



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS FACTORES INCIDENTES EN EL
AGRIETADO DEL FRUTO DE TOMATE (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) TIPO CEREZA: EL PAPEL DE LA
CUTÍCULA DEL FRUTO**

Antonio Javier Matas Arroyo

Málaga, 2005



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

ESTUDIO DE LOS FACTORES INCIDENTES EN EL
AGRIETADO DEL FRUTO DE TOMATE (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) TIPO CEREZA: EL PAPEL DE LA
CUTÍCULA DEL FRUTO

Memoria presentada por el Licenciado
en Biología Antonio Javier Matas
Arroyo para optar al grado de Doctor,

Málaga, marzo de 2005



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL “LA MAYORA”



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOQUÍMICA

JESÚS CUARTERO ZUECO, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en la Estación Experimental “La Mayora”, y ANTONIO HEREDIA BAYONA, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, directores del trabajo realizado por el Licenciado en Biología ANTONIO JAVIER MATAS ARROYO,

CERTIFICAN: que la Memoria titulada “ESTUDIO DE LOS FACTORES INCIDENTES EN EL AGRIETADO DEL FRUTO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) TIPO CEREZA: EL PAPEL DE LA CUTÍCULA DEL FRUTO”, que presenta el Licenciado ANTONIO JAVIER MATAS ARROYO para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente en Málaga a 16 de marzo de dos mil cinco.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

FRANCISCO J. ALONSO CARRIÓN, Director del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

ACREDITA QUE: la Tesis Doctoral titulada: “ESTUDIO DE LOS FACTORES INCIDENTES EN EL AGRIETADO DEL FRUTO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) TIPO CEREZA: EL PAPEL DE LA CUTÍCULA DEL FRUTO”, que presenta D. ANTONIO JAVIER MATAS ARROYO para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores D. Jesús Cuartero Zueco, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en la Estación Experimental “La Mayora”, y D. Antonio Heredia Bayona, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente en Málaga a 16 de marzo de dos mil cinco.

Desde el 1 de abril de 2001 hasta el 22 de febrero de 2005 he disfrutado de una Beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Cultura adscrita al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en la Estación Experimental “La Mayora” con la referencia AP2000-1523.

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el Contrato n.º: 8.06/72.2029 de Caja Rural Mediterránea, Sociedad Cooperativa de Crédito (CAJAMAR) y el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, con la colaboración de la Estación Experimental “La Mayora” (CSIC), bajo el título “Agrietado del tomate *Cherry*. Estudio de los factores implicados y posibles soluciones a aplicar en pre- y postcosecha”.

Parte de los resultados recogidos en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones (se adjunta copias de las mismas en el Anexo 3):

Matas AJ, López-Casado G, Cuartero J, Heredia A. 2005. Relative humidity and temperature modify the mechanical properties of isolated tomato fruit cuticles. *American Journal of Botany* **92**(3):462-468.

Matas AJ, Cobb ED, Paolillo DJ, Niklas KJ. 2004. Crack resistance in cherry tomato fruit correlates with cuticular membrane thickness. *Hortscience* **39**(6):1354-1358.

Benítez JJ, Matas AJ, Heredia A. 2004. Molecular characterization of the plant biopolyester cutin by AFM and spectroscopic techniques. *Journal of Structural Biology* **147**:179-184.

Matas AJ, Cobb ED, Bartsch JA, Paolillo DJ, Niklas KJ. 2004. Biomechanics and anatomy of *Lycopersicon esculentum* fruit peels and enzyme-treated samples. *American Journal of Botany* **91**:352-360.

Matas AJ, Cuartero J, Heredia A. 2004. Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticles. *Thermochimica Acta* **409**:165-168.

Este trabajo de Tesis Doctoral no habría sido posible sin la participación más o menos directa de numerosas personas que me ha instruido, aconsejado, ayudado y acompañando en cada una de sus fases y a las que estoy infinitamente agradecido.

Quiero agradecer y mostrar mi cariño a mis directores de Tesis, al Dr. Jesús Cuartero por haber influido tanto en mi maduración como profesional de la ciencia con su carácter y buen hacer, y al Dr. Antonio Heredia por introducirme en la investigación y apoyarme siempre durante mi formación, transmitiendo un estilo personal. A ambos les agradezco especialmente el haber hecho posible la realización de uno de mis sueños, realizar una tesis doctoral en investigación.

A Gloria López y Jesús Ariza, mis compañeros de trabajo en el proyecto de agrietado, quiero reconocerles mi más profundo agradecimiento por el estupendo trabajo en equipo que hemos realizado juntos; este trabajo es el vuestro también.

Al Dr. Karl J. Niklas y a Ed Cobb por hacer de mi estancia en Ithaca una experiencia inolvidable. Les agradezco el darme la oportunidad de trabajar y aprender junto a ellos y el haberme acogido en su casa con el cariño y simpatía que tuvieron conmigo. Así mismo agradezco al Dr. Dominick J. Paolillo su ayuda con los estudios de anatomía de la piel y al Dr. James Bartsch por haberme enseñado los secretos del manejo del Instron y como vencer la memoria del acero.

Al Dr. Jerónimo Parra, en representación de Cajamar, por el interés y apoyo que ha mostrado por nuestro trabajo desde el comienzo, gracias al cual este trabajo tiene continuidad en un futuro cercano.

Al Dr. Miguel Ángel Quesada, tutor, colega científico y amigo que durante muchos años ha estado siempre ahí con palabras amables y consejos sabios ayudándome en mi desarrollo personal.

A todos los que componen la gran familia de La Mayora, a los cuales debo en gran medida el haber conseguido realizar este trabajo con los tomatillos. Especialmente quiero agradecer la colaboración y los consejos de los Drs. Merce Romero y Rafael Fernández que

siempre estuvieron ahí para resolver mis dudas. A la Dra. Eva Domínguez por su inestimable aportación al manuscrito de la Tesis y sus muchos consejos en este y otros aspectos. A Antonio Cordón por hacer más fáciles todos los papeleos de mi estancia en La Mayora y estar siempre interesado por mi. A Jerónimo y Juan por su trabajo en la biblioteca y por conseguir tanto artículo sin quejarse nunca aunque me pusiera pesado. Con mucho cariño a Miguel Ángel y a Gonzalo porque ellos han dedicado el mismo cariño al cuidado de las plantas y han pasado muchas horas de calor en el invernadero ayudando siempre donde fuesen requeridos.

Quiero agradecer al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y muy especialmente a su director, Dr. Francisco Alonso, y a los Drs. Javier Márquez y Victoriano Valpuesta, así como a Rafa Cameselles, por su extraordinario comportamiento conmigo y las facilidades prestadas para la realización de este y otros trabajos de investigación. Al Dpto. de Química Inorgánica en las personas del Dr. Laureano Moreno y Dr. Miguel Ángel Aranda por facilitar la realización de los estudios de difracción de rayos X, al Dpto. de Ingeniería Química por facilitar el acceso a la espectroscopía de infrarrojos. También quiero manifestar mi agradecimiento al Servicio Análisis de Imagen de la UMA, especialmente a Manoli y Salva, y al Servicio de Microscopía, a Goyo y David con un especial recuerdo para Juanjo.

También quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José J. Benítez, del Instituto de Ciencias de los Materiales, por su dedicación en los estudios de AFM.

Agradezco especialmente a mis compañeros de laboratorio, JuanMa, Elisa, Antonio y Tere en La Mayora, y a José Reina, Chelo, Sonia, Alejandro en Bioquímica por sus consejos y ánimos así como por muchos buenos días de trabajo juntos. No me olvido de los del laboratorio de al lado, Abel, Edu, Karen, Aureliano, David, Verónica y otros muchos que pasaron por él.

Quiero tener un especial recuerdo para los que ya no están cerca, como Carolina, Mara, Yoly, Rocío, Cristina, Inma, Ana Belén, José Ignacio, Omar y Fernanda, pero que de una forma u otra marcaron mi paso por el laboratorio y con los que compartí desde estupendos desayunos a desternillantes partidos de fútbol sala.

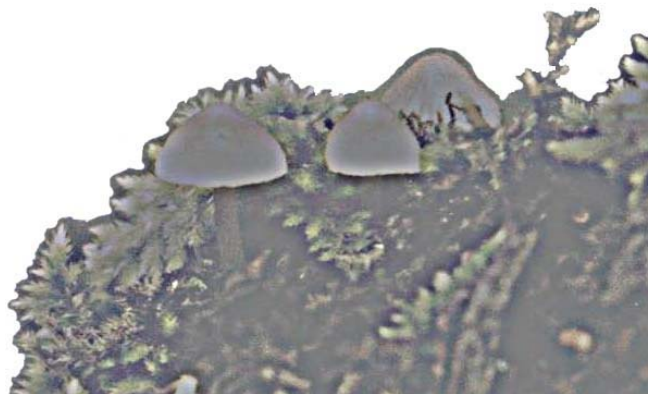
Desde que terminé la Licenciatura de Biología siempre he pensado que de las mejores cosas que me llevaba, una era el haber compartido la carrera con un grupo magnífico de compañeros a los que nunca olvidaré y a los que debo en gran medida el haber disfrutado tanto en estos años de estudio. Entre ellos no puedo dejar de mostrar mi cariño a Rafa, Miguel Luís, Silvia, María, Pablo, Sonia, María José, Valery, Ana, y Patri de la carrera. Así mismo, no puedo olvidarme de otros muchos amigos gracias a los cuales soy como soy y que me han acompañado siempre en la vida. Un recuerdo especial para José, Alicia, Lito, Javi, Sergio, Salva, Pablo, Manolo, Juan y muchos otros.

Reservo las últimas líneas para agradecer a mi Familia el haber confiado siempre en mí, dejándome elegir mi camino, dándome una educación y las herramientas necesarias para conseguir mis sueños. Quiero agradecerles el haberme enseñado que el trabajo no pesa, más peso en no tenerlo, y que las ilusiones son el alimento de nuestros esfuerzos. Especial recuerdo para mi tío Antonio, por despertar y estimular mi curiosidad, y para mi tío Manolo quién nunca perdió la sonrisa.

A mi Família

A Glória

ÍNDICE



*“... callosidades de la tierra y milagro de la naturaleza...
que no teniendo semillas, nacen de la tempestad.”*

Plinio el Viejo.

ÍNDICE	- i -
INTRODUCCIÓN	- 1 -
<i>Descripción botánica de la especie</i>	- 3 -
Taxonomía del género Lycopersicon	- 4 -
Origen del género Lycopersicon	- 6 -
<i>Importancia económica del tomate</i>	- 7 -
<i>El agrietado del fruto</i>	- 8 -
Importancia económica del agrietado del tomate	- 8 -
Tipos de agrietado	- 9 -
Factores que influyen en el agrietado	- 12 -
Tejidos del fruto: su papel en el agrietado	- 18 -
La cutícula	- 22 -
<i>Objetivos</i>	- 31 -
<i>Integración de los efectos ambientales y las características histológicas de la cutícula: modelos explicativos del agrietado</i>	- 35 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 37 -
<i>Cultivo en la estación experimental “la mayora”</i>	- 39 -
Instalaciones	- 39 -
Material Vegetal	- 40 -
Labores culturales	- 42 -
Toma de datos del cultivo	- 44 -
Inducción de agrietado por inmersión en agua	- 45 -
Aislamiento de cutículas	- 46 -
Determinación de componentes principales	- 47 -
Determinación del peso específico	- 47 -
Determinación del grosor	- 47 -
Estudio de las propiedades térmicas	- 49 -
Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier	- 49 -
Difracción de rayos-X	- 49 -
Microscopía de Fuerza Atómica	- 50 -
Espectroscopía ¹³ C RMN de estado sólido	- 50 -
Propiedades mecánicas de las cutículas aisladas	- 51 -
Análisis de los resultados	- 53 -

<i>Cultivo en la universidad de cornell</i>	- 54 -
Preparación de las muestras	- 55 -
Ensayos Mecánicos	- 55 -
Estudio anatómico	- 60 -
Análisis de los resultados	- 60 -
RESULTADOS	- 61 -
<i>Cultivos</i>	- 63 -
Agrietado natural durante todo el cultivo.	- 65 -
Inducción del agrietado: efecto mojado.	- 66 -
Entrada de agua al fruto.	- 67 -
Efecto temperatura	- 68 -
<i>Anatomía de la piel y la cutícula</i>	- 70 -
<i>Propiedades mecánicas de la piel y la cutícula aislada</i>	- 72 -
Ensayos de fluencia	- 72 -
Ensayos de carga-descarga secuencial	- 76 -
Ensayos de fractura por tensión	- 78 -
<i>Composición de la cutícula aislada</i>	- 80 -
Extracción enzimática	- 80 -
Componentes principales	- 80 -
Cantidad de cutícula por unidad de área	- 81 -
<i>Caracterización estructural</i>	- 83 -
Espectroscopia de Infrarrojos	- 83 -
Difracción de Rayos – X	- 84 -
Resonancia Magnética Nuclear	- 84 -
Microscopía de Fuerza Atómica	- 86 -
<i>Propiedades térmicas</i>	- 89 -
<i>Propiedades mecánicas</i>	- 92 -
Comportamiento biomecánico de la CM aislada de fruto de tomate	- 92 -
Efecto de la humedad relativa y la temperatura sobre el comportamiento biomecánico de la CM	- 93 -

DISCUSIÓN	- 99 -
<i>Material vegetal</i>	- 101 -
<i>Agrietado</i>	- 102 -
<i>Agrietado y variables ambientales</i>	- 104 -
<i>Composición de la cutícula</i>	- 114 -
<i>Estructura de la cutícula</i>	- 115 -
<i>Propiedades biomecánicas</i>	- 118 -
CONCLUSIONES	- 127 -
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 131 -
ANEXOS	- 149 -
<i>Determinación del calor específico mediante Calorimetría Diferencial de Barrido</i>	- 151 -
<i>Recursos en Internet</i>	- 157 -
<i>Artículos publicados</i>	- 163 -

INTRODUCCIÓN



“Momo no sabía si es que al principio no se había dado cuenta, o si no empezaba a hacerse visible hasta aquel momento, pero el caso es que, de pronto, empezaron a relucir en la tortuga unas letras que parecían salir del dibujo del caparazón.

VEN, deletreó Momo con dificultad.

Sorprendida, se irguió.”

Michael Ende, Momo.

Descripción botánica de la especie.

El tomate cultivado, *Lycopersicon esculentum* Mill., es una planta autógama, muy ramificada, rastrera y perenne, aunque se cultiva como anual. La raíz es pivotante pero tiende a ser fasciculada cuando la planta proviene de transplante. Todas las partes vegetativas aéreas, junto con los pedúnculos, pedicelos y cálices florales son densamente pubescentes y glandulares, lo que da a la planta su olor característico. Los tallos son gruesos y angulosos, de color verde, con nodos compuestos de dos o, más comúnmente, tres hojas y una inflorescencia. En la axila de cada hoja aparece un tallo secundario. Según el tipo de crecimiento, las plantas pueden ser determinadas o indeterminadas. En las plantas de hábito de crecimiento indeterminado, carácter silvestre de la especie, hay un crecimiento nodal continuo a partir de que aparece la primera inflorescencia, entre la séptima y décima hoja verdadera. Las plantas determinadas se caracterizan porque la primera inflorescencia aparece relativamente pronto, hay tendencia a que existan no más de dos hojas nodales entre racimos y el tallo principal termina en una inflorescencia. Las hojas son anchas, planas y pinnatisectas, con 7-11 foliolos. Las inflorescencias, de tipo racimo o cima, tienen un número de flores variable, generalmente de 7 a 12. Además, las inflorescencias pueden estar divididas o ser indivisas. Las flores son hermafroditas, perfectas, hipoginas y regulares. Los pedicelos poseen articulación funcional que actúa como zona de abscisión. El cáliz tiene cinco ó más sépalos lanceolados y fusionados en la base. La corola está formada por cinco o más pétalos de color amarillo, lanceolados y fusionados en la base. Los sépalos son más pequeños que los pétalos aunque, al ser el cáliz acrescente, alcanzan un mayor tamaño con el desarrollo del fruto. Los estambres, cinco o rara vez seis, están fusionados a la corola por sus filamentos. Poseen anteras largas de color amarillo, conniventes, que forman un tubo en forma de botella en cuyo interior queda encerrado el estilo. Cada antera posee una extensión apical generalmente también fusionadas entre ellas. El pistilo está formado por un ovario compuesto. El fruto es una baya, generalmente de color rojo, bi- o multiloculada, con una gruesa placenta en la que se encuentran numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginosa. Están descritas una gran diversidad de formas y tamaños de frutos (Domínguez, 2000).

Taxonomía del género *Lycopersicon*.

La primera descripción botánica del tomate la realizó Pier Andrea Mattioli, del jardín botánico de Padua (Italia), quien publicó su herbario en 1554. Desde entonces aparece descrito en numerosos herbarios como el de Matthias de L'Obel en 1581, el de Gerard en Inglaterra en 1597 o el de Salmon en Estados Unidos, ya en 1710.

El tomate pertenece a un género *Lycopersicon* Mill., el cual, en cuanto a número de especies, es relativamente poco importante dentro de la familia en la que se encuadra, las Solanaceae. Esta familia se divide, atendiendo a características morfológicas del embrión, en dos subfamilias: la Cestroidae y la Solanoideae. El carácter más importante de la subfamilia Solanoideae, en la que se incluyen los géneros *Lycopersicon* y *Solanum* L., es que todos sus miembros poseen una gran uniformidad en el número cromosómico ($2n=24$). Estos dos géneros se diferencian entre sí por la presencia de expansiones apicales estériles en las anteras en *Lycopersicon*, que están ausentes en *Solanum* (Taylor, 1986). Otra característica diferenciadora es el mecanismo de dehiscencia anteridial, presentando *Lycopersicon* dehiscencia tipo longitudinal mientras que en *Solanum* la apertura de las anteras es mediante poros apicales (Rick, 1979). No obstante, estudios posteriores han determinado que la dehiscencia en *Lycopersicon* comienza por poros apicales que derivan rápidamente en surcos longitudinales (Bonner y Dickinson, 1989). Como excepción hay que citar a *Lycopersicon pennellii* (Corr.) D' Arcy con dehiscencia poricidal pero encuadrada hoy en *Lycopersicon*.

La taxonomía generalmente aceptada es: Clase Dicotyledoneas, Orden Solanales (Personateae), Familia Solanaceae y Subfamilia Solanoideae. La situación taxonómica del tomate entre las Solanáceas ha resultado siempre clara, no así su ubicación genérica. Así, Caspar Bauhin (1623) en su Pinax reconoce la existencia de un grupo de plantas que incluyen los actuales géneros *Solanum*, *Atropa* L., *Physalis* L. y otros. En 1700, Tournefort establece siete géneros colocando los de fruto blando en un grupo diferenciado. Este autor reconoció *Lycopersicon* como distinto de *Solanum*. Linneo, en contra de la práctica común en su época y apoyándose en el Pinax, incluyó *Lycopersicon* dentro del género *Solanum*, denominado al tomate *Solanum lycopersicum*. Actualmente se acepta la asignación del tomate al género

Lycopersicon, tal y como lo definió Miller en 1754, reconociéndose un total de nueve especies:

Subgénero ¹	Especie	Subespecie	Complejo ²
<i>Lycopersicon</i>	<i>L. esculentum</i> Mill.	var. <i>esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i> (Dun.) Gray	<i>esculentum</i>
	<i>L. pimpinellifolium</i> (Jusl.) Mill.		<i>esculentum</i>
	<i>L. cheesmanii</i> Riley	f. <i>cheesmanii</i> f. <i>minor</i> (Hook. F.) Mull.	<i>esculentum</i>
<i>Eriopersicon</i>	<i>L. hirsutum</i> Humb. & Bonpl.	f. <i>hirsutum</i> f. <i>glabratum</i> Mull.	<i>esculentum</i>
	<i>L. pennellii</i> (Corr.) D' Arcy	var. <i>pennellii</i> var. <i>puberulum</i> (Corr.) D' Arcy	<i>esculentum</i>
	<i>L. chmielewskii</i> Rick, Kes., Fob. & Holle		<i>esculentum</i>
	<i>L. parviflorum</i> Rick, Kes., Fob. & Holle		<i>esculentum</i>
	<i>L. peruvianum</i> (L.) Mill.	var. <i>peruvianum</i> var. <i>humifusum</i> Mull.	<i>peruvianum</i>
	<i>L. chilense</i> Dun.		<i>peruvianum</i>

La especie *L. pennellii* ocupa un estatus especial, pues tiene dehiscencia poral (como es propio de género *Solanum*), pero cruza muy bien con *L. esculentum*. Además solamente unos pocos genes controlan la diferente estructura de anteras de ambas especies (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995).

Recientemente, ha sido propuesto un cambio en la nomenclatura del género *Lycopersicon* por la cual *Lycopersicon esculentum* Mill. pasaría a denominarse *Solanum lycopersium* L., si bien aún no está ampliamente aceptado el término (Peralta y col., 2005).

¹ Subgéneros definidos por Muller (1940) según la coloración del fruto: *Lycopersicon* (*Eulycopersicon*) (especies de fruto glabro y pigmentado) y *Eryopersicon* (especies de fruto verde pubescente, blanco o amarillento). Esta designación de subgéneros apenas se tiene en cuenta en la actualidad.

² Complejos definidos por Rick (1979) según que las especies cruzasen con facilidad con el tomate cultivado (complejo *esculentum*) o no lo hiciesen (complejo *peruvianum*).

Origen del género *Lycopersicon*

El origen del género *Lycopersicon* se localiza en la región andina que se extiende desde el Sur de Colombia al Norte de Chile y desde la costa del Pacífico (incluidas las islas Galápagos) a las estribaciones orientales de los Andes, comprendiendo los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). Sin embargo, parece que fue en México donde se originó el cultivo del tomate, muy probablemente a partir de *L. esculentum* var. *cerasiforme*, único *Lycopersicon* silvestre que crece como mala hierba y que se encuentra fuera del área de distribución del género.

A la llegada de los españoles a América, el tomate estaba integrado en la cultura azteca y en la de otros pueblos del área mesoamericana, existiendo diversidad de tamaños, formas y colores del fruto por lo que se considera que se había formado un centro de diversificación secundario de la especie. El vocablo tomate no se introdujo en la lengua castellana hasta 1532, procedente del náhuatl *tomatl*, aplicado genéricamente para plantas con frutos globosos o bayas, con muchas semillas y pulpa acuosa. Para precisar la especie se empleaba un prefijo calificativo, así para *L. esculentum* se usaba *xitomatl* (jiltomate) mientras que la especie más apreciada y empleada por los aztecas, *Physalis philadelphica* Lam., se denominaba *miltomatl*, tomate de milpa o simplemente tomate.

Cuando el tomate fue introducido en el Viejo Continente tuvo una aceptación muy desigual. Así, en España, Portugal e Italia pasó rápidamente a formar parte de la gastronomía popular. En el resto de Europa fue usado sólo como planta ornamental, por sus flores amarillas y sus bayas rojas o amarillas. Esta reticencia a su consumo se debió fundamentalmente a que la mayoría de las Solanaceae europeas son ricas en alcaloides tóxicos, cuando no mortales. Esta situación se mantuvo en algunos países como Alemania hasta principios del siglo XIX mientras que España y Portugal lo difundieron por todo el mundo a través de sus rutas comerciales y colonias de ultramar.

Importancia económica del tomate

En la actualidad el tomate es un producto básico de la horticultura española y tiene gran importancia a escala mundial. En 2002 se cultivaron 4122 miles de ha en todo el mundo, con una producción total de 112995 miles de toneladas (FAO., 2002). Los principales países productores de tomate fueron China y Estados Unidos de América, ocupando España el séptimo lugar a escala mundial y el segundo tras Italia en el ámbito europeo. España se sitúa en tercer lugar según el rendimiento de su producción tras Israel y Estados Unidos y se mantiene como el principal país exportador, con 910485 t en 2002 seguido de los Países Bajos con 603630 t. El principal destino del producto exportado es el resto de países europeos, tanto como producto de consumo en fresco como tomate procesado.

El mercado europeo de productos frescos incrementa constantemente sus demandas de productos fácilmente distinguibles por criterios que reflejen calidad. Entre las múltiples variedades y cultivares de tomate que se comercializan, los tomates tipo cereza (o tipo *cherry*) son claramente diferenciados por su tamaño de otros tipos de tomate y los consumidores han asociado esta característica con su excelente textura, apariencia y características organolépticas (Berenguer y col., 2002). El rápido incremento en la demanda de tomate cereza desde los mercados europeos ha provocado un gran incremento en la superficie dedicada a su producción, alcanzando las 720 ha con una producción de 47232 t de tomates. Alrededor del 90% de esta producción (42614 t) fue exportada principalmente a países del centro y oeste de Europa, siendo el Reino Unido el destino de más de la mitad del total exportado (25143 t). El Reino Unido es a su vez el mercado más exigente con la calidad del producto y el que mantiene los precios más estables durante todo el año (SOIVRE, 2002).

Al ser el tomate tipo cereza demandado e identificado como un producto de gran calidad, son aquellas fisiopatías que afectan su calidad las que representan un mayor problema a su producción y exportación. Especialmente importante es el agrietado del fruto (Maroto y col., 1995b), fisiopatía que afecta tanto a la producción como a la calidad de los frutos recolectados, en los cuales pueden aparecer grietas días después de ser recogidos. Esto provoca una pérdida en el valor comercial del fruto y un deterioro en la imagen de este producto en los mercados internacionales.

El agrietado del fruto

Agrietado es un término general aplicado a ciertos desordenes físicos de los frutos que se manifiestan como fracturas que afectan a la piel o a la cutícula del fruto. Este tipo de fisiopatía afecta, a nivel mundial, a frutos de numerosas especies de interés agronómico como manzanas (Opara y col., 1997), cerezas (Andersen y Richardson, 1982), pimientos (Aloni y col., 1998), aceitunas (Georget y col., 2001), litchis (Huang y col., 1999), uvas (Considine y Kriedmann, 1972), peras (Agrios, 1967), kakis (Yamada y col., 2002), melocotones (Williams y col., 1992), limones (Josan y col., 1995), mandarinas y naranjas (García-Luis y col., 1994), mangos (Bally, 1999), jojoba (Li y Gao, 1990) y tomates (Young, 1947; Frazier y Bowers, 1947), provocando mermas muy importantes en la producción y en la calidad comercial de los mismos.

