Polifenoloxidasas ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$) en tejido con desarrollo de desórdenes fisiológicos, en paltas con 14-16% de aceite.

Días de almacenaje	Pardeamiento Pulpa		Oscurecimiento Vascular	
	3 °C	7 °C	3 °C	7 °C
10	33,55	-	30,77	-
20	-	7,50	-	-
30	-	-	-	-
40	-	12,80	-	19,77

Al retrasar la cosecha, en general la concentración de calcio en el tejido disminuye afectando la estabilidad de las membranas lo que explica por qué la fruta de cosecha tardía es más sensible a los desórdenes fisiológicos. Cutting *et al.* (1992) señalan que la concentración de fenoles (sustratos de la PFO) se incremento en la medida que los frutos presentan mayor madurez.

La actividad de la enzima peroxidasa en tanto, fue mayor cuando la fruta fue almacenada a temperaturas de 7°C (Cuadro 3). A su vez en el tejido sano, la actividad de esta enzima fue mayor que en el tejido con daño fisiológico (Cuadros 3 y 4). Lo anterior explica que la participación de esta enzima no estaría directamente relacionada con la aparición de los desórdenes fisiológicos manifestados, sino que su acción tiene relación directamente con su actividad fisiológica oxidativa en el fruto. Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Zauberman, *et al.* (1985) quienes no registraron significativos incrementos de actividad de la peroxidasa en el cv. Fuerte con síntomas de daño por frío, luego de un almacenaje a 1+- 1°C.

Cuadro 3. Actividad relativa de la enzima Peroxidasa ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$), en tejido sano de paltas, almacenadas a 3° y 7°C.

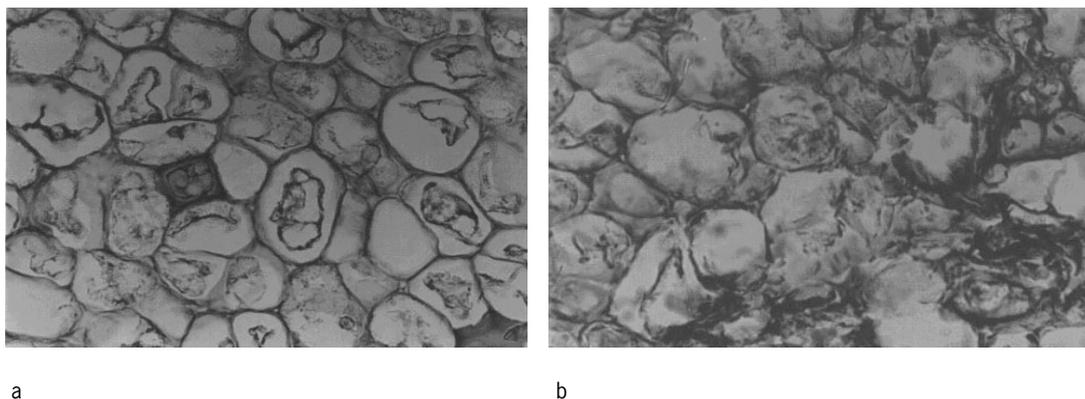
Días de almacenaje	9-11% aceite		14-16% aceite	
	3 °C	7 °C	3 °C	7 °C
10	35,98	124,40	24,90	10,20
20	45,32	133,38	68,42	135,49
30	49,26	139,39	23,74	155,27
40	98,58	124,15	36,13	47,17

Cuadro 10. Actividad relativa de la enzima Peroxidasa ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$) en tejido con desarrollo de desordenes fisiológicos, en paltas con 14-16% de aceite.

Días de almacenaje	3 °C		7 °C	
	Pardeamiento de Pulpa	Oscurecimiento Vascular	Pardeamiento de Pulpa	Oscurecimiento Vascular
10	15.64	19.34	-	-
20	-	-	52.66	-
30	-	-	-	-
40	-	-	47.82	59.09

Análisis histológico

El análisis histológico, muestra que los tejidos de paltas cosechadas con 9-11% aceite, no mostraron una lignificación evidente ni una desorganización celular, sino hasta los 40 días de almacenaje (figura 1), esto se relaciona con la no manifestación de daño visual en la fruta durante el almacenaje. El tejido, con índice de madurez 14-16% de aceite en tanto, mostró una disgregación y una lignificación celular progresiva durante el almacenaje, especialmente en aquellos almacenados a 3°C (figura 2).