Importancia económica del agrietado del tomate

No hay datos publicados de la repercusión de los frutos agrietados en la producción final de tomate en general y de tomate cereza en particular. Se ha hecho un intento serio por conseguir dichos datos de primera mano contactando directamente con algunas empresas del sector pero muchas de ellas se niegan a dar cifras (Ariza, 2005). El tomate tipo cereza tomó la importancia comercial actual gracias, en gran parte, al cultivar Josefina que presentaba porcentajes de agrietado en torno al 10%. Posteriormente han aparecido nuevos cultivares con menor incidencia de agrietado, entre el 1 y el 4 % (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Incidencia del agrietado del fruto de tomate cereza en la cosecha total que llega al almacén (%).

Empresa	% frutos agrietados	Cultivares
Mercomotril	3 al 4 %	Todos
Hortícola Guadalfeo	3%	Conchita, Natacha, Querubino
Frunet	3 al 4 %	Natacha, Conchita, Zarina, Salomé
Copronijar	1 %	Salomé
La Palma-Carchuna	3 %	Alina, Catalina, Naomi, Shirem

No obstante, el fruto del tomate cereza se agrieta en la planta, en el transporte del fruto desde el invernadero al almacén y, posteriormente, ya embalado, cuando se transporta desde el almacén al mercado de destino. Las cifras dadas en la Tabla 1.1 se refieren al agrietado hasta el almacén. Son muy pocos los frutos que se agrietan

desde el almacén al punto de venta, alrededor de un 0,2 %, pero tienen un gran efecto multiplicador porque con un fruto que se agriete hay que desechar el envase en el que va, normalmente tarrinas de 250 a 500 g que contienen alrededor de 13-15 y 26-30 frutos respectivamente, con lo que del 2,8 al 5,6 % de los frutos embalados ya se desechan, elevando el porcentaje total de frutos agrietados entre el 6 y el 10 % de la cosecha. A esa merma importante de la cosecha hay que añadir que los envases puestos a la venta con algún fruto agrietado tienen un efecto muy pernicioso en el consumidor, que ve tarrinas con frutos agrietados (Figura 1.1) y, además de no comprarlas, percibe una falta de calidad en la marca comercializadora.



Figura 1.1:
Fotografía de un envasado comercial de tomate *cherry* en el que aparece un fruto agrietado con crecimiento fúngico

Tipos de agrietado

Se han descrito numerosos tipos de agrietado del fruto atendiendo a la forma, tamaño o localización de la fractura, pero se considera que existen tres tipos principales: dos que hacen referencia a la forma en que se extienden las grietas en el fruto, agrietado radial y concéntrico, y un tercero que incide en el lugar donde se produce la grieta, el agrietado cuticular.

El agrietado radial hace referencia a la formación de una a pocas fracturas que se extienden a lo largo del eje longitudinal del fruto comenzando, en la mayoría de los casos, en la zona de inserción del pedicelo (Figura 1.2). Estas fracturas profundizan a las capas subepidérmicas y pueden llegar a abarcar la longitud total del fruto (Frazier y Bowers, 1947). Como agrietado concéntrico se identifica aquel en el

que las fracturas son paralelas al ecuador del fruto. Suelen localizarse en la zona de inserción del pedicelo y su tamaño es variable, no estando clara en algunos casos la distinción con el agrietado cuticular si la severidad de las fracturas es pequeña. Esto lleva a que algunos autores incluyan bajo esta denominación todo agrietado que no sea radial, aunque la dirección de la fractura no sea totalmente paralela (Frazier y Bowers, 1947). El agrietado cuticular consiste en la aparición de numerosas grietas de pequeño tamaño (1-2 mm aproximadamente) que se restringen a la piel y que pueden llegar a suberificar (Young, 1947). Este tipo de agrietado aparece descrito bajo diversos términos en la literatura científica. Así, “*cuticle cracking*”, “*rain check*”, “*russeting*”, “*crazing*”, “*small cracking*”, “*shrink cracking*”, “*hair cracking*” y “*cuticle blotch*” hacen referencia a un mismo fenómeno (Emmons y Scott, 1996). El agrietado radial sería más frecuente que el concéntrico y ambos aparecerían en mayor grado en las primeras semanas de recolección disminuyendo al avanzar ésta.



Figura 2.1: Frutos de Gardeners Delight en los que se observan grietas del tipo radial.

Evaluación del agrietado

Un problema inherente al estudio del agrietado es el carácter aleatorio de su aparición probablemente causado por el elevado número de factores que parecen influir en ella. Existen diversos métodos que han intentado provocar artificialmente el agrietado de los frutos y discernir así qué frutos eran propensos a desarrollar fracturas y cuales no, permitiendo evaluar cultivares o frutos desarrollados en distintas condiciones ambientales. El más empleado es la inmersión de los frutos en agua durante un tiempo controlado. Originalmente se sometían los frutos a un vacío hasta que dejaban de salir burbujas por la cicatriz pedicular para después reducir el vacío a presión normal y dejar los frutos durante tres horas a 20°C. El método clasificaba mejor los frutos con poca tendencia a agrietarse que los que tenían alta tendencia y demostró que servía tanto para el agrietado tipo radial como para el tipo concéntrico (Thompson, 1965; Armstrong y Thompson, 1969). Este método ha sufrido numerosas variaciones pero se ha mostrado como una herramienta válida para estimar la potencial susceptibilidad al agrietado de frutos tipo cereza que, debido a su menor tamaño, permiten la evaluación de un gran número de frutos en cada ensayo. Otros autores lo han empleado para evaluar diferencias en la tasa de agrietado inducido en función del tipo de solución que emplean para la inmersión, encontrando diferencias entre soluciones con diversas combinaciones de quelantes, iones de calcio o distinto pH (Lichter y col., 2002).

No obstante, aunque la metodología del agrietado artificial parece probada, es necesario relacionar el agrietado en las condiciones experimentales estudiadas del cultivo y el agrietado inducido en el cultivar o cultivares con los que se trabaje.

Factores que influyen en el agrietado

Como principales factores inductores del agrietado del tomate, para cualquier tipo de agrietado, suelen citarse la irregularidad en el suministro hídrico, sobre todo cuando las plantas pasan de estar en un sustrato muy seco a un sustrato muy húmedo, la temperatura y la radiación luminosa elevadas, las humedades relativas altas, las oscilaciones térmicas pronunciadas entre el día y la noche, y la susceptibilidad varietal (Peet, 1992). Aunque estas generalidades han sido ampliamente comprobadas en frutos de tamaño normal (Cortés y col., 1983), existen trabajos que proponen que se podrían extender a tomates tipo cereza (Maroto y col., 1995b), si bien en estos tipos de tomate, por su carácter de productos demandados por su calidad, el perjuicio económico sería mayor. Finalmente, el agrietado se produce en pericarpio del fruto por lo que, obviamente, debe estudiarse en profundidad junto con los factores ambientales.

Efecto del genotipo

Se ha demostrado que la susceptibilidad al agrietado del fruto de tomate se debe tanto a causas genéticas (Cuartero, 1981) como a factores ambientales (Young, 1947; Emmons y Scott, 1997) y que cultivares con diferente susceptibilidad al agrietado mostraron diferencias en cuanto a la interacción con las condiciones climáticas (Armstrong y Thompson, 1967). Distintos autores consideran que la resistencia al agrietado es un carácter cuantitativo controlado por algunos (carácter oligogénico) a muchos factores genéticos aditivos (carácter poligénico). La aditividad es el parámetro más importante, pero también se observa dominancia al presentar las generaciones segregantes cierto desplazamiento hacia el parental resistente; la expresión de la dominancia depende de las condiciones ambientales y podría llegar a explicar alrededor de un 45% de la variación en susceptibilidad de las progenies en cruces F1, F2 y retrocruces (Armstrong y Thompson, 1967; Hernández y Nassar, 1970). Reynard (1951) propone que la resistencia al agrietado radial es recesiva, pues la F1 era susceptible a este tipo de agrietado. En sus trabajos no observó agrietado concéntrico, sin embargo otros autores establecen una relación entre el agrietado radial y el concéntrico (Cortés y col., 1983). Ambos tipos de

agrietado estarían controlados por dos sistemas genéticos parcialmente diferentes que se mantendrían durante todo el cultivo.

El carácter recesivo de la resistencia al agrietado radial es la principal diferencia en cuanto a la heredabilidad respecto al agrietado cuticular, donde la resistencia sería dominante; en ambos tipos de agrietado, los factores genéticos aditivos serían más importantes, al tiempo que los efectos ambientales influirían sobre la manifestación del carácter (Emmons y Scott, 1998b).

La variable “cultivar” debe por tanto tenerse en cuenta cuando se intenta profundizar en el fenómeno del agrietado. En la presente Memoria no se analiza la genética del agrietado, pero sí es necesario caracterizar adecuadamente los cultivares sobre los que se experimentarán distintas variables.

Efecto del ambiente

En numerosos trabajos, la lluvia y las altas temperaturas han sido asociadas con la aparición de agrietado en los frutos de tomate (Young, 1947; Reynard, 1951; Emmons y Scott, 1997) así como en otras especies como manzanas (Opara y col., 1997) y cerezas (Andersen y Richardson, 1982). En general, los distintos autores coinciden en que la aparición de agrietado es más frecuente si a un periodo de cultivo en condiciones normales o secas le sigue un aporte extraordinario de agua en forma de lluvia, pero aparecen contradicciones en cuanto a qué es más importante, si el número de eventos de lluvia o la cantidad total de lluvia caída. En condiciones normales o secas, los frutos cargados con una elevada concentración de solutos serían sumideros para el agua tomada por las raíces, con lo que incrementarían de forma rápida su volumen y presión, causando su agrietado (Frazier y Bowers, 1947). En los cultivos protegidos, como el cultivo de tomate en invernadero, sería un régimen de riegos irregular o un riego copioso después de un periodo seco lo que favorecería el que los frutos se agrietasen (Maroto y col., 1995b).

Por el contrario, otros autores apuntan a que el agua que causa el incremento en volumen del fruto no sería tomada por las raíces, sino adsorbida en la piel del fruto e impulsada a su interior por la concentración de osmolitos; ello llevaría a una expansión de las células del pericarpo subyacentes causando una extensión de la piel

superior a su límite de extensión máxima (Andersen y Richardson, 1982; Ohta y col., 1997; Aloni y col., 1998).

Existe también un elevado número de trabajos que apuntan a que unas condiciones de elevada humedad ambiental, como la que se alcanza en los invernaderos durante la noche o durante todo el día en periodos de lluvias o nieblas, podría asociarse con el incremento en la incidencia de agrietado en frutos de tomate. Estos autores proponen que en esta situación de alta humedad relativa la transpiración foliar se reduciría y el flujo de agua y solutos se dirigiría hacia los frutos, aumentando su presión interna y comprometiendo de este modo la integridad de la piel (Aloni y col., 1998; Li y col., 2002). Esta hipótesis explicaría el hecho de que un alto porcentaje del agrietado se produce en las primeras horas de la mañana, cuando el estado de hidratación de la planta es óptimo, de igual forma que la reducción del número de frutos agrietados observada cuando se disminuye la humedad relativa nocturna mediante ventilación o se aumenta la transpiración foliar (Ohta y col., 1991). Sin embargo, sus conclusiones podrían verse alteradas si se tiene presente que la alta humedad relativa puede provocar una condensación de agua en la superficie del fruto y que pudiera ser esta agua depositada en contacto con la superficie del fruto la que tuviese relación con el agrietado (Maroto y col., 1995a).

En cualquier caso parece evidente que el balance hídrico de la planta y de los tejidos internos del fruto es determinante para que un fruto sea propenso a agrietarse y, por tanto, aquellas prácticas culturales que afecten este estado hídrico podrían influir en la mayor o menor incidencia de agrietado. Ehret y col. (1993) y Aalbersberg y Stolk (1994) han correlacionado la poda de frutos, especialmente hacia el final del periodo de producción, y el despunte del tallo principal con mayores tasas de agrietado; también determinaron que otras prácticas, como el deshojado, no tuvieron efectos significativos sobre la incidencia del agrietado. Estos resultados en ocasiones son contradictorios, pudiendo depender del cultivar empleado. Si bien otros autores no pudieron encontrar diferencias significativas en la incidencia de agrietado mediante la poda de frutos, aunque sí ligeras tendencias en este sentido, sí coinciden en relacionarlo con la habilidad de la planta para redirigir los flujos de agua y solutos hacia los restantes frutos (Emmons y Scott, 1996). Estos frutos podrían experimentar un incremento en su tasa de crecimiento al disponer de

una mayor cantidad de agua, lo que se ha relacionado con un incremento en el agrietado especialmente al final del desarrollo (Bakker, 1988; Peet y Willits, 1995). Este incremento de la tasa de crecimiento, además de por una mayor toma de agua, también podría estar causado por un mayor aporte de nutrientes (Ohta y col., 1993).

Son escasos los trabajos que determinan la relación entre el exceso de abonado y un incremento en la susceptibilidad al agrietado. Sin embargo, estos trabajos coinciden con numerosas observaciones hechas por agricultores y técnicos agrícolas (Ehret *et al*, 1993; Ohta y col., 1993, 1994; Flowers y col., 2003). El efecto de un elevado aporte de nutrientes podría estar relacionado con un incremento en la tasa de crecimiento de los frutos (Bakker, 1988) y con el desarrollo de frutos que presentaron menor firmeza de la pulpa y, en menor medida, de la piel, si bien parece ser menos significativo en variedades muy susceptibles al agrietado. Esta característica se correlaciona con un potencial hídrico mayor, de forma que la absorción de una pequeña cantidad de agua llevaría al fruto a agrietarse. Recomiendan, por tanto, reducir la irrigación en el invernadero cuando aparezca un evento de agrietado importante (Peet y Willits, 1995; Guichard y col., 2001; Li y col., 2001).

Otra característica de la solución de riego, como es la presencia de determinados tipos de sales, aparece muy relacionada con la aparición de agrietado en los frutos (Flores y col., 2003). Así, según Ehret y Helmer (1995) y Chretien y col. (2000), una elevada conductividad eléctrica en la solución de riego ayuda a incrementar la calidad de los frutos de tomate reduciendo la incidencia de agrietado. Similares resultados se han descrito para sustratos con elevado potencial matricial (Pascual y col., 1998) en los que se registraron menores tasa de agrietado en los frutos. Sin embargo, la incidencia del agrietado puede incrementarse significativamente si a un tratamiento salino moderado le sigue un riego con baja conductividad, estando este incremento condicionado por la condiciones de transpiración y demanda hídrica de las plantas (Li y col., 2001, 2002).

Para el calcio tomado desde la solución nutritiva no ha sido descrito un efecto sobre el agrietado de los frutos. Sin embargo, sí se conoce su papel importante en la disminución del agrietado cuando se emplea pulverizado como aerosol directamente sobre los frutos de diversas especies como cereza y manzana (Yamamoto y col.,

1992; Brown y col., 1995, 1996). De igual modo se ha constatado la reducción del número de frutos agrietados mediante inmersión si en la solución se añaden sales de calcio. El efecto contrario, incrementar el agrietado, se obtuvo si se empleaban agentes quelantes de calcio en las soluciones de inmersión para frutos de tomate (Lichter y col., 2002) y de cereza (Glenn y col., 1989). La mayoría de autores coinciden en señalar como posible papel del calcio en el agrietado un incremento en la estabilidad de las paredes celulares en el pericarpo mediante la estabilización de las pectinas, aunque no está claro si el calcio aplicado como aerosol o desde la solución de inmersión penetraría hasta las paredes celulares con suficiente eficiencia o si, por el contrario, actuaría como osmolito en la superficie del fruto disminuyendo la diferencia de potencial entre en agua de la superficie del fruto y el interior celular, reduciendo la difusión de ésta al interior. Parece apoyar la primera hipótesis el que se hayan descrito diferencias en cuanto al contenido en calcio y pectinas totales en las paredes celulares del pericarpo de variedades con diferente grado de susceptibilidad al agrietado en frutos de litchi (Hasan y Chattopadhyay, 1996) y cereza (Lane y col., 2000).

Desde los primeros trabajos sobre agrietado se había descrito la coincidencia de elevadas tasas de agrietado con altas temperaturas (Young, 1947), observación repetidas veces apuntada por diversos autores pero que no cuenta con una explicación consistente de la influencia de las altas temperaturas. Algunos autores han sugerido la posibilidad de que actúe sobre el proceso de senescencia de los frutos, acelerando la degradación de las paredes celulares, pues observaron que la temperatura tenía un mayor efecto sobre los frutos más maduros (Frazier y Bowers, 1947). Otros, sin embargo, la asocian a la exposición de los frutos a la luz directa del sol y a incrementos de irradiancia, que influirían sobre el contenido en solutos del fruto y, por tanto, sobre la capacidad de los frutos para importar agua de otras partes de la planta (Ehret y col., 1993; Emmons y Scott, 1996, 1997). Por último hay algún autor que lo relaciona con cambios en la tasa de crecimiento del fruto o con la expansión de los gases internos del fruto (Peet, 1992).

Después de siete décadas de investigación sobre el agrietado en tomate aún no se ha consensado un modelo que integre todos los factores que parecen influir en el proceso. Por una parte, el agrietado dependiente de presión es defendido por

numerosos autores tomando como principal referente el trabajo de Considine y Kridmann (1972) donde establecen una relación entre el porcentaje de frutos de uva que se agrietan y la presión de turgencia mediante la inmersión de los frutos en soluciones de potencial osmótico creciente. Así, distintos factores ambientales y las prácticas culturales podrían llevar al fruto a experimentar un incremento significativo de la presión interna lo que provocaría la ruptura de la piel. El aumento de la temperatura también aumentaría la presión interna al provocar dilataciones. Por otro lado, en un posible modelo integrador no puede faltar el otro elemento que participa en el proceso de agrietado, la piel, pues es esta compleja estructura la que en último término sufre la formación de la fractura, por lo que son muchos autores los que han sugerido la importancia de la piel (Peet, 1992; Ohta y col., 1997; Aloni y col., 1998).

Efecto de la piel del fruto

El papel de la piel en el proceso de agrietado se ha relacionado con el tipo de grietas, respondiendo la dirección de las grietas a la extensión de la piel por el hinchamiento asociado al incremento en el diámetro ecuatorial, en el caso del agrietado tipo radial, frente al incremento en el diámetro polar, para el agrietado tipo concéntrico (Young, 1947). Otros estudios, sin embargo, dan un papel más relevante a la piel ya que consideran que es el componente singular más importante en cuanto al esfuerzo mecánico. Actuaría como una membrana que rodea una masa de material mucho más deformable y sería donde las grietas se inician, extendiéndose luego hacia la parte interna del mesocarpo. Se relaciona así la solidez de la piel con la susceptibilidad al agrietado (Miles y col., 1969; Voisey y col., 1970).

Para comprender el papel de la piel en el agrietado es necesario conocer el papel que pueden jugar cada uno de sus componentes, de ahí que sea necesario estudiar en detalle la histología de la piel del fruto.

Tejidos del fruto: su papel en el agrietado

El fruto de tomate tipo cereza es una baya por lo general bilocular, aunque en ocasiones puede ser trilocular, que se desarrolla a partir de un ovario de unos 5-10 mg y alcanza un peso final en la madurez que oscila entre algo menos de 10 g hasta poco más de 30 g, en función del cultivar y de las condiciones de desarrollo. El fruto desarrollado está constituido, básicamente, por el pericarpo, el tejido placentario y las semillas. El pericarpo lo componen la pared externa, las paredes radiales o septos que separan los lóculos y la pared interna o columela. El pericarpo se origina de la pared del ovario y consta de un exocarpo o piel, un mesocarpo parenquimático con haces vasculares y el endocarpo constituido por una capa unicelular que rodea los lóculos. El mesocarpo de la pared externa está compuesto principalmente por células parenquimatosas, que son mayores en la región central y disminuyen junto a la epidermis y los lóculos (Chamarro, 1995).

Pericarpo

De las distintas partes que componen la estructura de un fruto de tomate ha sido el pericarpo la que ha sido objeto de mayor estudio por diversos autores ya que la presión de los lóculos no se ha podido correlacionar directamente con la aparición de fracturas en el fruto (Almedia y Huber, 2001).

En estudios con diversos cultivares de pimiento, Aloni y col. (1998) observaron que aquellos con un grosor de pericarpo mayor fueron más susceptibles al agrietado, relacionándose el mayor agrietado con la mayor presión de turgencia al existir un mayor número de células por área de cutícula. Las fracturas observadas se produjeron sobre las células epidérmicas, la zona de menor espesor de cutícula, y no sobre las intercepciones de células adyacentes. Sus observaciones indican que la formación de grietas se produce por una extensión de la cutícula causada por una expansión de las células epidérmicas subyacentes al incrementar su turgencia.

En tomate, objeto de estudio de la presente Memoria, no hay referencias que indiquen un papel relevante de las células parenquimatosas del mesocarpo en el agrietado, apuntándose sin embargo a los distintos componentes del exocarpo (cutícula, epidermis y colénquima) como tejidos que muestran diferencias entre

variedades de distinto grado de susceptibilidad que podrían explicar, al menos en parte, los distintos grados de susceptibilidad al agrietado (Cotner y col., 1969).

Exocarpo

La piel o exocarpo consta de la capa epidérmica externa, sin estomas y prácticamente sin almidón, y de dos a cuatro capas de células hipodérmicas de pared gruesa con engrosamientos de tipo colenquimatoso. La epidermis está cubierta por una fina cutícula que se engrosa a medida que se desarrolla el fruto (Figura 1.3). La cutícula (terminología de Holloway, 1982a; Jeffree, 1996) consta de dos regiones: una capa de cutina que cubre las células epidérmicas y una pared celular cutinizada (Wilson y Sterling, 1976).

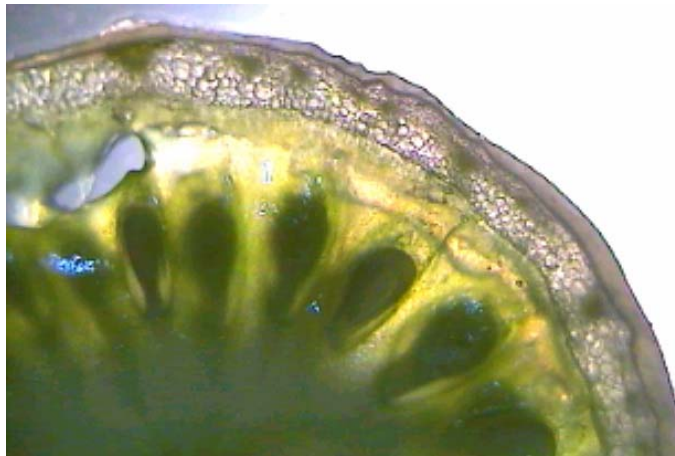


Figura 1.3: Corte transversal de un fruto en el que se aprecia la distribución de los tejidos internos.

Diversos estudios sobre frutos de tomate revelan que existen diferencias morfológicas entre variedades que se podrían correlacionar con la mayor o menor susceptibilidad al agrietado. De entre las características que se resaltan se encuentran la forma de las células epidérmicas, la relación entre la anchura de estas células y el grosor del epicarpo (pared celular cutinizada de la capa más externa de células epidérmicas), grosor y grado de penetración de la pared cutinizada entre y bajo las capas de células epidérmicas y la presencia o no de hipodermis (Cotner y col., 1969; Chu y Thompson, 1972). Los cultivares más resistentes suelen mostrar un grosor del epicarpo significativamente superior al de los cultivares susceptibles. Las grietas se producirían perpendiculares a la dirección de elongación de la capa epidérmica externa en las zonas sobre los espacios intercelulares, al contrario de lo que observaron Aloni y col. (1998) en pimiento. Además, los cultivares más susceptibles serían aquellos que presentan células alargadas (Emmons y Scott, 1998a).

Estas diferencias histológicas observadas entre variedades susceptibles y resistentes han sido correlacionadas con la resistencia mecánica a la punción (Pagalda y Ruiz, 1983), que a su vez se relaciona con las propiedades mecánicas de los distintos tejidos que conforman el fruto, de entre los que la piel sería el componente más determinante (Miles y col., 1969). Los tomates más resistentes presentaron valores más elevados de los parámetros mecánicos relacionados con la resistencia del tejido como la elasticidad del fruto, dureza de la piel y firmeza del pericarpo, indicando que la susceptibilidad al daño mecánico estaría asociada a solidez de la piel del fruto de tomate y a la firmeza de los tejidos subyacentes (Desmet y col., 2002).

Las paredes de las células epidérmicas y subepidérmicas están en tensión cuando el órgano vegetal está turgente y de la relación entre la resistencia del tejido y la presión ejercida desde el interior, resulta el equilibrio en el crecimiento del fruto (Kutschera, 1989; Niklas y Paolillo, 1997, 1998; Thompson, 2001) siendo máximas estas fuerzas y máximas las deformaciones que ocasionan en la superficie del fruto, esto es, en la cutícula (Considine y Brown, 1981). Estos resultados apoyan las observaciones que indican que las grietas se iniciarían en la parte externa de la cutícula y que posteriormente podrían evolucionar hacia zonas más internas de la cutícula y capas de células epidérmicas y subepidérmicas, desplazándose entre células adyacentes (Emmons y Scott, 1998a; Maguire y col., 1999). Los estudios que intentan reproducir estas fuerzas de tensión en la piel del fruto de tomate aportan conclusiones similares sobre la relación entre las propiedades mecánicas de los tejidos y las características histológicas del tejido, destacando el grado de cutinización de la pared celular de las células epidérmicas y la forma y tamaño de dichas células (Hankinson y Rao, 1979). Sin embargo, se plantean contradicciones con respecto al sentido en el que actuarían caracteres como el grosor de la cutícula (Voisey y col., 1970), o qué parámetros mecánicos serían los más adecuados para correlacionarlos con la susceptibilidad al agrietado. En este sentido, algunos autores consideran la fuerza de fractura y la elongación como los mejores parámetros para caracterizar la resistencia del tejido (Batal y col., 1970), mientras que otros también incluyen el módulo de elasticidad en esta caracterización (Hershko y col., 1994).

El agrietado de los frutos de tomate aparece en momentos concretos del desarrollo del fruto, que coinciden con el inicio de la maduración, y que podría ser debido a cambios en las propiedades mecánicas de los tejidos durante la maduración del fruto (Thiagu y col., 1993). Las paredes celulares, al igual que otras estructuras relacionadas con la integridad del fruto, sufren cambios durante el crecimiento y la maduración que podrían estar relacionados con la pérdida de firmeza y la susceptibilidad al agrietado. En los frutos que mostraron una elevada firmeza y resistencia se observaron elevados niveles de pectinas en la paredes del pericarpo (Hamson, 1952) aunque estudios posteriores restan importancia a la actividad pectinesterasa frente a la acción de enzimas como la polygalacturonasa (Hobson, 1965). Mediante la comparación de distintas variedades de tomate, y empleando dos métodos de compresión diferentes, Hobson (1965) determinó que la firmeza de algunas variedades se correlacionaba con su contenido/actividad en poligalacturonasa, revelando un papel importante de esta actividad enzimática en el proceso de degradación de las pectinas y los cambios en firmeza del fruto. La alteración de otras actividades enzimáticas relacionadas con la estabilidad de la pared celular parece estar correlacionada con una alteración de la histología de la epidermis, un engrosamiento de la cutícula y un incremento en la susceptibilidad al agrietado en plantas transformadas de tomate (Moctezuma y col., 2003).

Al igual que por los procesos de maduración, las propiedades mecánicas de estas estructuras pueden verse afectadas por la temperatura, la presencia de agua libre y otros factores ambientales (Cotner y col., 1969; Sekse, 1995). Distintos estudios han demostrado que la presencia de agua afecta a las propiedades mecánicas de la epidermis, reduciendo su resistencia así como incrementando su capacidad de extensión (Murase y Merva, 1977; Matthews y col., 1987; Hole y col., 2000).

A pesar de que el papel de la epidermis como un factor importante en la susceptibilidad al agrietado ha sido propuesto por numerosos autores, y que diversos estudios revelan cómo la capacidad mecánica de este tejido puede verse alterada por la maduración del fruto o por factores ambientales relacionados con el agrietado, aún hoy no está claro qué características se podrían asociar con la susceptibilidad y cómo esas características explicarían las diferencias en cuanto a sus propiedades mecánicas. Así mismo, queda por dilucidar qué papel juegan las estructuras

principales que componen la epidermis esto es, paredes celulares, material cutinizado y cutina, en la resistencia a la tensión y en la formación de las fracturas. De ahí que uno de nuestros objetivos específicos sea la puesta a punto de una metodología que permita estudiar las propiedades mecánicas de la epidermis de fruto de tomate en condiciones semejantes a las presentadas *in vivo* y, de esta forma, poder comparar el comportamiento mecánico de varios cultivares de distinta susceptibilidad al agrietado y determinar la contribución de los diferentes componentes que constituyen el pericarpo (cutícula, epidermis y colénquima) en la capacidad de la piel del fruto a resistir una rotura por tensión.

En numerosos artículos donde se investiga la fisiopatía del agrietado del tomate, y de otras especies, se discute sobre el posible e importante papel que podría desempeñar una de las partes del exocarpo, la cutícula del fruto, y de cómo las propiedades mecánicas de ésta podrían determinar la susceptibilidad al agrietado (Chu y Thompson, 1972; Huang y col., 1999). De los tres tejidos que componen el exocarpo, la cutícula ha sido escasamente tenida en consideración en cuanto a la resistencia mecánica de la piel y a su implicación en procesos de crecimiento y desarrollo del fruto (Thompson y col., 1998; Andrews y col., 2002). Sin embargo, otros autores han apuntado a la cutícula como una estructura que soportaría las máximas deformaciones y esfuerzos en órganos vegetales en crecimiento, como los frutos, o que soportan movimiento, caso de los tallos, al ser el tejido más exterior (Considine y Brown, 1981; Niklas y Paolillo, 1997).

La cutícula

La cutícula vegetal es consecuencia de la evolución química y biológica de las plantas superiores que han desarrollado una serie de estructuras de naturaleza polimérica que las aíslan y protegen del medio externo que les rodea. En las partes aéreas y frutos de las plantas superiores dicha función protectora es llevada a cabo por la denominada cutícula vegetal o cutícula. Desde un punto de vista morfológico, siguiendo un corte transversal, la cutícula cubre la pared celular más externa de las células epidérmicas. En algunas especies la pectina de la lamela subcuticular constituye una capa entre la pared celular y la cutícula. Esta capa puede ser degradada química o enzimáticamente, permitiéndose de este modo el aislamiento de la cutícula. La Figura 1.4 representa un esquema del corte transversal de una cutícula

donde pueden diferenciarse los distintos componentes básicos de la cutícula: ceras epi- e intracuticulares y cutina.

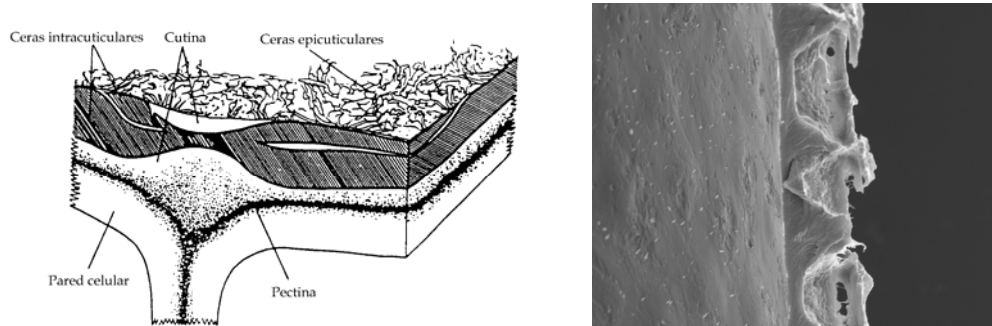


Figura 1.4: Esquema de un corte transversal de una cutícula vegetal mostrando los principales componentes que la constituyen (Izquierda) tomado de Bukovac y col., (1981). Imagen de microscopía electrónica de barrido mostrando una sección transversal de la cutícula aislada de fruto de tomate y la superficie externa de la misma (Derecha).

Durante los últimos veinte años el conocimiento acerca de las funciones y propiedades de la cutícula vegetal ha progresado notablemente pudiendo establecerse, de un modo resumido, las siguientes funciones fisiológicas para la cutícula (Heredia y col., 1998):

- ✓ Reducir la pérdida incontrolada de agua y solutos. La cutícula actúa como una membrana de disolución-difusión en la que la permeabilidad de un compuesto a través de la cutícula dependerá de su solubilidad y movilidad en la membrana.
- ✓ Constituir una barrera mecánica que impida la penetración de las hifas de hongos y el ataque de insectos. Las cutículas más gruesas, en general, son más resistentes a la penetración de hongos o al ataque de insectos.
- ✓ Proteger los tejidos de posibles daños mecánicos producidos por el viento, lluvia y micropartículas.
- ✓ Reflejar y atenuar la radiación ultravioleta.

Estructura y composición

El grosor de la cutícula de hojas varía entre 0.25 y 2 μm , mientras que el rango para la cutícula de frutos es 10 veces superior. En peso, de un modo general, la cutícula varía entre 20 y más de 2000 $\mu\text{g cm}^{-2}$. No obstante, el grosor de la cutícula no es constante sobre toda la superficie vegetal y suele ser más delgada sobre las

paredes periclinales externas de las células epidérmicas proyectándose a menudo entre las paredes anticlinales de dichas células. En algunos casos, la cutícula desarrollada en frutos maduros puede ser tan extensa que las células epidérmicas y algunas subyacentes queden incrustadas en el polímero matriz (Esau, 1977; Holloway, 1982b).

El componente básico de la cutícula es la cutina, un éster de ácidos grasos hidroxilados de cadena larga (Holloway, 1982b). Asociadas a la cutina se encuentran las ceras o lípidos cuticulares solubles; éstas se presentan embebidas dentro de la matriz cuticular, ceras intracuticulares, o depositadas sobre la superficie más externa de la cutícula, ceras epicuticulares. Por otro lado, la cutícula también contiene una serie de componentes no lipídicos tales como polisacáridos (celulosa y pectina principalmente), polipéptidos y compuestos fenólicos (Hunt y Baker, 1980; Kolattukudy, 1981; Baker y col., 1982; Holloway, 1982a). De esta forma, la cutícula vegetal puede ser considerada como un complejo poliéster con ceras asociadas, de naturaleza hidrofóbica y muy escasa reactividad, dado que la mayoría de los grupos carboxílicos presentes en la membrana están esterificados con grupos hidroxilos alifáticos de otros ácidos grasos (Kolattukudy, 1981).

La cutina está constituida por ácidos grasos hidroxilados primarios y secundarios de cadena larga, principalmente de 16 y 18 átomos de carbono, los cuales se encuentran formando enlaces tipo éster entre sí (Baker y col., 1962; Holloway, 1982a). La mayoría de las cutinas están formadas casi exclusivamente por ácidos grasos pertenecientes a la familia C_{16} en la cual el ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico, y su isómero posicional 9,16-dihidroxihexadecanoico, constituyen los principales componentes. Sólo una pequeña fracción de las cutinas investigadas están formadas por ácidos grasos pertenecientes a la familia C_{18} , entre ellos los ácidos 9,10-epoxi-18-hidroxi-octadecanoico y 9,10,18-trihidroxi-octadecanoico son los más abundantes, aunque algunos derivados insaturados pueden estar presentes como componentes minoritarios de algunas cutinas (Heredia, 2003).

Un aspecto importante radica en el hecho de que las cutinas obtenidas a partir de membranas cuticulares asiladas pueden presentar, en mayor o menor proporción, compuestos de naturaleza no lipídica tales como fenoles libres, flavonoides, taninos y

polisacáridos. El modo de incorporación y el papel fisiológico de estos compuestos en la cutícula vegetal queda aún por ser aclarado definitivamente. Desde un punto de vista meramente operativo, el conjunto de compuestos químicos anteriormente citado se denomina compuestos hidrolizables, dado que son extraídos de las membranas cuticulares aisladas tras un exhaustivo reflujo a alta temperatura en medio fuertemente ácido (Riederer y Schönherr, 1984). La proporción de estos compuestos hidrolizables es muy variable y depende, principalmente, de la naturaleza y del estadio de desarrollo de la especie investigada (Baker y col., 1982).

Desde un punto de vista químico, las ceras cuticulares son una mezcla compleja de diversos tipos de compuestos alifáticos donde cada uno de ellos puede contener varias series homólogas de compuestos (Hamilton, 1996). La cantidad de ceras presente en diversas cutículas vegetales suele ser pequeña, aunque los distintos componentes presentes en las ceras cuticulares son muy amplios.

A partir de estudios morfológicos y ultraestructurales realizados en especies vegetales muy concretas, se ha observado que durante el desarrollo de los frutos tiene lugar una rápida deposición de ceras y cutina en la cutícula y cuando el fruto alcanza la madurez, la deposición de los distintos componentes cuticulares es baja y desigual para los distintos componentes (Martin y Juniper, 1970). En cualquier caso, la síntesis de material cuticular en hojas y frutos está irreversiblemente asociada al crecimiento activo de los tejidos vegetales. En este sentido, la bibliografía consultada recoge el trabajo llevado a cabo por Baker y col. (1982) sobre los distintos componentes que forman parte de la cutícula de frutos de tomate en distintos estadios de crecimiento del mismo. En dicho trabajo se observó que en frutos inmaduros la cutina constituye el 52% del total de la cutícula, mientras que un 32% lo constituye la denominada fracción de compuestos hidrolizables, siendo el resto, más de un 12%, ceras cuticulares. Sin embargo, en frutos maduros, la cutina llega a constituir cerca del 80% del total de la cutícula mientras que los compuestos hidrolizables sólo constituyen algo más de un 9% de la misma. Además las ceras cuticulares también disminuyen drásticamente su contenido pasando a ser menos del 5% del total.

Propiedades hidrodinámicas

La cutícula minimiza la pérdida pasiva de agua desde la planta a la atmósfera y disminuye la extrusión de iones orgánicos por causa de la lluvia (Tukey, 1979; Schönherr, 1982). La baja permeabilidad de la cutícula a ambos, agua e iones, es un prerrequisito para la existencia del transporte apoplástico y, de esta forma, para el desarrollo terrestre de las plantas.

La cutícula actúa como barrera pero, no obstante, no es absolutamente impermeable al agua y, bajo ciertas circunstancias, no puede prevenir la desecación de la planta o la entrada de agua desde el exterior. La cutícula es una membrana permeable tanto a compuestos polares como no polares, donde las ceras juegan un papel clave en la reducción de la permeabilidad. Especialmente las ceras epicuticulares que, además, determinan la capacidad de la superficie para mojarse (Bukovac y col., 1981).

En relación al agrietado de los frutos, Aloni y col. (1998) observan diferencias en cuanto a las tasas de transpiración cuticular entre los cultivares susceptibles y los resistentes al agrietado del fruto en variedades de pimiento. Similares resultados se han postulado para el agrietado de cerezas, donde la morfología y composición química de la superficie (ceras epicuticulares) determinaría la capacidad de la superficie para mojarse y la retención de agua, condicionando así la permeabilidad del agua a través de la cutícula y siendo un factor diferenciador de la susceptibilidad al agrietado (Bukovac y col., 1999).

Propiedades térmicas

Aunque altas temperaturas han sido repetidas veces correlacionadas con un incremento en el agrietado, no se han elaborado hipótesis concretas sobre el mecanismo de acción en el fruto. Se conoce que la temperatura afecta a las propiedades de un material influyendo directamente sobre su módulo elástico. No se conocen trabajos que estudien el efecto de la temperatura sobre las propiedades mecánicas de las cutículas aisladas, aunque sí sobre otras propiedades físicas como la permeabilidad (Buchholz y Schönherr, 2000). Muy pocos trabajos han centrado su atención en los cambios debidos a la temperatura de las propiedades de la cutícula y de su interacción con el agua que contiene. El estudio de la variación de las

propiedades físicas de las moléculas de elevado peso molecular y de los polímeros con la temperatura merece especial atención.

Lendzian y Kerstiens (1991) indicaron que la existencia de un estado vítreo en la cutina dependería probablemente de la temperatura y del contenido de agua de la misma: la cutícula en condiciones anhidras es relativamente rígida, mientras que mojada tiene un aspecto más blando. Estos autores llevaron a cabo una estimación de la temperatura de transición vítrea de la cutina de frutos de tomate a partir de un método teórico desarrollado por Hopfinger y col. (1988), llegando a la conclusión de que esta cutina debe tener una T_g comprendida entre -70° y -10°C .

Schreiber y Schönherr (1990) estudiaron las transiciones de fase y los coeficientes de expansión térmica de cutículas aisladas de diversas especies vegetales inducidas por la temperatura. Todas las cutículas estudiadas presentaron transiciones de fase de segundo orden, no asignadas en principio a transiciones vítreas, en un rango de temperatura que va desde 38°C (en hojas de *Nerium* L.) hasta 55°C (en hojas de *Olea* L.). Estos autores concluyeron que los coeficientes de expansión térmica y las transiciones de fase eran debidos al polímero matriz (residuo que queda tras la extracción de las ceras cuticulares a la cutícula) más que a la cutina. Adicionalmente, estos autores apuntaron que el incremento en la permeabilidad al agua de la cutícula por encima de la temperatura de transición de fase, observado experimentalmente, era debido a un incremento en el desorden de la interfase existente entre el polímero matriz y las ceras cuticulares.

Luque y Heredia (1994, 1997) estudian, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC en sus siglas en inglés), las transiciones de fase que caracterizan a las membranas cuticulares aisladas de frutos de tomate. Estos autores observaron que la cutícula de dichos frutos presentaba una temperatura de transición vítrea, T_g , alrededor de -30°C . Recientemente, Casado y Heredia (2001) pusieron a punto un método basado en el análisis del calor específico mediante DSC que ha permitido conocer el comportamiento térmico de los componentes de la cutícula con mayor detalle.

Propiedades mecánicas

En los últimos años una nueva función de la cutícula vegetal empieza a ser reconocida entre los diversos autores. La cutícula podría servir como un soporte estructural con capacidad mecánica para resistir fuerzas de deformación, principalmente de tensión, en órganos vegetales carentes de otras estructuras más resistentes como ciertos frutos globosos (Wiedemann y Neinhuis, 1998), entre los que el tomate, la uva y la cereza serían algunos ejemplos, así como en estructuras especializadas con requerimientos muy específicos de elasticidad, como es el caso de los movimientos tigmotónicos de los filamentos estaminales de las flores de *Cirsium horridulum* Michx. (Marga y col., 2001).

Las propiedades mecánicas de un tejido dependerán, entre otros factores, de la composición así como de las relaciones moleculares que se establezcan entre los diferentes componentes, siendo importante determinar si el tejido se considera una estructura de naturaleza homogénea o si es un material compuesto donde los diferentes componentes se organizan de forma heterogénea. En este último caso las propiedades mecánicas del tejido dependerán tanto de la relación entre los diferentes componentes como de las propiedades de cada uno de ellos (Niklas, 1992a; Spatz y col., 1999).

En los estudios mecánicos de materiales poliméricos, ha sido frecuente el uso de una metodología basada en las llamadas curvas de tracción. Estas curvas se realizan aplicando una carga o tensión a una lámina del material y estimándose el grado de deformación obtenido como respuesta del material. Las principales variables que condicionan estos ensayos son, además de las propiedades del material, el tiempo de aplicación de la carga, la temperatura y la humedad del material (Niklas, 1992a).

La humedad, la presencia de agua bien por hidratación o mojado, tiene importantes consecuencias sobre el comportamiento de un material. El agua se comporta principalmente como un agente plastificador que se intercala entre las cadenas y los grupos funcionales disminuyendo la interacción entre estos, resultando en un material menos rígido y más deformable, con características viscoelásticas. Se ha documentado que la cutícula aislada de frutos de tomate se comporta como un

material viscoelástico que responde a la hidratación modificando además sus propiedades mecánicas (Petracek y Bukovac, 1995). No obstante, la hidratación de una cutícula de fruto de tomate no es un proceso lineal sino que depende del grado de humedad relativa a la que esté expuesto (Luque y col., 1995).

A pesar de este nuevo enfoque en el estudio de las cutículas vegetales, existen muy pocos trabajos que estudien las propiedades mecánicas y reológicas de las cutículas aisladas y su relación con la humedad relativa y ninguno sobre el efecto de la temperatura. En cualquier caso, estos trabajos no discuten ni abordan directamente su papel en el agrietado del fruto.

La cutícula del fruto de tomate, al ser un material fundamentalmente amorfo, se considera que no presenta ejes principales de simetría y, de este modo, la aplicación de esfuerzos tipo uniaxial no presenta problema alguno. Siempre que se tenga en cuenta que los esfuerzos uniaxiales revelan módulos de tensión menores que cuando el mismo material es sometido a esfuerzos bi-dimensionales, simulando la tensión generada en un fruto esférico (Bargel y col., 2004). Sin embargo, a nivel estructural y morfológico la presencia de los denominados compuestos hidrolizables le confiere a la cutícula vegetal las características de una membrana heterogénea desde el punto de vista biomecánico. En este sentido, la presencia de material polisacárido localizado fundamentalmente en la parte interna de la cutícula le confiere a ésta una menor extensibilidad que la que presenta la superficie externa cubierta de ceras epicuticulares (Wilson y Sterling, 1976). Es por esto que la cutícula del fruto de tomate será objeto de un extenso estudio en la presente Memoria, con objeto de analizar en detalle el comportamiento biomecánico de las cutículas aisladas de frutos de tomate y estudiar el efecto de dos variables ambientales relacionadas con el agrietado: temperatura y humedad relativa.

OBJETIVOS

*“Lejos y entre los árboles
de la intrincada selva,
¿no ves algo que brilla
y llora? Es una estrella.*

*Ya se la ve más próxima,
como a través de un tul,
de una ermita en el pórtico
brillar: es una luz.*

*De la carrera rápida
el término está aquí.
Desilusión. No es lámpara ni estrella
la luz que hemos seguido: es un candil.”*

Gustavo Adolfo Bequer, Rimas.



OBJETIVOS

- ✓ Evaluar la susceptibilidad al agrietado de diferentes cultivares para caracterizarlos y que sirvan de base para estudios posteriores.
- ✓ Correlacionar la susceptibilidad real de los cultivares con el agrietado inducido para los cultivares específicos con los que se va a trabajar.
- ✓ Estudiar el efecto de las dos principales variables ambientales, temperatura y humedad relativa, sobre el agrietado de cultivares con distinta susceptibilidad al agrietado intentando cuantificar la importancia de cada una y tratando de probar si el agua que penetra en la piel tiene un efecto de origen químico (desintegración de membranas) o físico (aumento de volumen) en el agrietado.
- ✓ Poner a punto una metodología que permita estudiar las propiedades mecánicas de la epidermis de fruto de tomate en condiciones similares a las presentadas *in vivo*.
- ✓ Comparar el comportamiento mecánico de varios cultivares de distinta susceptibilidad al agrietado.
- ✓ Determinar la contribución de los diferentes componentes que constituyen el pericarpo, cutícula, epidermis y colénquima, en la capacidad de la piel del fruto a resistir una rotura por tensión.
- ✓ Diseñar una estrategia metodológica que permita el estudio de las propiedades mecánicas de las cutículas aislada de frutos.
- ✓ Evaluar en detalle el comportamiento biomecánico de las cutículas aisladas.
- ✓ Identificar posibles diferencias en las propiedades mecánicas entre cultivares con distinta susceptibilidad al agrietado
- ✓ Estudiar el efecto de variables ambientales: temperatura y humedad relativa, relacionadas con el agrietado en las propiedades mecánicas de las cutículas aisladas.

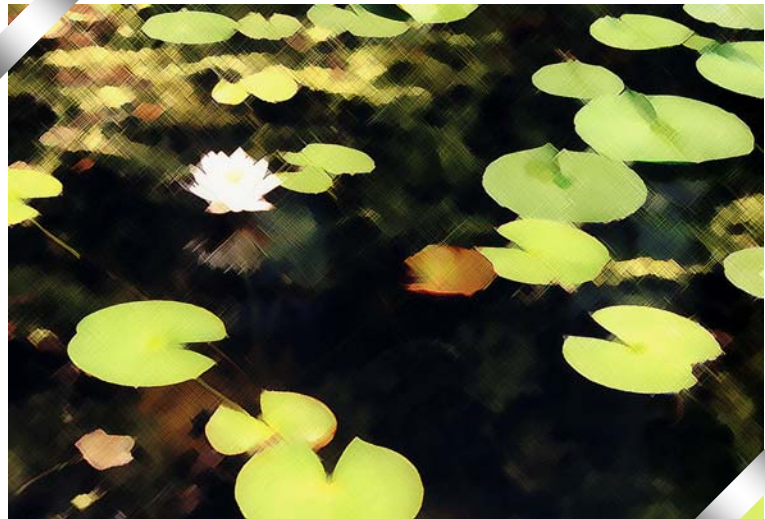
INTEGRACIÓN DE LOS EFECTOS AMBIENTALES Y LAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA CUTÍCULA: MODELOS EXPLICATIVOS DEL AGRIETADO

La relación entre las características histológicas de la cutícula y los factores ambientales se ve reforzada si tenemos en cuenta que la explicación del agrietado por un incremento de la presión interna del fruto no sirve para explicar el agrietado en frutos ya recolectados, pues en los ambientes controlados donde se almacenan no existiría una entrada de agua al fruto. Con el paso del tiempo el fruto perdería agua y por tanto presión, siendo menos propenso a agrietarse.

La explicación al agrietado que tiene lugar después de recolectado el fruto no debe, evidentemente, venir del agua transportada desde la planta. Un posible modelo para el agrietado en poscosecha basado en el incremento de presión del fruto radica en suponer que la cutícula actuaría como una membrana semipermeable que dejaría pasar el agua que se deposita sobre su superficie y que entraría al interior del fruto impulsada por la concentración de osmolitos. Si se considera que el agua depositada por condensación en la cutícula sería más bien exigua, el agua que penetrase a través de ella no incrementaría la presión interna del fruto sino más bien localmente la de la epidermis, por lo que este incremento de presión no sería la fuerza que causaría el desarrollo de las grietas. Una hipótesis alternativa sería que el agua, al difundir por la cutícula hacia la pared celular de las células epidérmicas, causaría cambios tanto en la estructura de la pared como en la de la cutícula, degradando y desintegrando los componentes de la pared y la cutícula, generando una situación de inestabilidad que podría acarrear la formación de una fractura sin necesidad de un incremento de la presión interna del fruto. De esta forma, las propiedades y función de la cutícula, junto a la interacción con la capa de células epidérmicas más externa, serían cruciales en el mecanismo del agrietado (Sekse, 1995; Bukovac y col., 1999).

Parece claro que la temperatura y la humedad son factores ambientales que inciden en el agrietado, pero todavía se está lejos de conocer cómo actúan en el fruto y en la piel. Por ello una parte importante de esta Memoria se dedicará al estudio de estas dos variables intentando cuantificar la importancia de cada una y tratando de probar si el agua que penetra en la piel tiene un efecto de origen químico (desintegración de membranas) más que físico (aumento de volumen) en el agrietado o viceversa.

MATERIALES Y MÉTODOS



“La segunda preguntó: ¿Se sentirá algo [...] ahí abajo? La primera respondió: ¿Quién sabe? Ninguna de las hojas que han caído ha vuelto jamás a contárnoslo.”

F. Salten, Bambi (Historia de una vida en el bosque), 1924.

Los trabajos recogidos en la presente Memoria se realizaron principalmente a partir de dos campañas; un cultivo en la Estación Experimental “La Mayora” en la primavera de 2001 y otro cultivo en la Universidad de Cornell en el verano de 2003. Los detalles de cada cultivo así como los genotipos utilizados en cada caso y los ensayos aplicados a las muestras recogidas se recogen a continuación:

Cultivo en la Estación Experimental “La Mayora”

Instalaciones

El ensayo fue realizado en la Estación Experimental “La Mayora”, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, sita en el término municipal de Algarrobo (Málaga), con coordenadas 36° 40’ Norte, 4° 29’ Oeste, en la campaña de marzo a julio de 2001. Se llevó a cabo en un invernadero multitúnel (Figura 2.1), que permite controlar mucho mejor los factores ambientales por su altura y ventilación, teniendo además una mayor hermeticidad y por tanto un mejor control de la entrada de plagas.



Figura 2.1: Fotografía del invernadero multitúnel donde se realizó el cultivo de tomate en La Mayora. La imagen muestra la disposición del cultivo el día del transplante.

El invernadero donde se realizó el cultivo tenía unas dimensiones de 60 m de largo por 24 m de ancho y una estructura que se alzaba a 4.5 m en la canal de desagüe y 6 m en el cenit del arco. El invernadero tenía apertura cenital (ventilación denominada supercénit) y ventanas laterales a lo largo de las dos bandas longitudinales lo que proporcionó una superficie de ventilación total del 27% de la superficie del invernadero.