**Figura 1.** Corte longitudinal de tejido de palta Hass cosechada con 9-11% de aceite, a.-almacenada a 3°C por 20 días; b.-almacenada a 7°C por 40 días. Fotografías con microscopio óptico de luz con aumento de 20x.

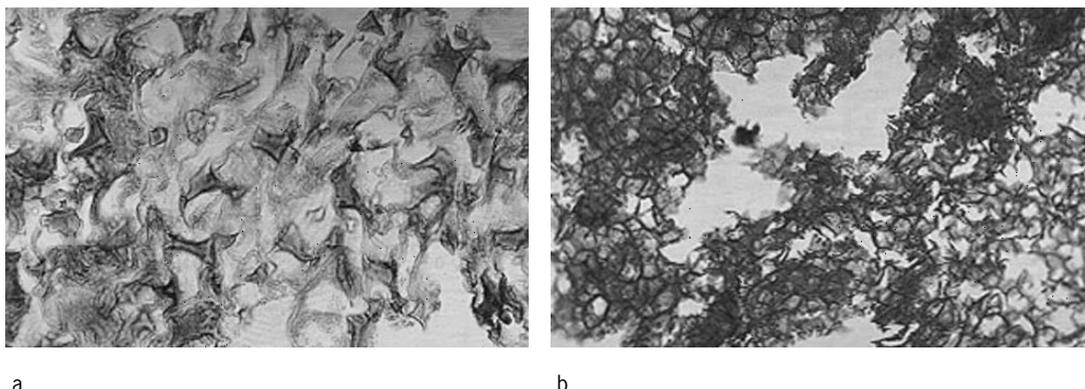


Figura 2. Corte longitudinal de tejido de palta Hass cosechada con 14-16% de aceite, a.-almacenada a 3°C por 20 días; b.- almacenada a 3°C por 40 días. Fotografía con microscopio óptico de luz con aumento de 40x.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente ensayo muestran que fruta almacenada a 3°C presentó una mayor actividad de la enzima polifenoloxidasas que fruta almacenada a 7°C, lo mismo ocurrió cuando se analizó el tejido que presentó daño fisiológico en relación al tejido sano.

Al analizar la enzima peroxidasa, fue en el tejido sano donde la actividad de esta enzima fue mayor.

El análisis histológico mostró que frutos con nivel de madurez 9-11% de aceite, tuvieron una mejor estructura y organización celular y una menor lignificación que paltas cosechadas con 14-16%. Por otro lado, la fruta con este último nivel de madurez, presentó durante el almacenaje una creciente desorganización celular, una disminución del grosor y un aumento de la lignificación de la pared celular.

BIBLIOGRAFÍA

- BERGMEYER, H. U. 1974. Methods of enzymatic analysis. New York, Academic Press. 1693p.
- CARRILLO, C.H. 1991. Almacenaje de frutos de palto (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte en atmósfera controlada. Tesis Ing. Agr. Santiago (Chile), Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 84p.
- COUEY, H.M. 1982. Chilling injury of crops on tropical and subtropical origin. Hortscience 71:162-164
- CUTTING, J.G.M., WOLSTELHOLME, B.N. AND HARDY, J. 1992. Increasing relative maturity alters the base mineral composition and phenolic concentration of avocado fruit. Journal of Horticultural Science 67(6):761-768
- CHRISPEELS, M.J., HOLUIGUE, L., LATORRE, R., LUAN, S., ORELLANA, A., PEÑA-CORTES, H., RAIKHEL, N., RONALD, P. AND TREWAVAS, A. 1999. Signal transduction networks and the biology of plant cells. Biological Research 32(1):35-60
- MARTINS, E., ROBALDINHO, R. AND MENEGHINI, R. 1995. Oxidative stress induced activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. Archives of Biochemistry and Biophysics 316:128-134
- MENEGHINI, R., HOFFMANN ME., DURAN N., FALJONI, A. AND CILENTO G. 1978. DNA damage during the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of isobutanol. Biochimica et Biophysica ACTA: 518 177-180.