Todas estas aperturas estaban protegidas por malla anti-trips de 10 x 16 hilos cm^{-2} . El material de cubierta era polietileno de larga duración con un espesor de 800 galgas. El invernadero estaba dotado con una cámara de entrada provista de doble puerta, así como de un ventilador para crear una sobrepresión que impulsaba el aire hacia la calle con objeto de evitar en lo posible la entrada de plagas, en especial de *Bemisia tabaci* Genn.

El invernadero estaba dividido por un pasillo central con orientación Norte - Sur, siendo las hileras de cultivo perpendiculares al pasillo central (orientación Este - Oeste) y pareadas con 0.7 m y 1.3 m de separación entre hileras. El ensayo no ocupó toda la superficie del invernadero.

La red de riego estaba constituida por una serie de depósitos para preparar soluciones nutritivas independientes. Cada depósito tenía una capacidad de 1 m^3 , estaba dotado de una bomba que impulsaba la solución por la correspondiente tubería portarramal y de ella salían las tuberías portagoteros. Los portarramales y los portagoteros eran tuberías de polietileno de 50 y 10 mm de diámetro respectivamente. Los goteros instalados eran autocompensantes de 3 L h^{-1} . Paralelamente se disponía de otros depósitos donde se preparaba la solución madre que se distribuía después a los depósitos de 1 m^3 que contenían la solución nutritiva de riego.

El sustrato utilizado en el ensayo fue arena colocada en macetas de 20 L. Las arenas presentan un excelente drenaje y una escasa retención de agua, motivo por el cual hay que dar riegos con muy poco volumen y muy frecuentes. Esa falta de retención del agua hace que se concentre muy poco la solución nutritiva en el sustrato, a lo que contribuye también el constante lavado producido por la altísima frecuencia de riegos, motivo por el que se eligió este sustrato experimental.

Material Vegetal

Se eligieron tres genotipos de tomate tipo cereza que respondiesen con sensibilidad alta, media y muy baja al agrietado. Para ello contamos con la experiencia de cultivo de años anteriores y en base a esta experiencia se eligieron Cascada híbrido F1 comercial muy resistente al agrietado, Josefina híbrido F1 comercial parcialmente sensible y Gardeners Delight, como variedad extremadamente sensible.

Cascada F1 (Zeraim Ibérica), híbrido de porte indeterminado con planta de entrenudos medios y follaje oscuro. Produce ramilletes divididos en racimos simples donde los frutos están organizados a ambos lados del raquis. Los frutos son redondos,

muy ligeramente aplastados, con hombros de color verde suave que desaparecen en la madurez, quedando de color uniforme; el calibre oscila entre 32 a 34 mm y 20 a 25 g de peso medio. Maduran con un color rojo brillante, incluso cuando se cosechan con altas temperaturas. Los frutos son de sabor dulce, muy jugosos y muy tolerantes al agrietado tanto en condiciones de otoño-invierno como de primavera-verano. Su dureza permite una recolección en estado óptimo de madurez, tanto en frutos sueltos como en ramilletes. El cáliz es de tamaño medio y permanece verde, al igual que el raquis del ramillete, después de alcanzar la maduración. Este híbrido está orientado a la recolección en frutos sueltos aunque a veces se dedique también a la recolección por racimos. Fue seleccionado por su gran resistencia al agrietado, aunque es un híbrido no bien aceptado por el comercio debido a su aspecto achatado y porque los frutos pierden consistencia con las altas temperaturas (Figura 2.2).



Figura 2.2: Fotografía de racimos de frutos de los genotipos Cascada (izquierda) y Gardeners Delight (derecha).

Josefina F1 (Hazera España 90), híbrido de escaso follaje, frutos con mucho color y brillo, de gran resistencia y larga vida aunque no porte alguno de los genes rin o Nor. Es un híbrido que lleva muchos años en el mercado, lo que hace que ya se vea como un híbrido comercial un tanto anticuada, principalmente porque no posee ninguna resistencia a enfermedades o virosis, habiendo hoy cultivares con resistencia a distintos tipos de hongos (*Fusarium sp.*, *Verticilium sp.*) e incluso a virus (ToMV, TYLCV, etc). Además, es una de los genotipos cultivados más sensible al agrietado. A pesar de todos estos inconvenientes, Josefina sigue siendo el híbrido más cultivado por sus excelentes

cualidades organolépticas y esta característica es la que hace que los mercados lo demanden.

Gardeners Delight, variedad antigua, de las primeras de fruto tipo cereza, usada en el Reino Unido para pequeños cultivos en jardines donde también se usa, a veces, como planta ornamental. El porte es indeterminado, con entrenudos cortos, ápice arrellado y crecimiento relativamente lento. Hoy no puede competir con los cultivares actuales ni en productividad ni en calidad. En nuestros experimentos se ha incluido por su gran sensibilidad al agrietado (Figura 2.2).

Labores culturales

El cultivo se desarrolló entre el 12 de enero, fecha en la que se sembró, el 14 de febrero, fecha en la que se trasplantó al invernadero definitivo y finales de junio cuando se dio la última recolección. Las plantas continuaron en el invernadero con otros propósitos.

Siembra y transplante

La siembra de la planta se hizo en un semillero en vermiculita el 12 de enero y el trasplante un mes más tarde, el 14 de febrero. En el invernadero se colocaron hileras de 40 macetas regadas por un ramal. Se trasplantó una planta por maceta de las variedades Gardeners Delight, Cascada y Josefina.

La planta de tomate, en cultivares vigorosos y de crecimiento indeterminado, puede alcanzar hasta 10 m de longitud, de ahí que sea necesario una correcta conducción para permitir el paso de operarios y realizar las prácticas culturales pertinentes (Van de Vooren y col., 1986). La conducción de la planta se llevó a cabo mediante tres técnicas culturales que son: poda, entutorado y despunte.

Poda y entutorado

Las plantas se podaran a un tallo, tal como es práctica habitual en el cultivo comercial de tomate bajo invernadero, o a varios en aquellos cultivares de hábito de crecimiento determinado que necesitan ser reconducidos mediante yemas laterales para alargar el periodo de cultivo. En todos los casos, las plantas se entutoraron con una rafia atada a la base del tallo, enrollada a lo largo del mismo y sujeta por arriba a las líneas de

alambre. Estas líneas de alambre se encontraban sujetas a la estructura del invernadero a una altura de 2 m. En los cultivares más vigorosos, cuando las plantas alcanzaron esta altura, se dejaron descolgar hacia el suelo guiándolas con una rafia y de nuevo se entutoraron hacia el alambre alcanzando en algunos casos unos 5 metros. El marco de plantación empleado supuso una densidad aproximada de 2.5 plantas m⁻². (Castilla, 1995).

Cuajado de frutos

En el experimento no se realizó tratamiento hormonal, sólo se dieron pases con vibrador, tres por semana, hasta el final del cultivo.

Abonado

El agua con que se preparó la solución nutritiva se recogía directamente del río Algarrobo, se almacenaba en una balsa y desde ella se impulsaba a los depósitos cuando se necesitaba. Su composición química se da en la Tabla 2.1. La concentración nutritiva testigo tenía 10 mM de N (9.5 de NO₃⁻ y 0.5 de NH₄⁺); 1.5 mM de P; 7.0 mM de K⁺; 6.0 mM de Ca²⁺; 3.0 mM de Mg²⁺ y 2.0 de SO₄²⁻ (Cánovas, 1995).

Tabla 2.1. Concentraciones (mM) de los iones más importantes en la solución nutritiva.

	N(NO ₃ ⁻)	N(NH ₄ ⁺)	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
Agua	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	1.1	0.5	-3.50
Abonos								
Ca Cl ₂					4.9			
Ca (NO ₃) ₂	0.0				0.0			
H ₃ PO ₄			1.5					1.50
H NO ₃	1.5							1.50
NH ₄ NO ₃	0.5	0.5						
K NO ₃	7.0			7.0				
K ₂ SO ₄				0.0			0.0	
Mg SO ₄ .7H ₂ O						1.9	1.9	
Total	9.0	0.5	1.5	7.0	6.0	3.0	2.4	-0.5

El aporte de solución nutritiva estaba controlado por un programador de riego con riegos de una duración de 2 min. Al principio del cultivo se daban 20 riegos diarios repartidos entre las 9:00 y las 18:00 h, luego se adaptaron y se dejaron los riegos a las horas en punto, tan solo se mantuvieron los riegos en las horas centrales del día que se daban cada media hora.

Recolecciones

Las recolecciones se llevaron a cabo cuando se veía una cantidad suficiente de frutos maduros, siguiendo los mismos criterios que en cualquier finca comercial, aunque se solía dejar un poco más de tiempo para recoger un número significativo de frutos en cada recogida. Las recolecciones se hicieron manteniendo aproximadamente una diferencia de siete días entre una y otra. Todas las recolecciones se hicieron en un solo día uniendo los frutos de las 6 plantas/cultivar y tratamiento.

Toma de datos del cultivo

A partir del cultivo se midieron los siguientes parámetros:

- ✓ Evolución del diámetro del fruto desde la floración a la maduración. A los 45 días del trasplante se etiquetaron 20 flores en el mismo estadio fenológico en cada una de las variedades para su posterior medición mediante un pie de rey digital. A la semana siguiente se realizó la primera medida del calibre que presentaban los frutos, medida que se repitió todas las semanas hasta que el fruto alcanzó la madurez y se recolectó.
- ✓ Seguimiento de la incidencia del agrietado natural por el número y peso de los frutos comerciales y agrietados. En cada recogida se separaron los frutos agrietados de los comerciales, se contaron ambos y se pesaron con una balanza electrónica digital de sensibilidad.
- ✓ Número de racimos al final del cultivo. Se contaron para tener una idea de los frutos/racimo que producía cada cultivar.
- ✓ Evaluación de la calidad de los frutos: °Brix mediante un refractómetro digital Atago Palette PR 100 y la acidez titulable neutralizando el jugo del fruto con NaOH y empleando fenolftaleína al 1% en agua-alcohol como indicador del viraje.

Inducción del agrietado por inmersión en agua

El método de evaluación de la susceptibilidad mediante la inducción del agrietado se basó en el siguiente protocolo.

Se recolectaron de 120 a 150 frutos por línea de ensayo en estadio maduro y sin pedicelo, desechando aquellos que presentaron daños visibles. Para evitar la entrada de agua o la desecación por los tejidos de la cicatriz pedicular se utilizó una gota de pegamento. Colocados los frutos en una superficie estable, con el punto de inserción del pedicelo hacia arriba, se aplicó una gota de pegamento para que cubriera bien toda la zona sin invadir la superficie de cutícula y se dejó secar durante 5-10 minutos. Una vez preparados los frutos, se repartieron en grupos de 25-30 frutos en recipientes adecuados, cuatro o cinco grupos por ensayo, y se añadió suficiente agua para cubrir todos los frutos. Por cada grupo de ensayo se dejaron sin cubrir con agua otros tres recipientes con frutos.

Una vez preparados los recipientes con los frutos y el agua, o sin ella, se incubaron durante un periodo variable de tiempo. Este periodo se extendió entre 2 y 24 horas y las temperaturas de incubación fueron de 12 y 35 °C estables gracias a un sistema de refrigeración o calefacción adecuado. Esto permitió optimizar el procedimiento para evaluar el efecto de la temperatura y la posible entrada de agua al fruto. Transcurrido el tiempo señalado se retiraron los frutos y contaron aquellos que presentan grietas, calculando la media y la desviación para cada ensayo con los 4 o 5 grupos utilizados.

En algunos casos en los que la incidencia de agrietado fue muy baja, se agruparon todas las repeticiones y se estimó la probabilidad de agrietado como la fracción de frutos agrietados respecto al total. El error asociado a una probabilidad de agrietado (E_p) en una población de tamaño T se calcula según la relación:

$$E_p = \frac{P(1-P)}{T}$$

Entrada de agua al fruto

Durante los ensayos de inmersión en agua se seleccionaron varios grupos de frutos con los que se estimó la entrada de agua al fruto durante un tiempo de inmersión de dos horas a 12 °C. Se numeraron y pesaron en una balanza de precisión (Adam Equipment, ± 0.0001 g) antes de sumergirlos y, tras el tiempo de inmersión indicado,

los frutos fueron retirados del recipiente de inmersión y el agua que mojaba la superficie secada exhaustivamente mediante papel de filtro antes de ser pesados.

A partir de la diferencia de peso se estimó la cantidad de agua que entró al fruto y el incremento en volumen del fruto debido a esta entrada de agua. La deformación en la superficie del fruto debida a este incremento en volumen se calculó asumiendo un fruto esférico tal que, $V = 4.189 r^3$, donde V sería el volumen estimado a partir del radio, r, medio del fruto, y $S = 12.56 r^2$, donde S sería la superficie.

Aislamiento de cutículas

Se realizaron varias recogidas de frutos en diferentes estadios del desarrollo, determinados a partir de los frutos etiquetados para el seguimiento del diámetro del fruto, y de los cuales se realizó la extracción de la cutícula para los posteriores estudios de caracterización del material y propiedades biomecánicas.

Para la extracción de las membranas cuticulares de frutos de tomate se aplicó el procedimiento descrito por Orgell (1955) y modificado por Yamada y col. (1964) tal como aparece en el trabajo de Petracek y Bukovac (1995). Se tomaron frutos en los diferentes estadios de crecimiento seleccionados y se lavaron superficialmente con agua destilada. Una vez lavados, los frutos se inspeccionaron visualmente para descartar aquellos que presentaban daños o irregularidades superficiales. Aquellos que no presentaron anomalías superficiales se trocearon en 4, 6 u 8 secciones en función del tamaño de cada fruto. Con ayuda de un escalpelo se eliminó todo el tejido de pericarpo sin dañar la cutícula. Las muestras se suspendieron en una solución acuosa de tampón citrato pH 4.0 (Panreac) con una mezcla de celulasa (0.2% w/v, Fluka-Sigma, EC 3.2.1.4) y pectinasa (2% w/v, Sigma, EC 3.2.1.15) de origen fúngico. Incluir datos del catálogo. A la solución de extracción se le añadió 1mM NaN₃ (Sigma) para prevenir el crecimiento microbiano. Para facilitar la infiltración en el tejido, se aplicó vacío a la solución enzimática conteniendo las muestras antes de ser incubadas a 33 °C en un baño termostático con agitación. Transcurridos entre 4 y 7 días las cutículas se separaron del tejido epidérmico y se cambió la solución enzimática. Las muestras se mantuvieron durante otros 7 días en las mismas condiciones. Más adelante las membranas cuticulares se lavaron exhaustivamente en agua destilada y se dejaron secar en una cámara con gel de sílice durante 7 días, tras lo cual se guardaron para los posteriores análisis.

Determinación de los componentes principales

La composición de las membranas cuticulares fue determinada gravimétricamente mediante la extracción sucesiva de los componentes principales (ceras, compuestos hidrolizables y cutina). Se partió de unos 100 mg de cutícula aislada equilibrada durante 24 horas en vacío con gel de sílice. Pesando cuidadosamente la cantidad inicial, se sometió a condiciones de reflujo en una mezcla de cloroformo-metanol (1:1) durante 24 horas para eliminar el contenido en ceras cuticulares. Transcurrido este tiempo se lavaron en metanol y se dejaron secar durante 48 horas. Una vez deshidratadas las muestras, se pesaron de nuevo y se incubaron en una mezcla HCl 6N y H₂O (1:1) a 110°C durante 18 horas para extraer la cutina. El residuo resultante se dejó secar durante 72 horas y se pesó para determinar la pérdida de peso. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra y se estimó la cantidad media para cada componente.

Determinación del peso específico

La cantidad de cutícula por unidad de área se determinó a partir de trozos de membranas cuticulares aisladas a las que se les cortó los bordes, con el fin de obtener láminas planas. Agrupando unos 10 trozos por réplica, tres réplicas por muestra, se calculó la superficie total mediante análisis de imagen con una cámara LCC (RCA) y el programa Visilog v5.2 (Noesis[®], Francia). Tras calcular la superficie de cada grupo de cutículas, se dispusieron en cámaras con gel de sílice para su completa deshidratación y posterior pesado. El peso específico se expresó como la media de la cantidad de cutícula por unidad de área ($\mu\text{g cm}^{-2}$) de las réplicas de cada muestra.

Determinación del grosor

El grosor de las muestras de cutícula aislada se determinó mediante la inclusión en resina y posterior corte histológico de cada muestra. El tratamiento que se le proporcionó a cada muestra hasta llegar a la obtención de cortes para observar a microscopía óptica, se compuso de los siguientes pasos: fijación de la muestra, deshidratación, infiltración e inclusión en resina.

- Fijación: Con ayuda de un escalpelo se cortaron pequeñas porciones de muestra de aproximadamente 2 mm. Las muestras se depositaron en una mezcla de fijación compuesta por: tampón fosfato 0.1M a pH 7.2 (Panreac),

formaldehído al 2% (Panreac), glutaraldehído al 2.5% (Sigma), permaneciendo en el fijador al menos durante 12 horas.

- Deshidratación: Las muestras se sumergieron durante 30 minutos en diluciones de alcohol al 50%, 70% y 96% (v/v); posteriormente se mantuvieron durante 15 minutos en alcohol al 100%, proceso que se repitió dos veces y, por último, se dejaron durante 30 minutos en alcohol 100%.

- Infiltración: Se empleó la resina “*LR White*” (Fluka). Se llevaron a cabo 2 infiltraciones de 3 horas cada una, y una tercera infiltración de 12 horas, haciendo siempre el vacío entre pase y pase para permitir una buena infiltración de la resina en la muestra.

- Inclusión y polimerización: La inclusión en resina se realizó en cápsulas de gelatina o en tubos de 1 mL y la polimerización de la misma se llevó a cabo a 58° C durante al menos 24 horas, evitando el contacto con el aire.

Una vez se tuvieron las muestras incluidas en la resina, se pasó a la fase de obtención de cortes de la muestra con un ultramicrotomo modelo Ultracut E. Inicialmente, se talló la muestra (con ayuda de una cuchilla de afeitar) hasta conseguir una pirámide, en la que la muestra quedó en la cúspide. Los cortes se realizaron a una velocidad de 30 mm/s y con un grosor de 3 micras (cortes semifinos). Los cortes se recogieron en una balsa cubierta de agua y fijada a la cuchilla, de donde se tomaron para depositarlos sobre una gota de agua colocada previamente en un portaobjetos. En este caso, se emplearon portas gelatinizados para favorecer la adhesión de la muestra al portaobjetos.

Para gelatinizar los portaobjetos fue necesario en primer lugar desengrasarlos durante al menos 24 horas en una mezcla al 50% de alcohol puro y éter dietílico (Panreac). A continuación, se secaron y sumergieron durante unos minutos en una solución de gelatina, consistente en 1 g de gelatina y 0.1 g de alumbre de cromo disueltos en 200 mL de agua destilada. Los portaobjetos gelatinizados se secaron en una estufa a 37° C durante 24 horas.

Una vez se tuvieron los cortes sobre las gotas de agua depositadas sobre el portaobjetos, se dejaron secar en una placa calefactora hasta conseguir la evaporación del agua y adhesión del corte al portaobjetos. Por último, se tiñeron los cortes con azul de toluidina (0.5%, p/v, en agua destilada) dejando los portas en la placa calefactora

Plactonic (Selecta) a 60° C durante 30 segundos para favorecer la fijación del colorante a los tejidos.

Se tomaron imágenes de los cortes con una cámara LCC (modelo RCA) y posteriormente se analizaron con el programa Visilog v 5.2 (Noesis).

Estudio de las propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de la cutícula aislada se estudiaron mediante la determinación del calor específico, C_p , de las distintas muestras analizadas se realizó en un calorímetro diferencial de barrido Shimadzu DSC-50 (Shimadzu Corporation, Japón) controlado por un ordenador, mediante el programa TA-50 Thermal Analysis.

Todos los ensayos de calorimetría diferencial de barrido se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Casado y Heredia (2001) recogido en el Anexo 1 de la presente Memoria.

Espectroscopía infrarroja de la transformada de Fourier

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un espectrofotómetro Nicolet Avatar 36° FT-IR con transformada de Fourier. Las muestras de cutícula aislada se deshidrataron en una cámara estanco con sílica gel antes de ser maceradas en un mortero de ágata hasta conseguir un polvo fino de material cuticular. Se mezcló con bromuro potásico (Uvasol[®], Merck) al 3% de cutícula en polvo, compactando la mezcla en forma de pastillas que posteriormente se montaron en el portamuestras del espectrofotómetro. Los espectros de infrarrojo fueron representados y analizados mediante el software Omnic[®] v4.1b (Nicolet Instrument Corp).

Difracción de rayos-X

Los difractogramas de rayos X fueron obtenidos con un difractómetro Siemens D-501 con microprocesador DACO-MP (Siemens, Alemania). El difractómetro utiliza la radiación $K\alpha$ del cobre y un cristal curvo de grafito entre la rendija receptora y el detector con el objeto de eliminar la radiación $K\beta$. De un modo general, los difractogramas fueron registrados entre 10° y 40° (2θ), con un tamaño de paso de 0.05°, un tiempo de conteo de 4 segundos por punto a una tensión de 40 kV y una intensidad de 20 mA. Las muestras de cutícula fueron montadas sobre un soporte de vidrio

adaptado al goniómetro del difractómetro, permitiendo el difractómetro el control de la temperatura de la muestra.

Microscopía de Fuerza Atómica

Las imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se obtuvieron mediante un microscopio topométrico modelo TMX2000, trabajando tanto en modo de contacto de fuerza constante, como en modo de no contacto con detección de amplitud y fase. Se empleó un barrido de baja resolución (rango máximo X-Y de $130\mu\text{m} \times 130\mu\text{m}$ y $13\mu\text{m}$ en Z) para analizar la textura general y la homogeneidad de la superficie de las muestras de cutícula. Para una mayor resolución lateral y vertical, se empleó otro barrido de alta resolución con rangos máximos X-Y-Z de $2.3\mu\text{m} \times 2.3\mu\text{m}$ y $0.8\mu\text{m}$. En cualquier caso, se empleó la misma sonda de Si_3N_4 (NanoProbe™, Digital Instruments, Santa Clara, CA EE.UU.) con fuerza constante nominal de 0.58 N/m . En modo de no-contacto, se empleó una sonda rígida de Si_3N_4 (NT-MDT Ultrasharp NSCS12) oscilando a su frecuencia de resonancia (aproximadamente 149 KHz).

La calibración en las direcciones X-Y-Z fue hecha con los patrones de calibración comercial provistos por NT-MDT (Moscú).

Las muestras fueron adheridas a un portaobjetos empleando papel adhesivo de doble cara, y analizadas en atmósfera ambiente, con condiciones de $20\text{-}25^\circ\text{C}$ de temperatura y $45\text{-}50\%$ de humedad relativa.

Espectroscopía ^{13}C RMN de estado sólido

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C -Polarización cruzada/ángulo mágico (CP/MAS NMR) fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker Chemagnetic 400MHz NMR funcionando a 75.5 MHz y usando una sonda de aire. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente con una cantidad de cutina en polvo purificada que osciló entre 30 y 40 mg , obtenido previamente mediante morturación en nitrógeno líquido en un vial MAS de 5 mm .

Propiedades mecánicas de las cutículas aisladas

Las propiedades mecánicas se midieron empleando un extensiómetro equipado con un transductor de señal de desplazamiento lineal (Mitutoyo, Japón) que fue específicamente diseñado para este trabajo con cutículas de tomate por el Ing. Máximo L. Romero y construido en los laboratorios de mecanizado de la Universidad de Málaga (Figura 2.3). El equipo diseñado es similar al descrito por Kutschera y Schopfer (1986). Se obtuvieron segmentos rectangulares de las membranas cuticulares aisladas usando bloques metálicos de medidas conocidas (3 mm x 9 mm). Cada pieza se inspeccionó mediante una lupa binocular (x60) y luz fría para determinar la ausencia de grietas o defectos antes de realizar el ensayo mecánico.



Figura 2.3: Imagen del extensiómetro diseñado para el estudio de las propiedades mecánicas de las cutículas aisladas (arriba). Detalle del transductor de señal y de la fijación de la muestra a las puntas de los brazos del dispositivo.

Fijación de las muestras

Los segmentos de cutícula sin defectos aparentes fueron fijados al extremo de cada uno de los brazos de acero del dispositivo para lo que se empleó una pequeña cantidad de pegamento (cianocrilato) de secado rápido, de tal forma que la cutícula formara una superficie plana con el eje de desplazamiento del brazo móvil, intentando minimizar las tensiones inespecíficas propias del uso de pinzas y dispositivos similares (Figura 2.3). El dispositivo permitió la colocación de un recipiente alrededor de la muestra y los brazos del extensiómetro tal que se pudo equilibrar el sistema con una solución tampón (Kutschera y Schopfer, 1986; Petracek y Bukovac, 1995). Todo el

conjunto fue dispuesto en una cámara cerrada (Selecta Hotcold-M) que permitió controlar la temperatura y la humedad relativa. Cada muestra se mantuvo en el interior de la cámara del extensiómetro al menos 30 minutos antes de realizar el ensayo para permitir que equilibrara su temperatura y contenido hídrico con el medio.

Condiciones de ensayo

Las condiciones de ensayo se establecieron a tres humedades relativas: 40%, 80% y sumergido en tampón citrato pH 3.5 (Kutschera y Schopfer, 1986; Petracek y Bukovac, 1995) considerado este último como mojado. Para la temperatura se eligieron cinco situaciones, 10, 23, 30, 35 y 45 °C. El rango de temperaturas y humedades relativas se escogieron para reproducir un amplio abanico de situaciones fisiológica que se podrían dar durante un cultivo en invernadero.

El área de la sección transversal de la muestra se obtuvo mediante microscopía óptica siguiendo el protocolo antes descrito y tomando medidas del grosor de la cutícula en la zona de la pared periclinal externa de las células epidérmicas. Se utilizaron tres muestras de pericarpo de tres frutos diferentes y se realizaron las medidas sobre 30 cortes de tejido de cada muestra a diferentes profundidades. La longitud expuesta de cada muestra se midió antes de la aplicación del ensayo para la posterior determinación de la deformación.

Para comprobar si el pegamento pudiera contribuir a la medida de extensión al deformarse durante las curvas de tracción, se realizaron varias curvas usando el pegamento y chapas metálicas de acero cortadas con medidas similares a las que tendrían las muestras. Estas curvas se realizaron tanto en atmósfera de aire como sumergidas en tampón. Los resultados indicaron que la deformación que sufría el pegamento, en el rango de fuerzas aplicadas a la cutícula, era tan pequeña que se asumió que toda la deformación obtenida en una muestra de cutícula correspondía a la propia deformación de la muestra y no al pegamento.

Tipos de ensayos mecánicos

Los ensayos mecánicos aplicados a las muestras de cutícula aislada de fruto de tomate consistieron en una serie sucesiva de ensayos de fluencia.

Para determinar los cambios en longitud, un segmento de cutícula se mantuvo en tensión con carga constante durante 20 minutos. Durante este periodo se registró la extensión longitudinal de la muestra cada 3 s mediante la conexión del dispositivo digital del extensiómetro a un ordenador por el puerto RS232 y un software de captura de datos (Telix). Cada muestra se sometió a una secuencia ascendente de tensiones sostenidas desde 0.098 N hasta que se producía la fractura, manteniendo incrementos en la carga de 0.098 N y sin permitir la recuperación de la extensión alcanzada. Para determinar el esfuerzo soportado, la fuerza de tensión aplicada en cada prueba se normalizó por el área de la sección transversal de la muestra.

El diagrama esfuerzo-extensión se obtuvo representando el esfuerzo aplicado frente a la máxima deformación longitudinal obtenida después de 20 minutos. Para cada muestra se estimaron el módulo de tensión o módulo elástico aparente (E , MPa) que se utilizó como estimador de la rigidez de la muestra, el esfuerzo en el punto de fractura (σ_b , MPa) usado como indicador de la resistencia de la muestra y la máxima deformación en el punto de fractura (ϵ_b), así como las posibles relaciones que se establecieran entre ellos a través de las condiciones de ensayo (Niklas, 1992a).

Análisis de los resultados

Los análisis de regresión múltiple y simple, y la comparación de las medias mediante Tukey-Kramer HSD, con $\alpha=0.05$, de los valores de módulo de tensión (E), esfuerzo en la fractura (σ_b) y deformación máxima (ϵ_b) se emplearon para determinar si las características del material variaban significativa y predeciblemente en función de la humedad y la temperatura. Se hizo hincapié en la comparación estadística entre la rigidez de las muestras de cutícula en diferentes combinaciones de humedad y temperatura dentro de un rango fisiológico (40% y 80% de humedad relativa y mojado y 10, 23, 30, 35 y 45 °C).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el paquete de software JMP (SAS Institute, Cary, North Carolina, EEUU). Los datos fueron representados mediante el paquete de software Sigma Plot 8.0 (SPSS, Inc., UK).

Cultivo en la Universidad de Cornell

El ensayo fue realizado en las instalaciones del Departamento de Biología Vegetal (Plant Biology) perteneciente a la Universidad de Cornell (Ithaca, NY, USA), donde se seleccionaron tres genotipos de tomate tipo cereza que se diferenciaban por su grado de susceptibilidad al agrietado del fruto: Cornell Inbred 10, una línea de elevada resistencia al agrietado desarrollada en Cornell bajo la denominación CT 95-946, Sausalito Cocktail, con resistencia intermedia también desarrollado en Cornell y comercializado por Territorial Seed Company (Cottage Grove, Oregon USA) y Sweet 100, con elevada susceptibilidad y disponible comercialmente por Agway (Seedway, Inc, Elizabethtown, Pennsylvania USA).

Se dispusieron cuatro plantas por genotipo en macetas (Figura 2.5) hasta conseguir frutos maduros (empleando semillas disponibles comercialmente y como sustrato una mezcla a partes iguales de turba fina de musgo y perlita o vermiculita denominada “*Cornell potting mix*”). El cultivo se realizó en invernadero de cristal sin luz suplementaria (Figura 2.5). Cada una las plantas fue irrigada y fertilizada regularmente siguiendo las prácticas habituales. Las flores fueron agitadas manualmente cada día para mejorar el cuajado de los frutos, etiquetando cada inflorescencia y siguiendo el desarrollo y la maduración de cada fruto diariamente. Se seleccionaron entre 30 y 50 frutos de cada genotipo de forma secuencial según alcanzaban el estadio rojo maduro. El criterio elegido fue recolectar el fruto unos dos días después de que iniciara el cambio de color. Cada muestra fue procesada inmediatamente realizando los ensayos mecánicos dentro de las 5 horas siguientes a la recogida.



Figura 2.5: Disposición del cultivo en la Universidad de Cornell (izquierda) y vista general del invernadero donde se realizó (derecha).

Preparación de las muestras

A partir de los frutos recolectados se obtuvieron segmentos rectangulares de sección paralela al pericarpo del fruto (alineadas tanto en sentido longitudinal como ecuatorial respecto al eje pedicelo-ápice del fruto) utilizando dos cuchillas paralelas unidas entre sí mediante un bloque de metal para asegurar un grosor del segmento (5.25 mm) y una profundidad de corte ($230 \mu\text{m} \pm 35$) uniformes y repetibles. La longitud de los segmentos varió en función de las diferencias en tamaño y forma de los distintos frutos. La piel de cada muestra de pericarpo fue retirada manualmente y depositada en una placa Petri con la parte subepidérmica en contacto con papel de filtro (previamente hidratado con el jugo y la pulpa del mismo fruto del cual fue tomada la muestra). Este procedimiento fue empleado para reducir la deshidratación, mantener la osmolaridad del tejido y evitar el mojado de la cutícula en su superficie externa. Simultáneamente, se tomó una pequeña muestra del pericarpo adyacente a cada muestra de piel y fijada en FAA (Formaldehído-Ácido acético-Agua) para su estudio anatómico. Mediante el análisis de imagen de las microfotografías de los cortes histológicos se determinó el grosor de la piel y de la cutícula que fue tomado para determinar las áreas transversales de aplicación de las fuerzas de tensión de las muestras estudiadas mecánicamente y para calcular los esfuerzos y los módulos elásticos.

Se tomó un duplicado de piel para cada fruto siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Una vez eliminado todo el tejido subyacente, las muestras de cutícula fueron depositadas en tampón citrato y examinadas microscópicamente para determinar su integridad y estimar las dimensiones de la sección transversal antes de aplicar los ensayos mecánicos sin dejar que se deshidrataran en ningún momento, siendo estudiadas según los procedimientos que se describen a continuación en el plazo máximo de 5 días después de su tratamiento enzimático.

Ensayos Mecánicos

Para realizar los ensayos mecánicos, las muestras de piel y sus correspondientes cutículas se montaron en dos pequeños alambres de metal suspendidos por un sistema de arandelas a los cabezales móviles (Figura 2.5) de un dispositivo de ensayo mecánico Instron (modelo 4502) o “Intron machine”. Las muestras se sujetaron a los alambres mediante una pequeña cantidad de pegamento de secado rápido con base de cianocrilato, extendido entre la cara externa de la cutícula de cada muestra y el metal,

doblando los extremos de cada muestra para rodear los alambres antes de ser alineados, de forma paralela entre las arandelas, con el eje de desplazamiento del Instron. Este procedimiento permitió una continua hidratación de la superficie subepidérmica durante el ensayo y minimizó los fallos y alteraciones por la sujeción de las muestras. Estos fallos de sujeción fueron monitorizados visualmente durante cada ensayo.

Para determinar la deformación por tensión, se midió la longitud de cada muestra una vez montada con un calibre digital. También se midió la longitud de la superficie expuesta entre los extremos doblados (Figura 2.5 B-C).

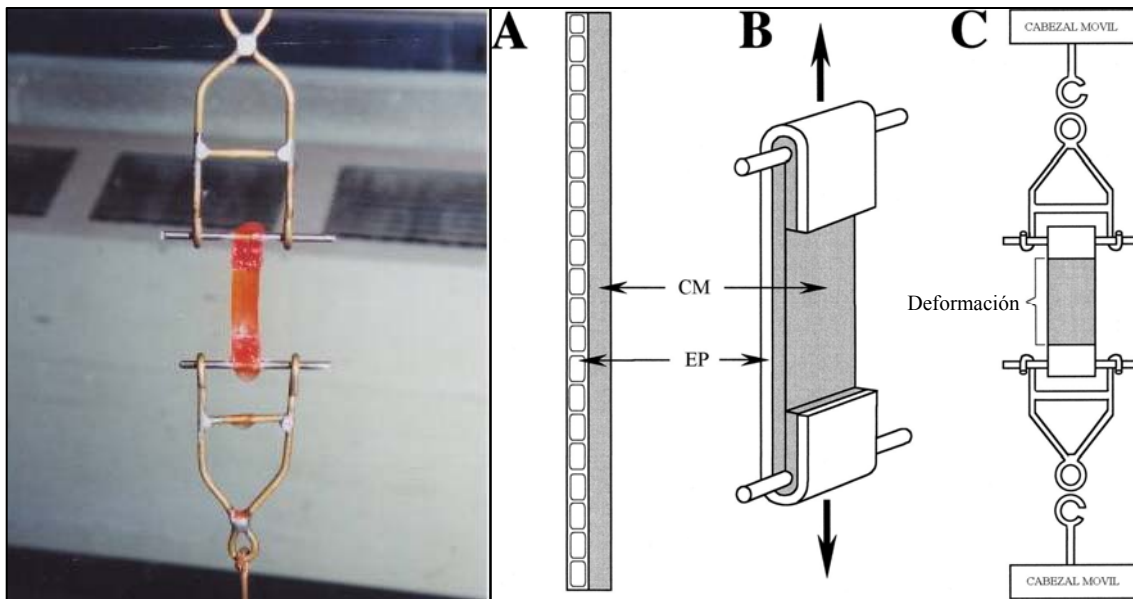


Figura 2.5: Imagen de la disposición de las muestras para los ensayos mecánicos en el Instron (izquierda). Esquema del método de fijación de las muestras (A) a los alambres (B) y el conjunto suspendido en la arandelas sujetas a los cabezales del dispositivo (C). Cortesía del Prof. Karl J. Niklas.

Para estimar los esfuerzos, la fuerza de tensión aplicada durante cada ensayo se dividió entre el área transversal media de cada muestra. Las muestras se mantuvieron continuamente hidratadas durante cada ensayo con el jugo extraído de su correspondiente fruto, aplicándose mediante una micropipeta a la superficie subepidérmica. Para asegurar una hidratación uniforme y reducir la desecación durante el tiempo de ensayo se aplicó una pequeña pieza de papel de filtro humedecido en el jugo del fruto a la superficie subepidérmica.

Tipos de ensayos mecánicos

Con las muestras de piel y cutícula se realizaron tres tipos de ensayos mecánicos: (1) ensayos de fluencia transitoria para determinar la tasa de fluencia (o velocidad de deformación) y la deformación elástica instantánea para una carga determinada, (2) ensayos compuestos de sucesivos ciclos de carga y descarga para determinar la acumulación de las deformaciones plásticas, resultado de repetir la aplicación de fuerzas de tensión crecientes (evolución de la deformación), y los efectos de esta aplicación repetitiva en el módulo de elástico de una muestra (permitiendo estudiar los fenómenos de endurecimiento y fatiga por deformación) y (3) ensayos de tensión uniaxial para determinar el módulo de tensión, el esfuerzo de fractura, deformación en la fractura y el trabajo de fractura (o energía necesaria para propagar una grieta a través del tejido). Puesto que una misma muestra no puede emplearse en los diferentes ensayos, los datos de los tres tipos de ensayos se analizaron de forma conjunta para determinar las propiedades mecánicas de las muestras de piel y sus respectivas cutículas aisladas. Los ensayos de carga y descarga cíclica y los ensayos de tensión uniaxial se realizaron, si no se indica de otra forma, a una velocidad de deformación de 2.0 mm s^{-1} . Los protocolos de cada uno de los tres ensayos se detallan a continuación.

La tasa de fluencia y la deformación elástica instantánea se determinaron sometiendo las muestras a una tensión uniaxial de carga constante durante un tiempo ≥ 20 minutos. A lo largo de este periodo la variación en la extensión longitudinal de cada muestra fue registrada cada 2 s. La tasa de fluencia fue determinada a partir de la pendiente de una regresión logarítmica de la curva de deformación frente al tiempo, tomando la segunda fase de fluencia (Figura 2.6). La deformación elástica instantánea fue estimada a partir de la deformación registrada 4 s después de la aplicación de cada fuerza de tensión. Cada piel fue estudiada repetidamente empleando cada vez una secuencia de fuerzas de tensión mantenidas (desde 0.10 N hasta 0.65 N en incrementos de 0.05 N) o con secuencias decrecientes (desde 0.65 N hasta 0.10 N con una diferencia de 0.10 N entre 0.60 N y 0.10 N). Este procedimiento fue empleado para evaluar los fenómenos de endurecimiento o fatiga por deformación, completando así los datos obtenidos para estos fenómenos con los ensayos cíclicos de carga-descarga. Se tuvo en cuenta que fuerzas de tensión equivalente no generan esfuerzos equivalentes en muestras de piel o sus correspondientes cutículas aisladas, debido a que la cutícula tan

solo contribuye con una fracción (f) del total del área transversal a través de la cual actúa cada fuerza de tensión en la piel (P_p). En consecuencia, en cada muestra de piel se tuvo en cuenta la f que ocupaba la cutícula para calcular las fuerzas de tensión equivalentes para producir esfuerzos equivalentes en las correspondientes muestras de cutícula. Así los esfuerzos equivalentes se calcularon como $P_e = f P_p$, donde P_e sería el esfuerzo equivalente y f la fracción decimal de cutícula respecto a la muestra de piel. Para una interpretación más clara de los ensayos de fluencia, y los ensayos cíclicos de carga-descarga, descritos a continuación, de la muestras de cutícula aislada, los resultados se ha representado en función de P_e .

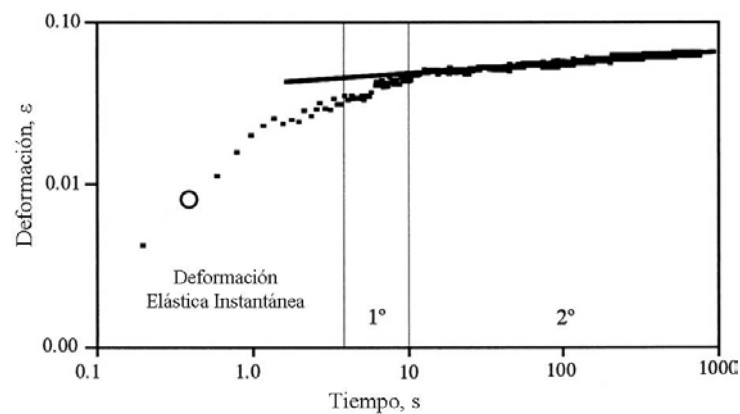


Figura 2.6: Representación logarítmica de la deformación frente al tiempo a partir de datos representativos de un ensayo de fluencia. Se diferencian tres fases, deformación elástica instantánea, registrada después de 4 s y resaltado mediante un círculo; fluencia primaria (1°) no lineal y fluencia secundaria (2°) lineal. La pendiente de la fase 2° se toma como la tasa de fluencia ($\Delta\varepsilon/\Delta s$) de la muestra.

Los ensayos cíclicos de carga-descarga fueron empleados para determinar los efectos de cargas mecánicas previas en la rigidez y la acumulación de deformaciones plásticas en las muestras. Cada piel fue extendida progresivamente (aplicando una secuencia creciente de fuerzas desde 0.10 N hasta 0.65 N en incrementos de 0.05 N) y relajada completamente antes de la siguiente carga (Figura 2.7). Los esfuerzos equivalentes P_e aplicados en la piel fueron usados para los ensayos cíclicos de carga-descarga de las muestras correspondientes de cutícula aisladas. Los esfuerzos y las deformaciones fueron registrados cada 0.5 s durante cada ciclo de carga-descarga. Las deformaciones plásticas fueron estimadas al final de cada ciclo de carga mientras que la rigidez de la muestra (módulo elástico, E) fue determinado a partir de la pendiente de la porción lineal de la representación del esfuerzo (σ) frente a la deformación (ε) después

de corregir los datos para la deformación plástica en cada ciclo de carga descarga previa ($E = \Delta\sigma/\Delta\varepsilon$).

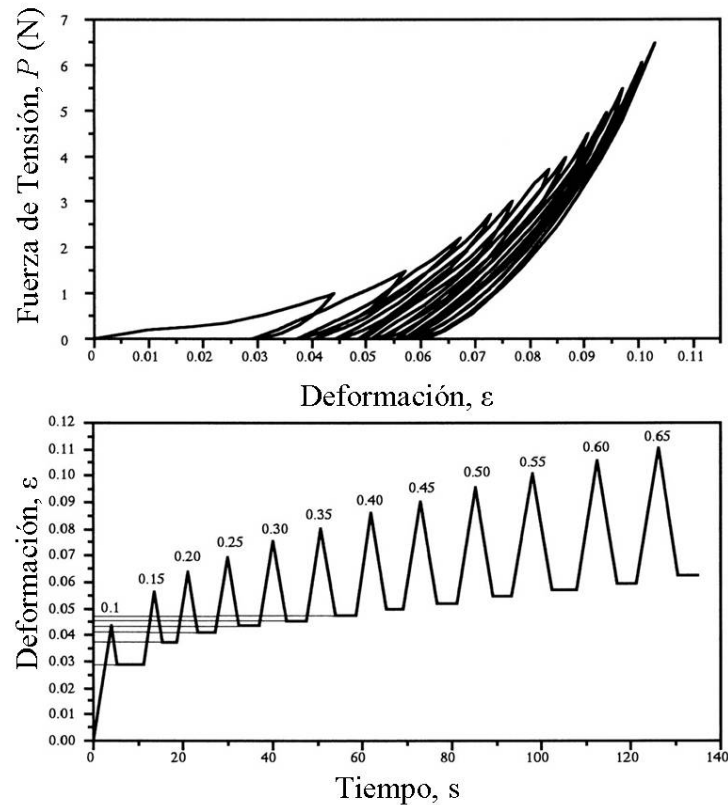


Figura 2.7: Representación de la fuerza de tensión frente a la deformación (superior) en un ensayo de ciclos donde se observa la extensión y relajación mediante fuerzas de 0.1 a 0.65 N, en incrementos de 0.05 N. Deformación obtenida frente a tiempo en el mismo ensayo (inferior). Las líneas horizontales entre picos de deformación muestran los intervalos de tiempo entre cada ciclo; trasladando estas líneas horizontales a su valor en ordenadas se obtiene la deformación plástica.

Los ensayos de tensión uniaxial se realizaron siguiendo el procedimiento ya descrito anteriormente, si bien cada muestra fue deformada hasta provocar la fractura total. El esfuerzo máximo (σ_b) y la deformación máxima (ε_b) fueron registrados como el esfuerzo y la deformación en el punto de fractura de la muestra respectivamente. De igual forma los ensayos de tensión uniaxial permitieron determinar el trabajo de fractura (W , o energía por unida de área transversal necesaria para propagar una grieta) mediante la aplicación de un pequeño corte de longitud conocida (l) en uno de los laterales de la muestra antes de aplicar el ensayo. El módulo elástico, E , y el esfuerzo de fractura de cada muestra fueron empleados para calcular W según la relación $W=(\pi l\sigma_b^2)/2E$ (Kraemer y Chapman, 1991; Niklas, 1992a; Anderson, 1995)

Estudio anatómico

Los tejidos que iban a ser estudiados histológicamente fueron lavados en una mezcla de etanol al 50% (v/v) en agua, rehidratados en agua destilada y congelados en agua previamente a ser cortados en secciones de aproximadamente 10 μm de grosor mediante un criostato. Los cortes se observaron sin teñir y teñidos con una solución de zinc-clorhídrico-yodo para la detección de las paredes celulares (Peacock, 1966). Los cortes sin teñir fueron de igual forma observados entre filtros polarizadores, con y sin la inserción de un filtro coloreado, el cual desarrolla una imagen de color que permite determinar la orientación principal de las microfibrillas en las paredes celulares sin teñir (Bennett, 1950). Así mismo, los cortes teñidos fueron estudiados mediante un filtro de polarización simple bajo la muestra y una plataforma giratoria para detectar efectos del dicroísmo, que permiten determinar la orientación principal de la fibrillas en la pared celular teñida (Roelofsen, 1959). Las fotografías fueron obtenidas mediante un programa de captura de imágenes controlado por un sistema informatizado.

Análisis de los resultados

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el paquete de software JMP (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Los datos fueron representados mediante el paquete de software Sigma Plot 8.0 (SPSS, Inc., UK).

Los valores medios de las propiedades mecánicas se calcularon a partir de los resultados de 10 muestras tomadas de 10 frutos diferentes de un mínimo de cuatro plantas diferentes ($n=10$ piel o cutícula; $n \geq 4$ plantas). Los análisis de correlación y los ajustes por mínimos cuadrados se realizaron a partir de 12 medias, una por cada fuerza de tensión empleada. Las diferencias estadísticas en las pendientes de las curvas de regresión fueron determinadas en base a los intervalos de confianza (95%) de las pendientes, rechazando los ajustes de regresión si $P > 0.0001$. Se tomó la comparación de las medias mediante Tukey-Kramer HSD, con $\alpha=0.05$, de los valores de E , σ_b , y W para determinar las diferencias significativas entre los cultivares.

RESULTADOS



“... y las mariposas, que andan confundidas con las flores, parece que se renuevan, en una metamorfosis de colorines, al revolotar. Es la soledad como un gran pensamiento de luz.”

Juan Ramón Jiménez, Platero y Yo.

CULTIVOS

El crecimiento vegetativo de los tres genotipos cultivados en la Estación Experimental “La Mayora” fue vigoroso, destacando Cascada y Gardeners Delight, aunque esta última registró un crecimiento más lento en las primeras semanas de cultivo pero finalmente igualó el crecimiento de Cascada. Las plantas de Josefina, además de presentar menor vigor en el crecimiento, desarrollaron un follaje menos abundante que dejaba los frutos más desprotegidos. Los tres genotipos cultivados en Cornell, de porte semi-determinado, mostraron un crecimiento menos vigoroso que los anteriores, pero sin diferencias apreciables entre sí.

Las curvas de crecimiento (Figura 3.1) muestran un rápido desarrollo de los frutos, destacando Gardeners Delight que comenzó el cambio de color alrededor de los 30 días después de anthesis (dda), mientras que Josefina y Cascada necesitaron algo más de 35 dda. En Gardeners Delight el paso de verde maduro a rojo maduro fue muy rápido y resultó difícil establecer estadios intermedios, alcanzando el rojo maduro entre los 35 y 40 dda con un diámetro final medio de 34.9 ± 1.9 mm. Los cambios de color de la maduración en los frutos de Josefina y Cascada fueron más graduales y permitieron observar diferentes estadios de maduración entre verde maduro, inicio del cambio de color, pintón y rojo maduro, este último estadio alcanzado después de los 45 dda con diámetros medios de 33.0 ± 1.0 mm en el caso de Josefina y 31.9 ± 2.1 mm para Cascada.

Las curvas de crecimiento de Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100, no se diferenciaron significativamente entre sí, ni tampoco mostraron diferencias con los genotipos Cascada, Josefina o Gardeners Delight. Los valores medios obtenidos para el diámetro transversal de los frutos, una vez alcanzado el estadio maduro, mostraron diferencias significativas entre sí, siendo los valores 30.4 ± 1.6 mm para Inbred 10, 25.5 ± 1.5 mm para Sausalito Cocktail y 21.3 ± 0.9 mm para Sweet 100.

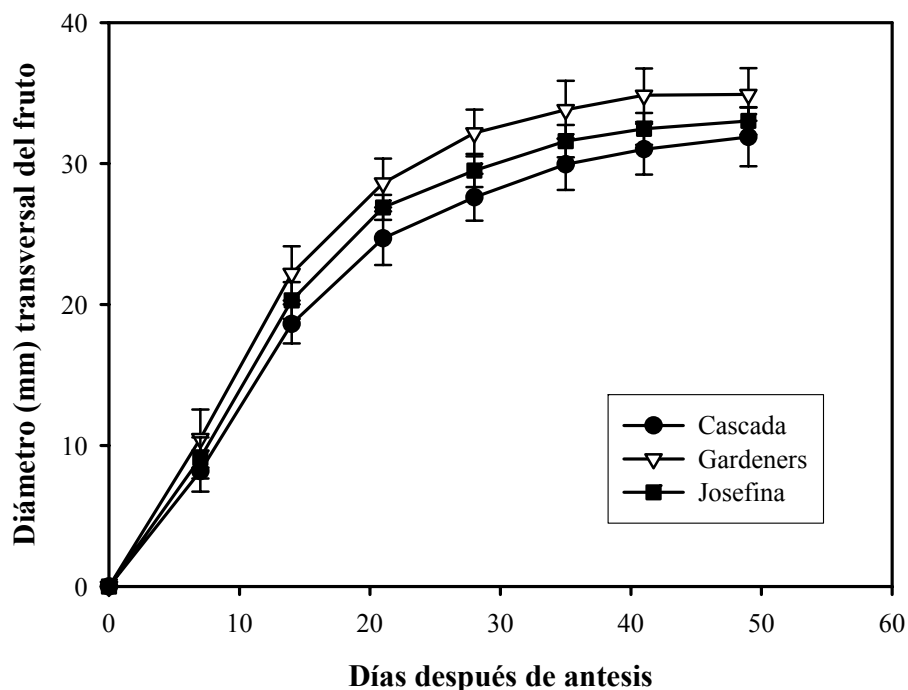


Figura 3.1: Curvas de crecimiento de los frutos de Cascada, Gardeners y Josefina. Medias del diámetro transversal \pm DS con $n = 15$.

Los frutos de Gardeners Delight presentaron una forma esférica marcadamente achatada por los extremos, tomando un color rojo intenso al alcanzar la maduración completa. No eran muy firmes y comenzaron a perder turgencia en pocos días. Algunos de estos frutos presentaron mancha solar en los hombros del fruto, los cuales aparecían más marcados que en los otros dos genotipos. Las propiedades organolépticas de los frutos de Gardeners Delight (Tabla 3.1), unidas a su baja producción de frutos comerciales explicarían por qué este genotipo hace tiempo que no se usa en cultivos comerciales. Josefina, por el contrario, presentó los valores más elevados de acidez y °Brix, al tiempo que bien balanceados, y una buena producción comercial. Sus frutos presentaron una forma esférica, sin hombros marcados y con una firmeza muy buena, tomando una tonalidad anaranjada-roja cuando alcanzaron la maduración. Finalmente, Cascada presentó los valores de producción más elevados, aunque sin diferencias significativas con Josefina, y unos buenos niveles en sus caracteres organolépticos. Sus frutos, esféricos y ligeramente achatados por los extremos, tomaron un tono rojo apagado cuando alcanzaron la maduración completa.

Tabla 3.1: Producción y características de los frutos de Gardeners, Josefina y Cascada. La producción se estimó teniendo en cuenta sólo los frutos comerciales. Los valores corresponden a las medias \pm DS (Para la estimación del Peso, $n \geq 150$ frutos; el Diámetro, $n = 15$ frutos; Producción, $n = 3$ bloques; Acidez y °Brix, $n = 3$ a partir de 10 frutos).

Genotipo	Peso (g)	Diámetro (mm)	Producción (kg·m ⁻²)	Acidez (mEq)	°Brix
Gardeners Delight	17.53 \pm 1.75	34.9 \pm 1.9	1.42 \pm 0.43	6.75 \pm 1.57	6.0 \pm 1.2
Josefina	14.95 \pm 0.53	33.0 \pm 1.0	3.50 \pm 0.88	9.78 \pm 0.85	8.1 \pm 0.8
Cascada	18.21 \pm 1.18	31.9 \pm 2.1	4.50 \pm 0.70	8.10 \pm 1.30	7.2 \pm 0.4

Agrietado natural durante el cultivo.

La tasa de agrietado mostró diferencias significativas (Tukey-Kramer HSD, con $\alpha=0.05$) entre los tres genotipos en el total del cultivo, así como en las distintas recogidas. Gardeners Delight mostró una tasa superior al 63.7% de los frutos recogidos mientras que Josefina registró un agrietado tres veces inferior, con el 21.8% de los frutos recolectados presentando grietas. Finalmente, Cascada fue el genotipo con un menor agrietado presentando sólo 1.7% de los frutos recogidos (Figura 3.2).

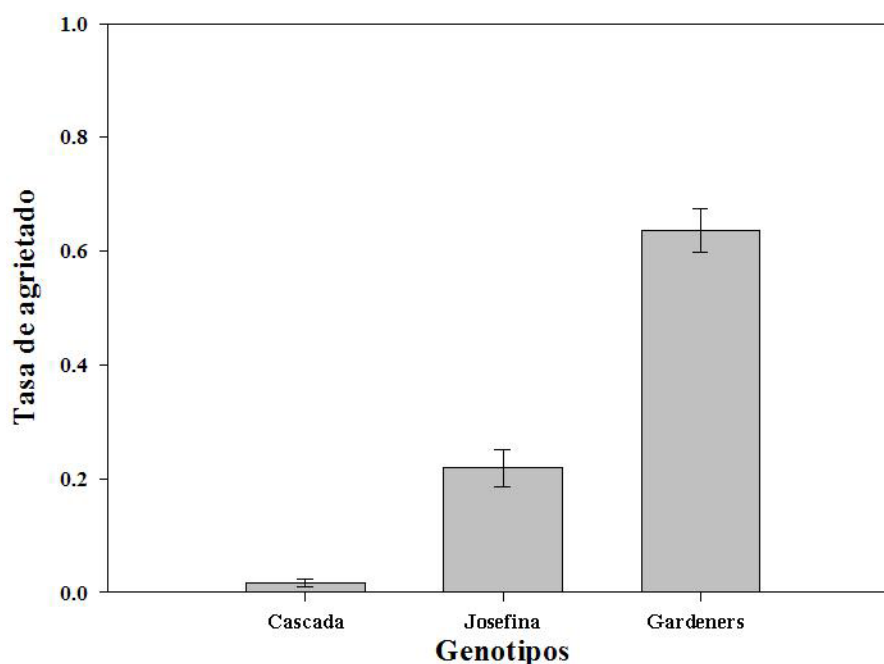


Figura 3.2: Diferencias en la susceptibilidad al agrietado reflejado como la tasa de agrietado, en tanto por uno, de Cascada (C), Josefina (J) y Gardeners (G) a lo largo de todo el cultivo. Media \pm error típico con $n = 3$ bloques.

Tras finalizar el cultivo realizado en Cornell, la tasa de agrietado acumulada para todo el periodo permitió establecer diferencias significativas entre los tres genotipos. Así, Inbred 10 mostró una tasa inferior al 2 % de los frutos recogidos mientras que Sausalito Cocktail registró un agrietado muy superior, con el 30 % de los frutos recolectados presentando grietas. Finalmente, Sweet 100 fue el genotipo con un mayor agrietado, presentando el 55 % de los frutos recogidos grietas, principalmente de tipo longitudinal.

La evolución del agrietado a lo largo del cultivo en La Mayora mostró variaciones que no se pudieron correlacionar con variaciones en las condiciones ambientales. Aunque estas variaciones no fueron significativas para Cascada, que osciló entre el 0 y el 4.4% de agrietado (Figura 3.3A), sí hubo diferencias significativas (Tukey-Kramer HSD, con $\alpha=0.05$) para Josefina registrando valores entre el 17 y el 36% de los frutos agrietados (Figura 3.3B). Gardeners Delight, que mostró un tendencia a disminuir el agrietado a lo largo del cultivo, presentó un rango de valores entre el 42 y el 89% de agrietado en las recogidas (Figura 3.3C).

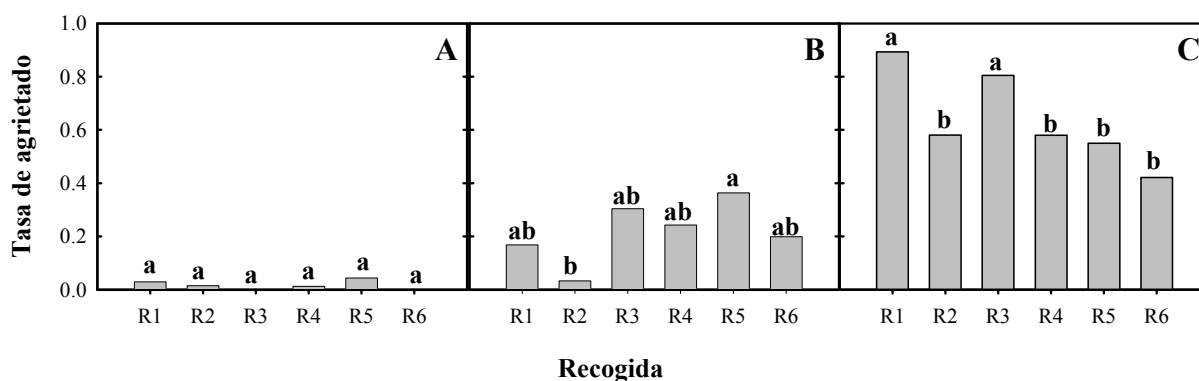


Figura 3.3: Tasa de agrietado, en tanto por uno, registrada en 6 recogidas distintas (R) a lo largo del cultivo para Cascada (A), Josefina (B) y Gardeners Delight (C). R1= 67 días después del trasplante (ddt), R2=76 ddt, R3= 89 ddt, R4=102 ddt, R5= 124 ddt y R6= 140 ddt. Para cada genotipo, los valores no conectados con la misma letra son significativamente diferentes mediante Tukey-Kramer HSD, con $\alpha=0.05$.

Inducción del agrietado: efecto mojado.

La inducción de agrietado mediante la inmersión de los frutos en agua produjo un incremento significativo en el número de frutos agrietados de los genotipos menos susceptibles, Josefina y Cascada, respecto a los testigos incubados en aire el mismo tiempo y a igual temperatura (Figura 3.4).

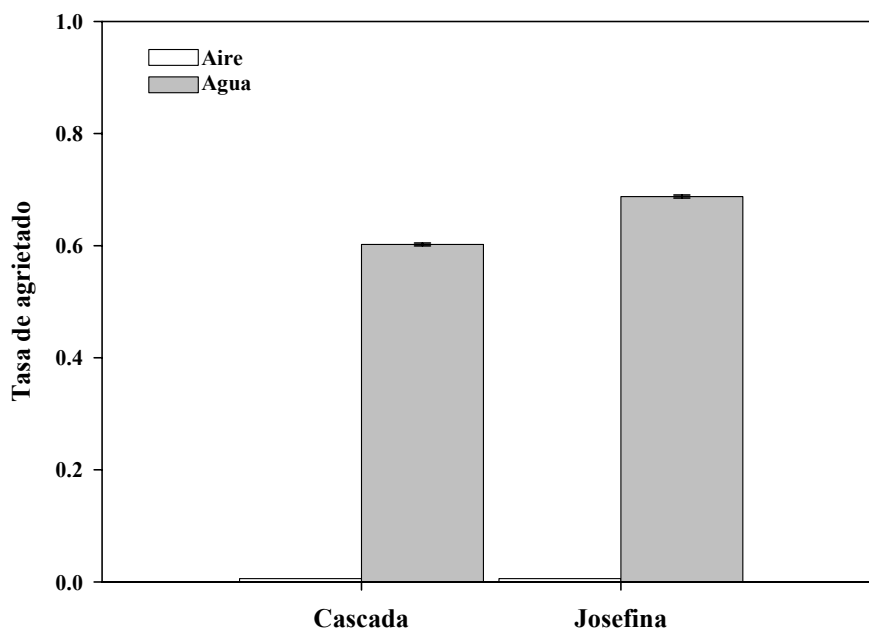


Figura 3.4: Comparación de la tasa de agrietado, en tanto por uno, de frutos recolectados incubados en aire o en agua. Probabilidad de agrietado $\pm E_p$.

Entrada de agua al fruto.

Para determinar si el agrietado de los frutos incubados en inmersión se debía a la entrada de agua se determinó la variación de peso de los frutos a las dos horas de la inmersión, pero no se pudo establecer una correlación clara entre la toma de agua y el agrietado posterior. Aunque los frutos de Gardeners Delight registraron un incremento en peso significativamente superior al de los otros genotipos (Tukey-Kramer HSD, con $\alpha=0.05$), el incremento en volumen causado por la entrada de agua no se pudo relacionar con la distinta susceptibilidad al agrietado entre los genotipos (Figura 3.5).

Teniendo en cuenta el diámetro medio de los frutos de cada genotipo, el aumento de la superficie causado por el incremento de volumen del agua que entró al fruto fue de 0.043 ± 0.019 % en el caso de los frutos de Cascada, 0.018 ± 0.010 % para los frutos de Josefina y 0.214 ± 0.101 % para los frutos de Gardeners Delight. Este aumento de la superficie del fruto no pudo correlacionarse con la susceptibilidad al agrietado.

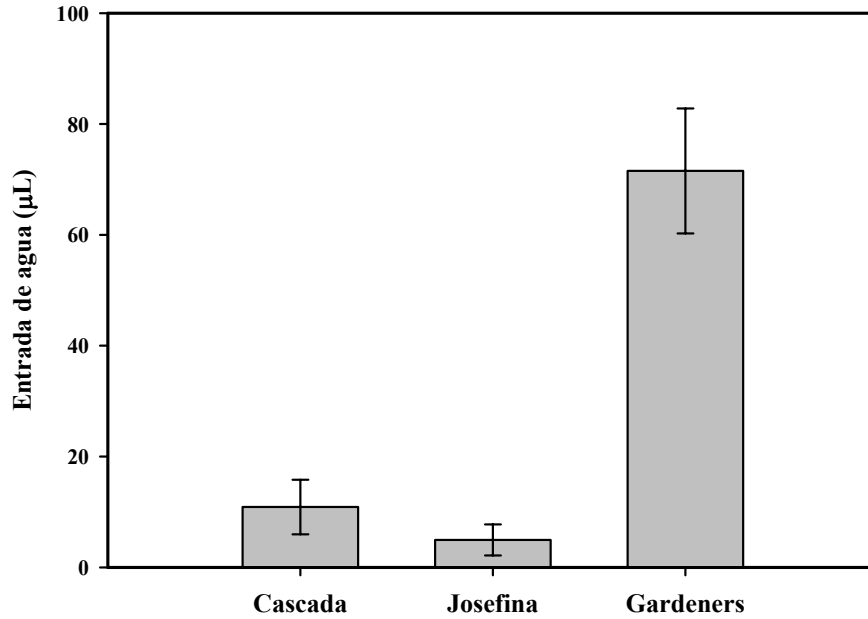


Figura 3.5: Entrada de agua a las dos horas de inmersión de los frutos en Cascada, Josefina y Gardeners. Media \pm error típico con n=19 para Cascada y Josefina y n=9 para Gardeners Delight.

Efecto de la temperatura

La tasa de agrietado inducido varió según la temperatura a la que se realizó el ensayo (Figura 3.6). A una temperatura de 12 °C las tasas de agrietado obtenidas reflejaron las diferencias en susceptibilidad de los distintos genotipos. Esta relación se mantuvo en términos generales a 35 °C pero el incremento de agrietado, resultante del aumento en la temperatura, fue diferente según el genotipo. Se observó un mayor efecto sobre el genotipo más resistente, Cascada, mientras que los incrementos de Josefina y Gardeners Delight fueron menores.

De los diferentes ensayos de inmersión para inducir agrietado realizados al tiempo que las recolecciones de frutos en las que se estimó el agrietado natural, se pudo observar que las condiciones en las que se realizaba la inmersión influían en la tasa de agrietado de los distintos genotipos. Los resultados, recogidos en la Tabla 3.2, indicaron que las condiciones de ensayo que mejor se ajustaron a las diferencias observadas en el agrietado natural fueron la incubación a 12 °C y durante un corto periodo de tiempo, aproximadamente 2 horas, alcanzando en este caso un valor de correlación, r , de 0.988. Dicha correlación seguía siendo alta, $r = 0.804$, cuando se prolongaba el tiempo de incubación a un período alrededor de 23 horas.

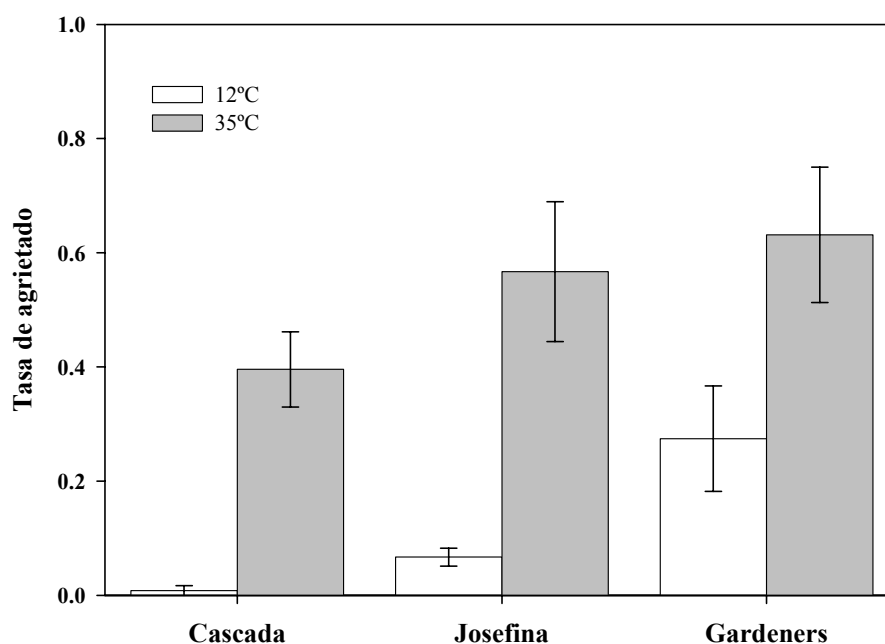


Figura 3.6: Efecto de la temperatura sobre la tasa de agrietado, en tanto por uno, inducido en Cascada, Josefina y Gardeners.

Cuando la inducción se realizó a 23 °C las tasas de agrietado fueron muy elevadas, alcanzando en algunos casos el 100% de frutos agrietados, incluso para periodos de incubación cortos como 2 horas. En estos casos no se obtuvieron buenas correlaciones entre el agrietado natural y el inducido, tal como indicaron los correspondientes coeficientes de correlación.

El resultado de agrietado inducido que más se desvió del agrietado natural fue el correspondiente a Gardeners Delight, obteniéndose tasas de agrietado inferiores a Josefina.

Tabla 3.2: Tasas de agrietado natural de las recogidas R2 y R6 y las correspondientes tasas de agrietado inducido (en tanto por uno) para los genotipos Cascada, Josefina y Gardeners Delight, a dos temperaturas y tiempos de incubación distintos. Se muestran los valores de correlación (r) entre las tasas de agrietado natural e inducido a distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación para las dos recogidas distintas.

	12 °C			23 °C		
	R2	2 h	23 h	R6	2 h	23 h
Cascada	0.012	0.017	0.267	0	0.330	0.794
Josefina	0.026	0.083	0.554	0.198	0.690	0.971
Gardeners Delight	0.612	0.367	0.733	0.414	0.513	0.769
r		0.988	0.804		0.487	-0.138

Anatomía de la piel y la cutícula

El estudio anatómico de los genotipos Cornell Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100 reveló diferencias significativas entre ellos. La microscopía óptica reveló que la piel del fruto de los tres genotipos estaba compuesta por una cutícula sobre las células epidérmicas y bajo estas varias capas de células tipo colénquima (Figura 3.7A-C). Sobre este patrón común se observaron diferencias muy significativas entre los tres genotipos. Concretamente, Inbred 10 presentó la piel más gruesa debido tanto al mayor grosor de la epidermis como del colénquima subyacente. Así, este genotipo presentó un mayor grosor de la cutícula que cubre la pared periclinal externa de las células epidérmicas, epicarpo y además, las paredes celulares cutinizadas se extendieron entre dos y tres capas celulares desde la superficie, con las paredes anticlinales cutinizadas fuertemente unidas a las periclinales internas, incluso en las hipodérmicas y siempre manteniendo un grosor mayor que los otros dos genotipos (Figura 3.7A). Frente a un epicarpo de $14.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ de Inbred 10, en Sausalito Cocktail se observó un epicarpo de $9.30 \pm 0.04 \mu\text{m}$ y una deposición del material cutinado hasta la pared periclinal interna de las células epidérmicas, llegando a las paredes anticlinales de la capa subepidérmica (Figura 3.7B). El epicarpo de Sweet 100 poseía un grosor de $6.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ y el material cutinado se limitó a las paredes anticlinales de las células epidérmicas, mostrándose en el corte histológico como una característica invaginación, que aparecía unida mediante una zona cutinizada extremadamente fina en las paredes periclinales internas de las células epidérmicas (Figura 3.7C).

En los tres genotipos se observó la presencia de material de naturaleza celulósica embebido en las zonas cutinizadas. Este material celulósico, similar en cuanto a sus propiedades ópticas a las paredes de las células de colénquima, era difícilmente detectable en las muestras no teñidas bajo luz no polarizada, especialmente en Inbred 10 (Figura 3.7A). En Sausalito Cocktail y Sweet 100 este material aparecía como un área entre transparente y gris a lo largo de las paredes anticlinales y periclinal externa de las células epidérmicas (Figura 3.7 B-D). La tinción con “clorhídrico-zinc-yodo” permitió detectar este material celulósico en las muestras de los tres genotipos estudiados (Figura 3.7 E, F), observándose en Inbred 10 que el material se extendía manteniendo un grosor uniforme por las paredes de las células epidérmicas y subepidérmicas. Así mismo, este material fue observado en las muestras de cutícula aislada de las tres variedades (Figura 3.7 F-H), apreciándose que en Sweet 100 el material se acumuló principalmente en las

paredes anticlinales de las células y, en menor medida, en las paredes periclinales internas (Figura 3.7 C, D).

El dichroísmo que presentaron las paredes tras su tinción, así como el uso de un filtro coloreado en las muestras no teñidas (Figura 3.7 G, H), indicó que la orientación neta de las microfibrillas que forman el material celulósico siguió principalmente las paredes periclinales en Inbred 10 (Figura 3.7 F) pero no en Sweet 100 (Figura 3.7 E, G y H).

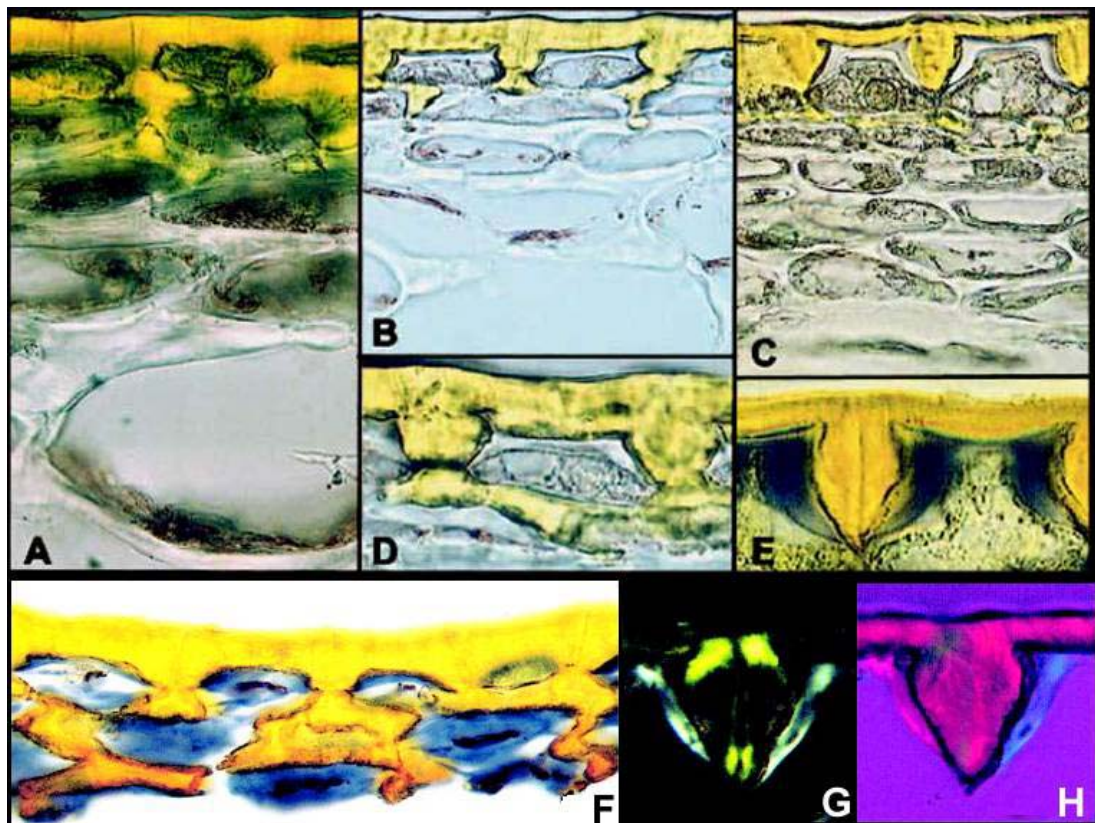


Figura 3.7: Secciones de la piel y la cutícula aislada de frutos de tomate. **A:** Piel sin teñir de Inbred 10, 570×. La cutícula, en amarillo, se extiende hacia el interior hasta 2-3 capas de células, intercalándose en el colénquima. **B:** Piel sin teñir de Sausalito Cocktail, 570×. **C:** Piel sin teñir de Sweet 100, 570×. La cutícula se extiende hasta la pared periclinal interna de las células epidérmicas, límite superior del colénquima. En la célula epidérmica de la izquierda se observa una pared anticlinal cutinizada en visión tangencial, permitiendo ver que las conexiones entre las paredes anticlinales cutinizadas y las periclinales internas cutinizadas son débiles. **D:** Detalle de una célula epidérmica sin teñir de Sausalito Cocktail, 1040×. Se observa la pared periclinal interna cutinizada en lugar de ser de tipo colénquima como se observa en B. **E:** Piel de Sweet 100 teñida con clorhídrico-zinc-yodo, 1700×. Las paredes con celulosa se observan en gris oscuro y se hinchan en contacto con el colorante. **F:** Cutícula aislada de Inbred 10 teñida con clorhídrico-zinc-yodo, 560×. Las paredes con celulosa se observan en gris oscuro. **G y H:** Cutícula aislada de Sweet 100 no teñida y observada bajo luz polarizada (G) y con un filtro coloreado (H), 1150×. Las paredes con celulosa orientada de forma oblicua muestran actividad óptica en G y un cambio al color complementario en H, mostrando que la orientación neta de la fibrillas en la pared sigue la orientación oblicua de la pared.

Propiedades mecánicas de la piel y la cutícula aislada

Al igual que los estudios anatómicos del pericarpo, las propiedades mecánicas de la piel y su correspondiente cutícula aislada se estudiaron a partir de los frutos de los genotipos Cornell Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100. La comparación entre las propiedades mecánicas tanto de muestras de piel como de cutícula aislada mostró que el material es isotrópico, no registrando diferencias en el comportamiento mecánico en función de la dirección de aplicación de las fuerzas de tensión. Por tanto, para simplificar la presentación, se detallarán los resultados de las muestras extraídas longitudinalmente.

Ensayos de fluencia

La tasa de fluencia, observada en las muestras de piel, decreció cuando las muestras fueron sometidas progresivamente a mayores fuerzas de tensión (Figura 3.8A). Con una fuerza de 0.1 N la tasa de fluencia para Sweet 100 fue, en valor medio, un 40% más rápida que la de Inbred 10 (respectivamente 0.106 y 0.076 s⁻¹), siendo estas diferencias significativas. Sin embargo, cuando se aplicaron mayores fuerzas de tensión de forma progresiva, la diferencia en la tasa de fluencia de la piel entre ambos genotipos disminuyó y resultó estadísticamente indistinguible para fuerza iguales o mayores o iguales a 0.25 N. Del mismo modo, cuando las muestras fueron inicialmente estiradas con 0.65 N, la tasa de fluencia para los dos genotipos mostró diferencias significativas, decreciendo bruscamente con 0.60 N, y permaneciendo invariable cuando se aplicaron menores fuerzas de tensión (Figura 3.8B).

No se observaron diferencias significativas para la deformación elástica instantánea de la piel, registrada a los 4 s de la aplicación de la fuerza, cuando se aplicaron progresivamente fuerzas cada vez mayores (Figura 3.9A). Por el contrario, la tasa a la que la deformación plástica, estimada por la pendiente de la recta de la acumulación de la deformación plástica en función de las fuerzas de tensión acumulada en el material, fue ligeramente mayor para la piel de Sweet 100 que para la de Inbred 10 (Figura 3.9B). Al final del proceso, la piel de Inbred 10 alcanzó una mayor deformación plástica comparada con la piel de Sweet 100 (Figura 3.9B). Estos resultados se interpretan como indicativos de que la piel es un material biológico compuesto, de naturaleza viscoelástica y que presenta fenómenos de endurecimiento al deformarse, siendo la piel de Inbred 10 la que soporta mayores deformaciones plásticas.

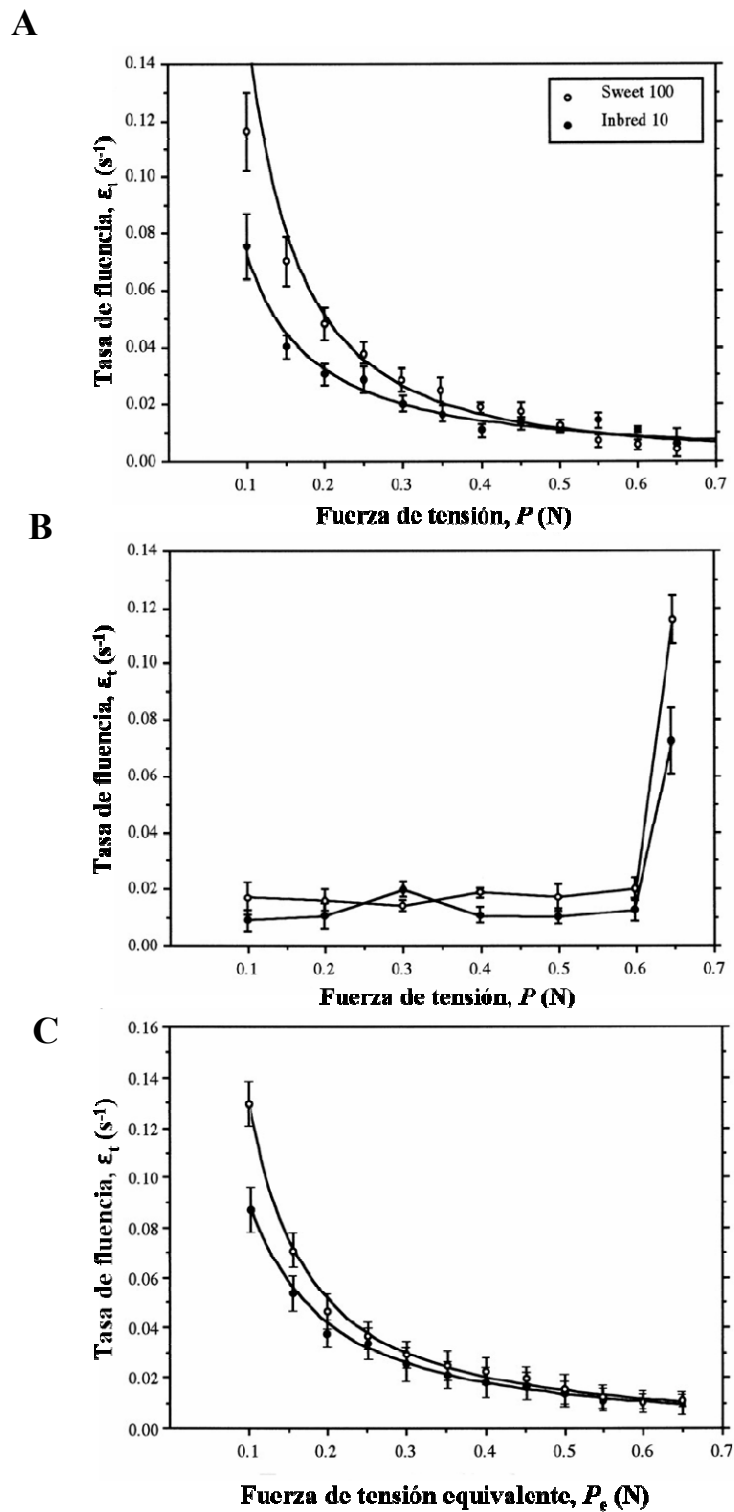


Figura 3.8: Comparación entre las tasas de fluencia, ϵ_t , de la piel de Sweet 100 e Inbred 10 y sus correspondientes cutículas. **A:** Tasa de fluencia de la piel frente a una secuencia ascendente de fuerzas de tensión (0.1 – 0.65 N, en incrementos de 0.05 N). La tasa de fluencia disminuye. **B:** Tasas de fluencia de la piel frente a una secuencia descendente de fuerzas de tensión (0.65 – 0.1 N, en disminuciones de 0.1 N entre 0.1 y 0.6 N). No se encontraron diferencias significativas para ϵ_t en cargas inferiores a 0.65 N. **C:** Tasa de fluencia de la cutícula de Sweet 100 e Inbred 10 frente a fuerzas de tensión equivalentes P_e .

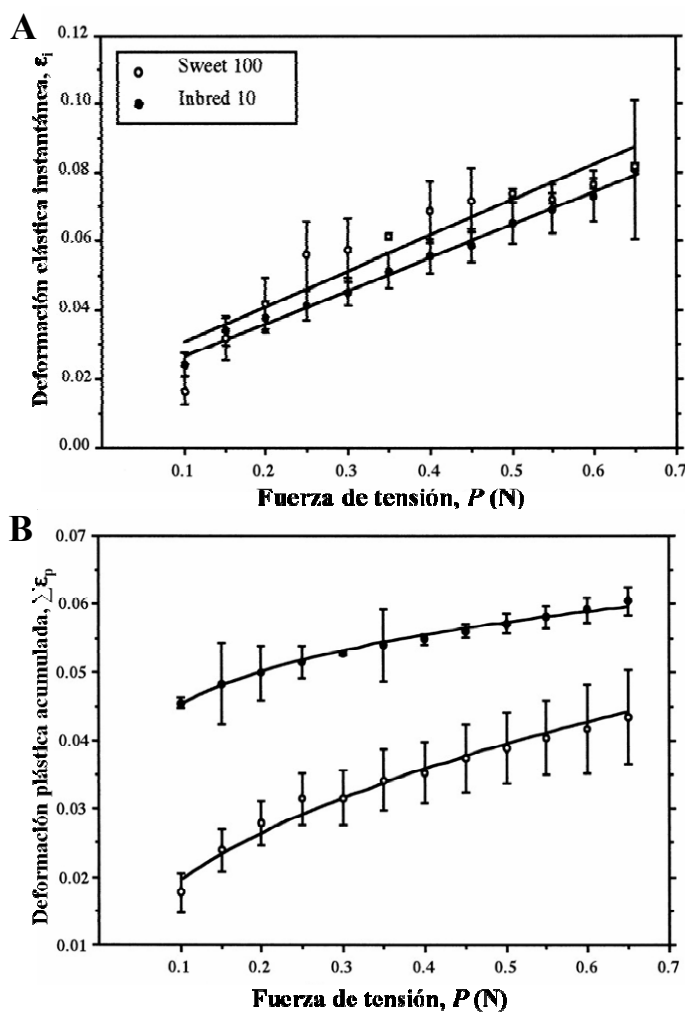


Figura 3.9: Deformación elástica instantánea, ϵ_i , y deformación plástica acumulada, $\sum \epsilon_p$, de la piel de Sweet 100 e Inbred 10 obtenida a partir de los ensayos de fluencia con fuerzas de tensión progresivamente ascendentes (0.1 – 0.65 N, en incrementos de 0.05 N). **A:** Deformación elástica instantánea frente a las fuerzas de tensión. Las líneas sólidas representan curvas de regresión lineal; $r^2 = 0.995$ para Sweet 100 y $r^2 = 0.937$ para Inbred 10. **B:** Deformación plástica acumulada frente a las fuerzas de tensión. Las líneas sólidas representan curvas de regresión logarítmica; $r^2 = 0.995$ para Sweet 100 y $r^2 = 0.937$ para Inbred 10.

Los ensayos mecánicos realizados con la cutícula aislada de los mismos frutos a los que se les estudió la piel mostraron que, al aplicar progresivamente fuerzas de tensión equivalentes P_e , la tasa de fluencia decreció con una relación lineal logarítmica para ambos genotipos (Figura 3.8C). La tasa de fluencia para la cutícula de Inbred 10 fue significativamente menor que la mostrada por la cutícula de Sweet 100 para fuerzas de tensión menores de 0.2 N. La comparación entre las tasas de fluencia de la piel y la correspondiente cutícula aislada no mostró diferencias significativas. Al igual que para la piel, los ensayos de fluencia realizados con fuerzas de tensión equivalentes mostraron que la cutícula de ambos genotipos se endurecían progresivamente al deformarse.

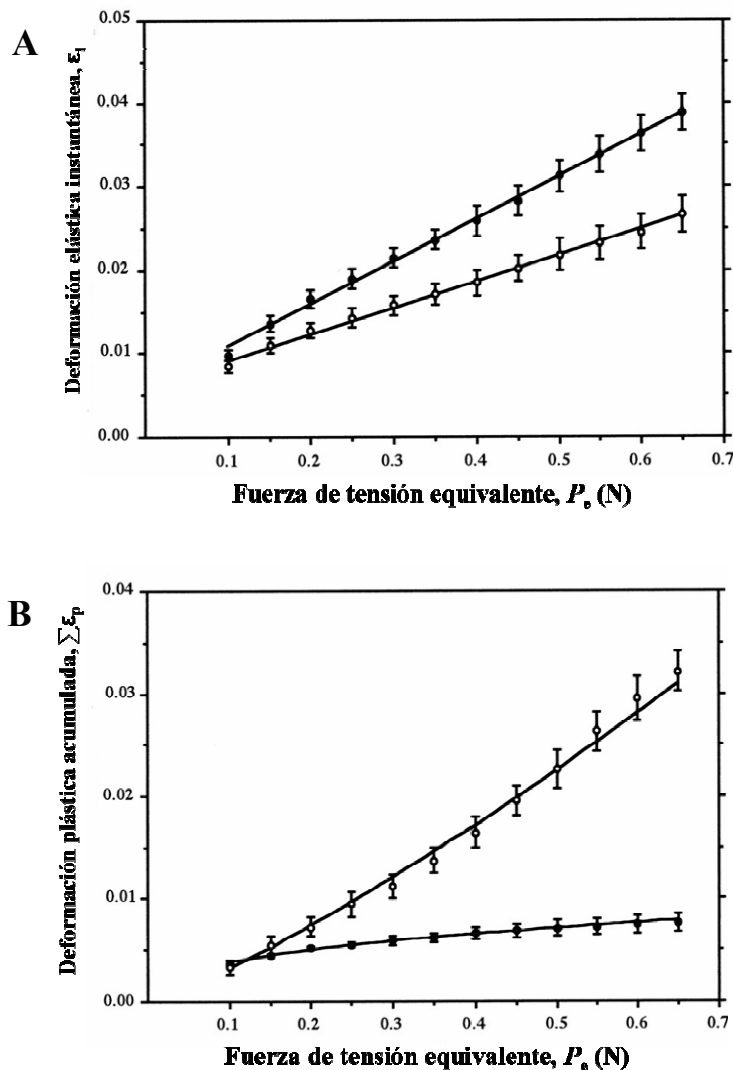


Figura 3.10: Deformación elástica instantánea, ϵ_i , y deformación plástica acumulada, $\sum \epsilon_p$, de la cutícula de Sweet 100 e Inbred 10 obtenida a partir de los ensayos de fluencia con fuerzas de tensión equivalente, P_e , progresivamente ascendentes (0.1 – 0.65 N, en incrementos de 0.05 N). **A:** Deformación elástica instantánea de la cutícula frente a P_e . Las líneas sólidas representan curvas de regresión lineal; $r^2 = 0.989$ para Sweet 100 y $r^2 = 0.978$ para Inbred 10. **B:** Deformación plástica acumulada de la cutícula frente a P_e . Las líneas sólidas representan curvas de regresión logarítmica; $r^2 = 0.988$ para Sweet 100 y $r^2 = 0.964$ para Inbred 10.

A partir de los resultados de los ensayos de fluencia, se observó una buena correlación lineal entre los valores de deformación elástica instantánea y las fuerzas de tensión equivalentes aplicadas; esta deformación aumentó más rápidamente para la cutícula de Inbred 10 que para las cutícula de Sweet 100 (Figura 3.10A). La acumulación de deformación plástica en la cutícula fue mucho más rápida en el caso de Sweet 100 en comparación con Inbred 10 (Figura 3.10B). Así, la deformación total y la componente plástica (permanente) de ésta observadas para la cutícula de Sweet 100, superaron ampliamente las de Inbred 10.

Ensayos de carga-descarga secuencial

Siguiendo con la caracterización biomecánica de los tres genotipos estudiados en la Universidad de Cornell (Cornell Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100), se realizaron ensayos de carga-descarga secuencial (cíclicos). Los resultados de estos ensayos confirmaron, al igual que los ensayos de fluencia, que la piel de los tres genotipos aumentó su rigidez (se endurecía al deformarse) cuando se extendía y dejaba relajar repetidamente. El módulo de Young, E , aumentó al incrementar las fuerzas de tensión mostrando una correlación lineal logarítmica (Figura 3.11A). Se observaron diferencias para los tres genotipos en los valores de E y en la velocidad a la que el material se endureció por la deformación, parámetro estimado por la pendiente de la recta entre los valores de E y la fuerza aplicada. La piel del genotipo resistente, Inbred 10, incrementó su rigidez más rápidamente que aquellas procedentes de los genotipos intermedio, Sausalito Cocktail, y susceptible, Sweet 100. Para pequeñas fuerzas de tensión, esto es $0.1 \text{ N} \leq P \leq 0.4 \text{ N}$, no se observaron diferencias significativas en el módulo de Young de la piel de estos tres genotipos (Figura 3.11A). Sin embargo, para fuerzas de tensión más elevadas, $P \geq 0.35 \text{ N}$, las diferencias en los módulos entre cualquiera de los tres genotipos fueron estadísticamente significativas (comparación de todas las medias mediante Tukey-Kramer HSD con $\alpha=0.05$).

El comportamiento de la cutícula aislada de Inbred 10 fue significativamente distinto de los otros dos genotipos, especialmente cuando se aplicaron cargas elevadas (Figura 3.11B). Mientras que las cutículas de los tres genotipos mostraron un incremento inicial en los valores de E , el genotipo más resistente no mostró fatiga por deformación es decir, una disminución en los valores de E al incrementarse las fuerzas de tensión equivalentes progresivamente. Las cutícula de Sausalito Cocktail y Sweet 100 mostraron fatiga por deformación cuando la fuerza de tensión equivalente fue superior a 0.45 N siendo las cutícula del genotipo más susceptible al agrietado, Sweet 100, la que mostró un fenómeno de fatiga más acusado que los otros genotipos como pudo observarse por la pendiente de la curva, un polinomio de segundo orden.

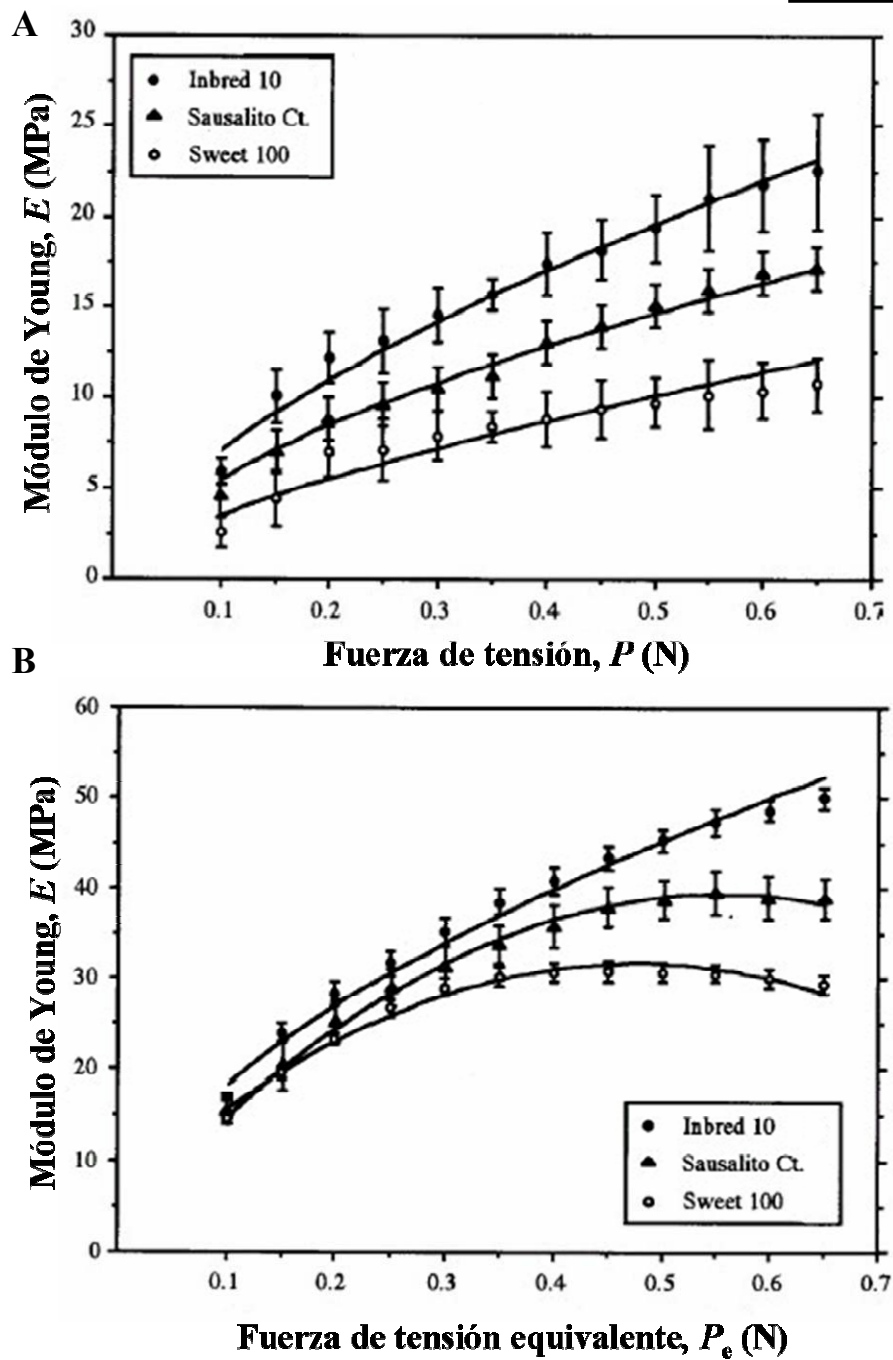


Figura 3.11: Valores del Módulo de Young (E) de la piel de los frutos, **A**, y de la cutícula, **B**, cuando las muestras se sometieron secuencialmente a extensiones y relajaciones (ciclos de carga y descarga con incremento progresivo del valor de carga). Las líneas representan curvas de regresión lineal, en el caso de la piel (**A**) y polinómicas de segundo orden para la cutícula (**B**). En general, para los diferentes ajustes, $0.92 \leq r^2 \leq 0.98$, con $n = 12$ basándose en el análisis de 10 muestras en cada caso.

Ensayos de fractura por tensión

La piel y la cutícula aislada de los frutos de Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100 fueron sometidas a ensayos de tensión hasta provocar la fractura mecánica de la muestra. El resultado de los ensayos indicó que el módulo de Young (E , rigidez medida en tensión) de la piel del genotipo más resistente al agrietado así como el de su cutícula fueron significativamente mayores que los del genotipo más susceptible (Tukey-Kramer HSD, con $\alpha=0.05$). También el trabajo de fractura (W , energía necesaria para propagar una fractura a través del material), de las muestras de cutícula fue mayor en el caso de Inbred 10 si se compara con Sweet 100, presentando un valor de esfuerzo de fractura, σ_b , similar para ambos genotipos en las muestras de piel y mayor en las de cutícula. La comparación estadística de los valores medios de E indicó que la rigidez de la piel y de la cutícula del genotipo intermedio, fueron indistinguibles tanto del genotipo resistente como del susceptible. Sin embargo, se pudo observar claramente que los datos obtenidos a partir de la piel y la cutícula de Sausalito Cocktail se situaron cualitativamente de forma intermedia entre los de Inbred 10 y los de Sweet 100 (Figura 3.12). La misma tendencia se observó para el esfuerzo en el punto de fractura (σ_b , solidez medida en tensión) (Figura 3.13), y para la energía necesaria para propagar la fractura, W (Figura 3.14).

En cualquiera de los genotipos, la comparación entre los módulos de Young, los esfuerzos de fractura y los trabajos de fractura de la piel respecto a la cutícula indicó que la cutícula es substancialmente más rígida. En el caso de las muestras de piel de Inbred 10, el valor medio de E fue de 43.5 MPa, mientras que su cutícula mostró un valor medio de 70.3 MPa. Por el contrario, los resultados de W obtenidos en las muestras de piel fueron mayores que los de cutícula. Para Inbred 10, el valor de W de su piel fue de 151 J/m² mientras que su cutícula registró un valor de 95 J/m². Para cualquiera de los genotipos, los valores de σ_b fueron muy similares entre los dos tipos de muestras.

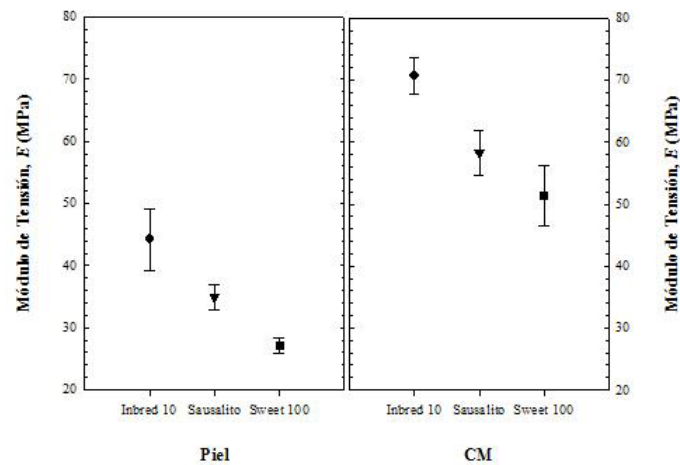


Figura 3.12: Valores del módulo de Young de la piel del fruto y de la cutícula de los frutos de Cornell Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100. Los datos representan medias \pm errores típicos a partir de 10 muestras en cada caso.

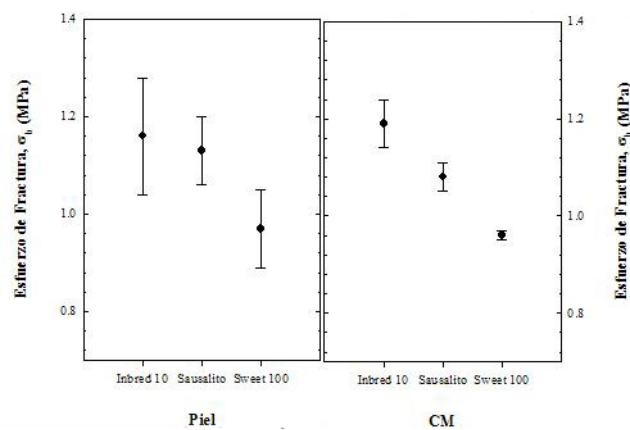


Figura 3.13: Valores esfuerzo de fractura de la piel del fruto y de la cutícula de frutos de Cornell Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100. Los datos representan medias \pm errores típicos a partir de 10 muestras en cada caso.

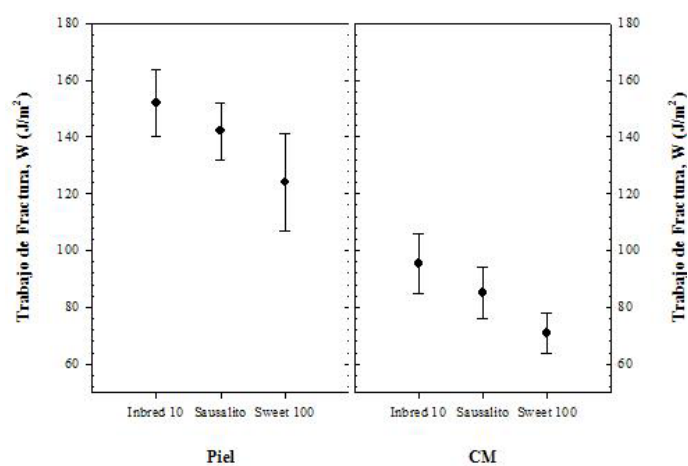


Figura 3.14: Valores esfuerzo de trabajo de fractura de la piel y de la cutícula de frutos de Cornell Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100. Los datos representan medias \pm errores típicos a partir de 10 muestras en cada caso.

Composición de la cutícula aislada

Los estudios de composición de la cutícula aislada se realizaron a partir de material obtenido de los genotipos cultivados en La Mayora (Cascada, Josefina y Gardeners Delight).

Extracción enzimática

En la extracción enzimática de la cutícula (cutícula) de fruto de tomate se obtuvo un rendimiento que osciló entre 1.28 ± 0.03 mg de cutícula por gramo de peso fresco de fruto (gpf) para Gardeners Delight y 1.81 ± 0.02 mg cutícula gpf¹ para Cascada. Mediante una inspección visual del material aislado se pudo constatar que no se había producido daño aparente a las cutículas aisladas.

Componentes principales

El componente mayoritario de la cutícula aislada fue la cutina, representando alrededor del 80% en peso de la cutícula, oscilando entre el 79.7% de Gardeners Delight y el 81.4% de Josefina (Tabla 3.3). A la cutina le siguió en importancia los denominados compuestos hidrolizables variando entre el 14.7% de Gardeners y el 15.1% de Cascada. Por último, las ceras constituyeron aproximadamente el 5% en peso de la cutícula, variando los valores medios entre el 4.48% en peso de cutícula de Josefina y el 5.67% de Gardeners.

Tabla 3.3: Media \pm error típico de los componentes principales, expresadas como tanto por ciento del peso inicial, de las cutículas aisladas de frutos de Cascada, Josefina y Gardeners Delight. Media \pm error típico con n=3 extracciones independientes a partir de cutículas procedentes de 25 frutos.

	% Ceras	% Comp. Hidrolizables	% Cutina
Cascada	4.88 ± 0.46	15.12 ± 0.79	80.00 ± 0.34
Josefina	4.48 ± 0.04	14.84 ± 0.64	81.35 ± 0.57
Gardeners Delight	5.67 ± 0.26	14.67 ± 0.91	79.68 ± 0.62

No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de los componentes principales de la cutícula obtenidos para los distintos genotipos, pero las diferencias entre los distintos componentes de la cutícula si fueron significativas para todos los genotipos (Figura 3.15).

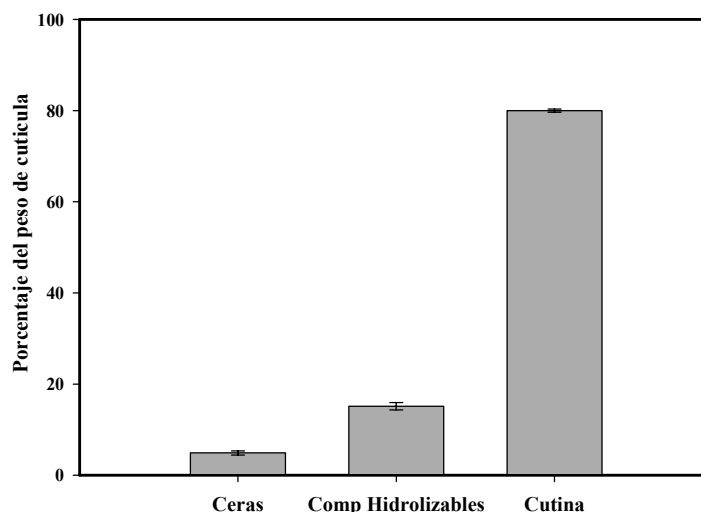


Figura 3.15: Distribución de los componentes principales de la cutícula de Cascada. Media \pm error típico con $n=3$ extracciones independientes a partir de cutículas procedentes de 25 frutos

Cantidad de cutícula por unidad de área

Los valores obtenidos para la cantidad de cutícula por unidad de área mostraron que no existieron diferencias significativas entre las cutícula de Josefina y Gardeners, pero sí de estos dos genotipos con las cutícula de Cascada (Figura 3.16 y Tabla 3.4). La tendencia fue similar para las cutículas de Sausalito Cocktail y Sweet100 respecto a Inbred 10, aunque entre estos tres genotipos las diferencias sí fueron significativas (Figura 3.16).

Teniendo en cuenta la cantidad total de cutícula por unidad de área y los porcentajes de cada uno de los componentes principales de estas cutícula, la distribución de estos componentes en cantidad del componente por unidad de área (Tabla 3.4) mostró diferencias significativas de Cascada respecto a los otros dos genotipos tanto en la cantidad de cutina ($1513 \mu\text{g cm}^{-2}$) como en compuestos hidrolizables ($286 \mu\text{g cm}^{-2}$). La diferencia, para la cantidad de ceras, solo fue significativa respecto a Josefina, que mostró el menor valor de los tres genotipos, $58.5 \mu\text{g cm}^{-2}$.

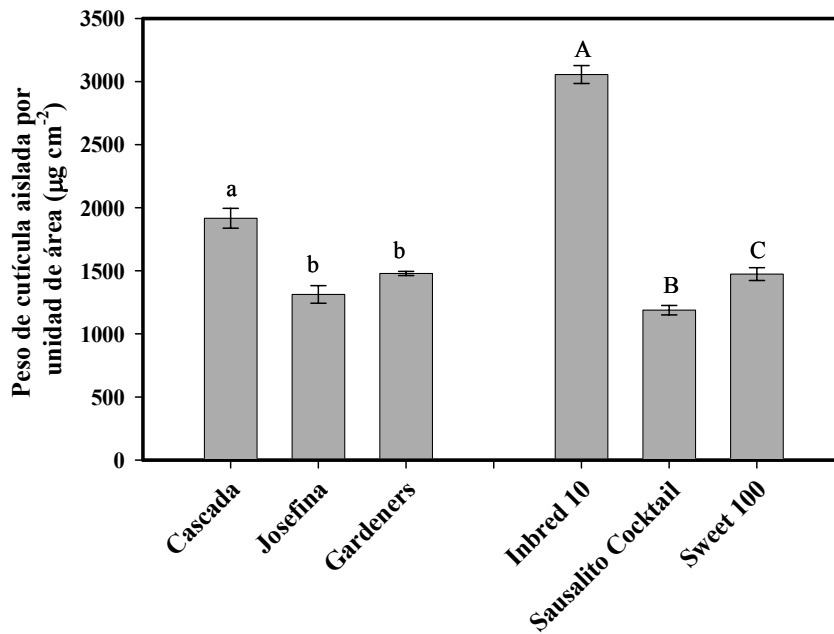


Figura 3.16: Distribución de los valores de peso de cutícula por unidad de área de los genotipos cultivados en la Estación Experimental “La Mayora” (Cascada, Josefina y Gardeners Delight) y en la Universidad de Cornell (Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100). Comparación de las medias agrupados los genotipos por cultivo mediante Tukey-Kramer HSD con $\alpha=0.05$, $n=3$. Valores con la misma letra, dentro del mismo cultivo, no son significativamente distintos.

Tabla 3.4: Media \pm error típico de la cantidad de cutícula total y componentes principales por unidad de área, en $\mu\text{g cm}^{-2}$, de Cascada, Josefina y Gardeners Delight. Comparación de las medias mediante Tukey-Kramer HSD con $\alpha=0.05$, $n=3$. Valores con la misma letra, dentro de cada columna, no son significativamente distintos.

	Peso/área		Ceras		Comp. Hidrolizables		Cutina	
Cascada	1916 \pm 79	a	92.5 \pm 8.9	a	286.1 \pm 14.7	a	1513.8 \pm 14.8	a
Josefina	1313 \pm 70	b	58.8 \pm 0.6	b	194.9 \pm 8.3	b	1068.2 \pm 7.5	b
Gardeners Delight	1479 \pm 16	b	75.9 \pm 3.7	ab	191.1 \pm 20.5	b	1035.2 \pm 71.4	b

Caracterización estructural

Los estudios de caracterización estructural de la cutícula aislada se realizaron a partir de material obtenido de Cascada cultivado en La Mayora. Se realizó una comparación de la cutícula aislada a partir de tomates en estadio maduro (49 dda) con cutícula aislada a partir de tomate en estadio inmaduro en crecimiento (21 dda) para evaluar la capacidad de la correspondiente metodología para detectar diferencias estructurales.

Espectroscopia de Infrarrojos

En la Figura 3.17 se muestran los espectros FT-IR de la cutícula aislada de frutos de tomate en dos estadios de crecimiento. Ambos espectros fueron muy similares excepto por la presencia de algunas absorciones sobre 1630, 1530, y 900–800 cm^{-1} en la muestra en estadio maduro que no estaban presentes en el espectro de la muestra en estadio inmaduro. Así, las absorciones sobre 163 y 1550 cm^{-1} fueron asignadas a la vibración de puentes C=C y de anillos de tipo benceno respectivamente. Las absorciones más débiles entre 900 y 800 cm^{-1} , indicaron la presencia de sustituciones dobles y triples en los anillos aromáticos.

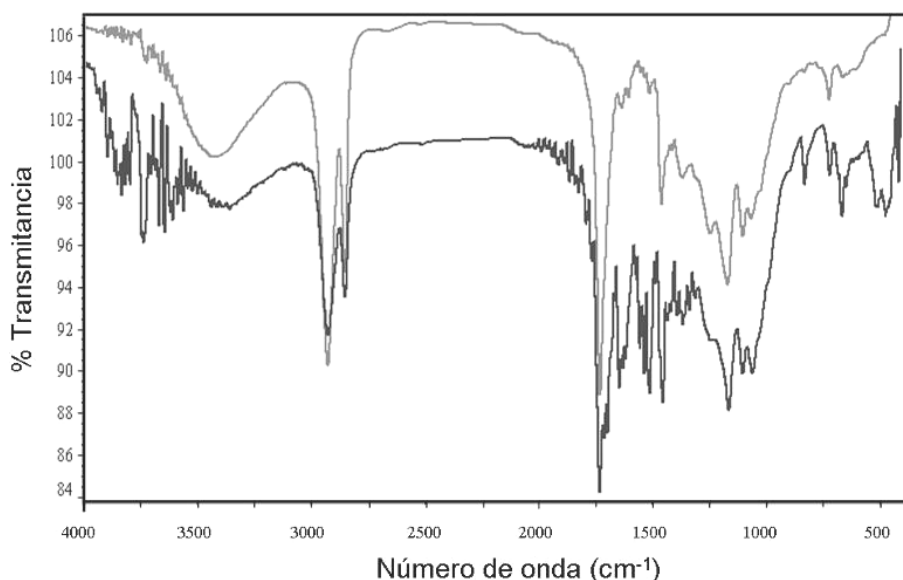


Figura 3.17: Espectro de infrarrojos con transformada de Fourier de cutina extraída a partir de cutícula de frutos de tomate maduro (espectro inferior) e inmaduro (espectro superior).

Una forma de caracterizar el grado de polimerización del material a partir de las dos bandas de absorción principales que se observan en las muestras de cutina consiste en evaluar la relación entre la banda cercana a 2900 cm^{-1} asignada a la vibración simétrica y asimétrica de los grupos de metileno, y la fuerte banda de absorción a 1730 cm^{-1} , asignada a la vibración C=O del grupo carbonilo del enlace éster que une los hidroxiácidos grasos que forman el entramado de la cutina. Esta relación (0.72) fue menor para la cutina aislada de frutos de tomate maduro que para la cutina obtenida de frutos de tomate inmaduro (0.92). Esto indicaría un mayor entrecruzado de la cutina en las cutículas de frutos maduros frente a las obtenidas de frutos no maduros.

Difracción de rayos X

Los difractogramas de la Figura 3.18 obtenidos mediante difracción de rayos X en las muestras de cutina de tomate en estadio inmaduro, muestran una banda ancha con un máximo a $2\theta = 18.5-19$, que se corresponde con un espaciado de 4.795 \AA . Esta banda apareció en todas las muestras de cutina estudiadas procedentes de frutos de tomate maduro, independientemente de la temperatura a la que se realizó el difractograma en un rango desde $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, tanto en calentamiento como en el posterior enfriamiento. Fue observada, sin embargo, una ligera variación en el espaciado en las muestras de cutina procedentes de frutos en estadio inmaduro recogidos 21 días después de antesis (dda). Tras calentar hasta $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y enfriar hasta temperatura ambiente la muestra se registró un desplazamiento del máximo de la banda hacia $2\theta = 20$ en el difractograma realizado a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que corresponde a un espaciado de 4.438 \AA en el entramado de cutina (Figura 3.18 inserto). Este desplazamiento no fue observado en muestras de cutina procedentes de tomate en estadio maduro.

Resonancia Magnética Nuclear

La Figura 3.19 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear del ^{13}C (^{13}C -RMN) de dos muestras de cutina. Las resonancias principales fueron asignadas tal que: $(\text{CH}_2)_n$, 29 ppm; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOR}$, 64 ppm; CHOCOR y CHOH , 71.6 ppm; y CHOCOR , 173 ppm. Los dos espectros RMN fueron muy similares a excepción de la presencia de dos resonancias adicionales en la muestra de tomate maduro, entre 115 y 130 ppm, que no aparecieron en la cutina de tomate inmaduro y que corresponden a desplazamientos químicos típicos de compuestos aromáticos e insaturados.

Puede obtenerse una medida indirecta de la movilidad de las cadenas del polímero de cutina mediante la determinación del tiempo de relajación del spin, $T_{1\rho}$, del grupo $^{13}\text{CH}_2$. Esto aporta información de la dinámica y la estructura del biopolíester y de cuan rígidas son las cadenas que lo forman. En las muestras estudiadas, $T_{1\rho}$ estimado para la cutina de un fruto inmaduro fue de 118 μs , mientras que para las muestras de fruto maduro fue de 58 μs , lo que indicaría un entorno más rígido en estas muestras.

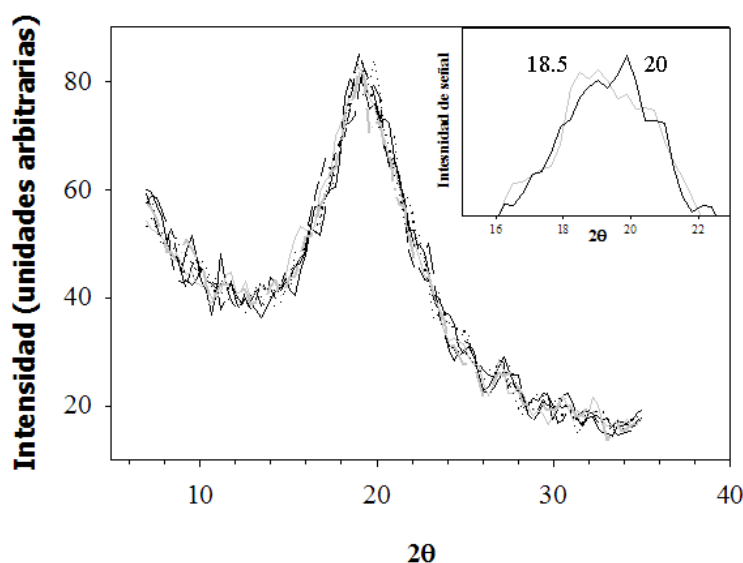


Figura 3.18: Serie de difractogramas de rayos X de la cutina de fruto inmaduro de Cascada tomados a distintas temperaturas (20 y 80 °C) seguido de un posterior enfriamiento. Inserto: Detalle del máximo de señal de los difractogramas a 20 °C inicial (línea oscura) y posterior (línea clara) al calentamiento y enfriamiento de la muestra.

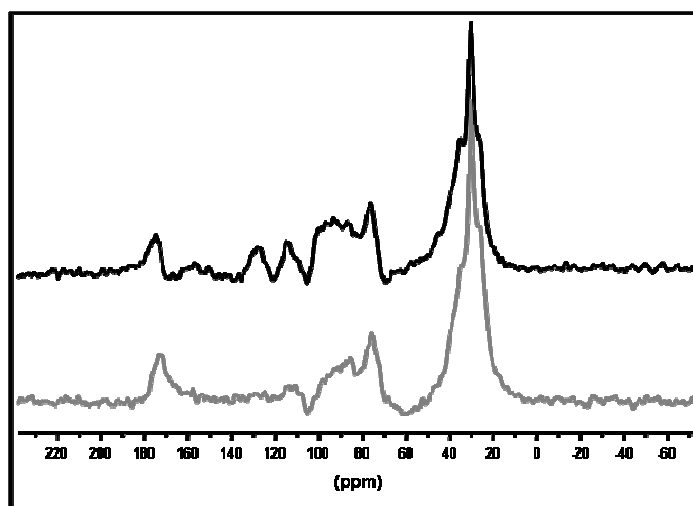


Figura 3.19: Espectro RMN ^{13}C CPMAS de las muestras de cutina de frutos de tomate maduro (espectro superior) e inmaduro (espectro inferior) de Cascada. Las asignaciones de las señales principales fueron: $(\text{CH}_2)_n$, 29 ppm; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOR}$, 64 ppm; CHOCOR and CHOH , 71.6 ppm; carbonil, 173 ppm.

Microscopía de Fuerza Atómica

Como primera aproximación a esta metodología se realizaron diversos ensayos en los que se barrieron pequeñas zonas de la superficie externa de la cutícula aislada del fruto a diferentes velocidades, siempre en la misma muestra, así como aplicando fuerzas pequeñas y moderadas sin observarse ningún tipo de erosión o daño al material. Para evaluar las posibles deformaciones producidas en la estructura superficial por el empleo del modo contacto, se analizó la misma muestra usando los modos de contacto y los de no contacto. Los resultados mostraron que el uso del modo de contacto no indujo ninguna modificación en la superficie, como se puede comprobar en la Figura 3.20, siendo además su resolución significativamente mayor que la del modo no contacto. En la Figura 3.21 se muestran imágenes a baja resolución de las muestras de cutícula antes de eliminarse las ceras. La superficie apareció cubierta por hileras entrecruzadas con un grosor medio de $0.5 \mu\text{m}$ y algunos aglomerados de mayor tamaño. Una inspección más detallada reveló un fondo con pequeñas áreas cubiertas de cristales de ceras epicuticulares lo que, en conjunto, impidió observar directamente la estructura de la cutina.

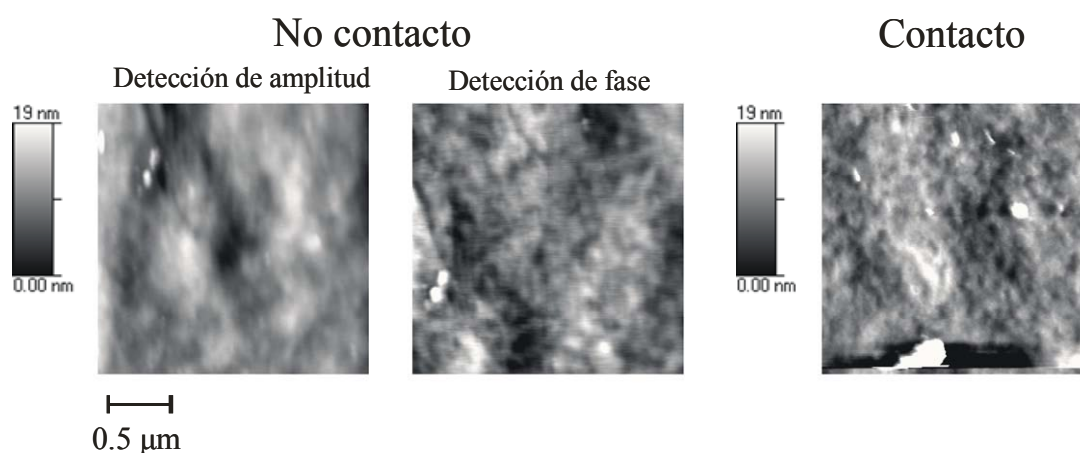


Figura 3.20: Imágenes de alta resolución de AFM en modo de no-contacto (tanto de detección de fase como de amplitud) y en modo contacto de la misma muestra de cutícula sin ceras de fruto de tomate maduro de Cascada.

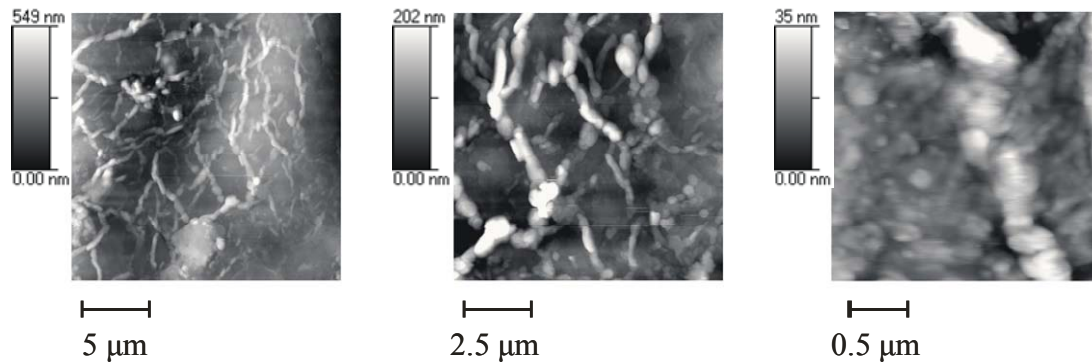


Figura 3.21: Imágenes de AFM de baja resolución en modo contacto en las que se muestra la estructura de las ceras en la cutícula.

Tras el tratamiento aplicado para retirar las ceras epicuticulares, las estructuras anteriormente descritas desaparecieron de la superficie externa de las muestras, revelándose una textura superficial bien definida que no había sido posible ver antes mediante la microscopía electrónica de barrido. En la Figura 3.22 se muestra una serie de imágenes AFM de amplio rango donde se revela la homogeneidad y texturas típicas que se observaron en las muestras de cutícula sin ceras tanto de frutos inmaduros como maduros. La topografía de la cutícula sin ceras de frutos inmaduros se caracterizó por rugosidades muy espaciadas y suaves mientras que las de frutos maduros aparecieron más aplanadas.

Las imágenes de alta resolución (Figura 3.23) mostraron una textura característica que permitió diferenciar entre las muestras extraídas de fruto joven frente a las extraídas de fruto maduro. Las imágenes corresponden a diferentes áreas de muestras diversas y permitieron ver la reproducibilidad de las medidas. En el caso de las muestras de cutícula sin ceras de tomate fruto de maduro, la superficie puede describirse como un red entrelazada con morfología helicoidal espaciada entre 200 – 300 nm. En algunas áreas estos rasgos se dispusieron de forma aleatoria, pero en otras la disposición permitió establecer una dirección preferente, dando al conjunto un aspecto de estructura alargada. En este sentido pueden observarse estructuras circulares debido al elevado entrelazado.

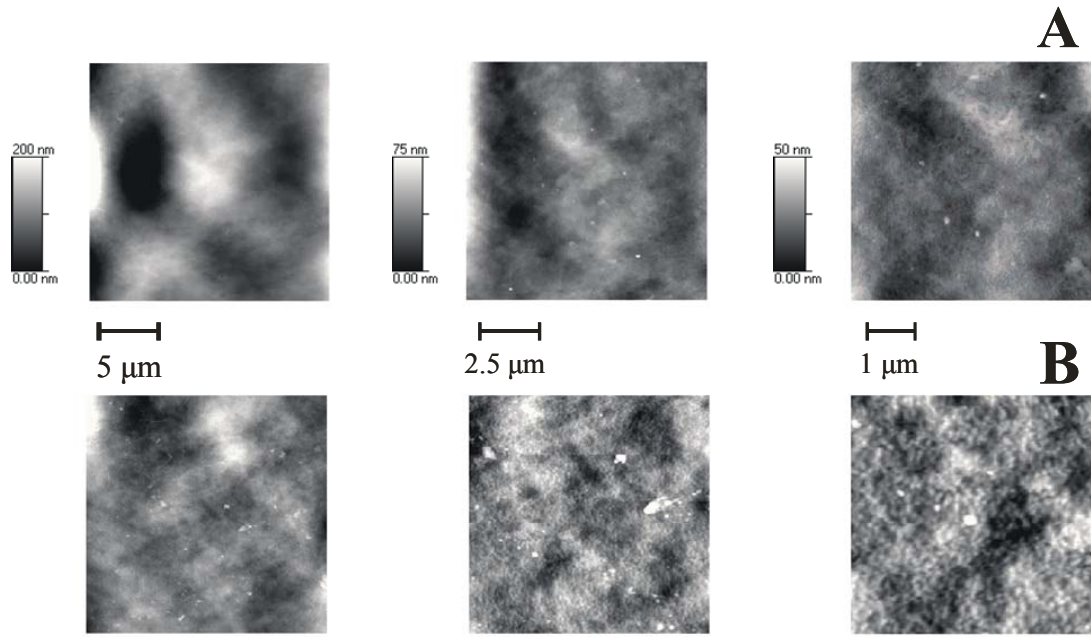


Figura 3.22: Imágenes topográficas de AFM (modo de contacto) mostrando la morfología de la superficie externa de cutículas sin ceras de frutos de tomate inmaduros (A) y maduros (B) de Cascada a diferentes resoluciones.

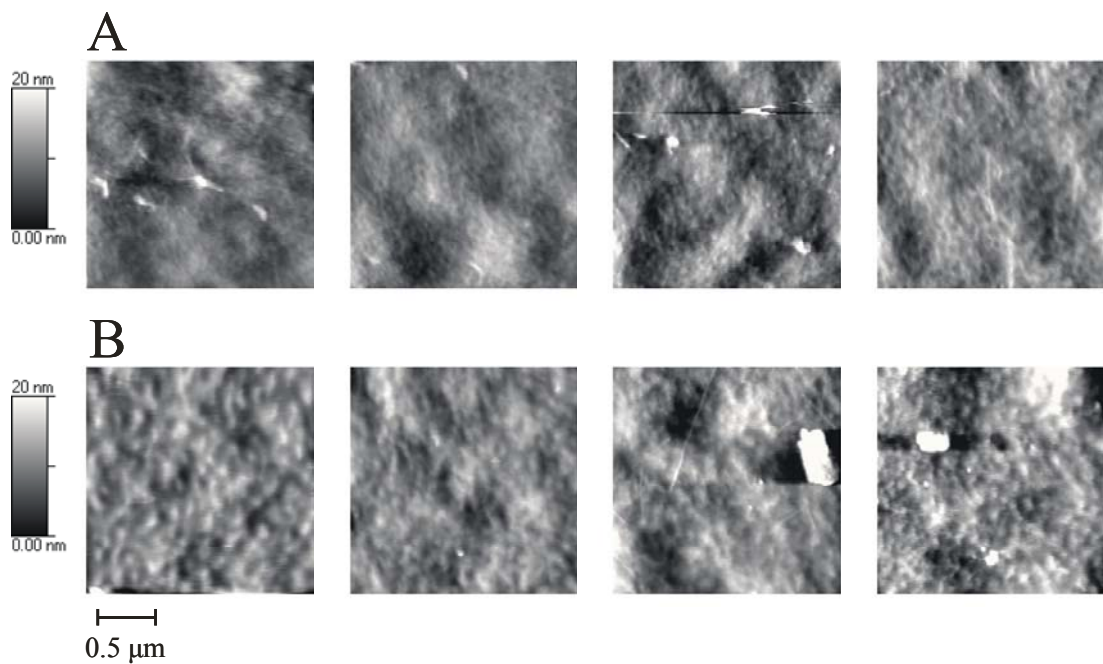


Figura 3.23: Imágenes de AFM de alta resolución de la parte externa de cutículas sin ceras de frutos de tomate inmaduro (A) y maduro (B). Se analizaron distintas zonas de diferentes muestras para evaluar la reproducibilidad.

Propiedades térmicas

Los estudios de las propiedades térmicas de la cutícula del fruto de tomate se llevaron a cabo mediante calorimetría diferencial de barrido en muestras obtenidas a partir de frutos inmaduros (21 dda) y maduros (49 dda) de los genotipos que mostraron mayor diferencia en cuanto a la susceptibilidad frente al agrietado, Cascada y Gardeners Delight.

El calor específico, C_p , permite evaluar el comportamiento térmico de un material en un rango de temperaturas determinado, en este caso abarcando el rango fisiológico de desarrollo del fruto de tomate. La Figura 3.24 muestra la variación en C_p de cutícula aislada, y su correspondiente cutina purificada, a partir de frutos de tomate del genotipo Cascada en estadio inmaduro (Figura 3.24A) y maduro (Figura 3.24B) en el rango de temperaturas 4 – 50 °C. En general, los valores de C_p obtenidos para las muestras de cutícula mostraron un pequeño incremento en el rango de 4 a 20 °C seguido de un cambio en esta tendencia. El incremento fue más rápido una vez superados los 20 °C y se estabilizó sobre los 30 – 35 °C. Este comportamiento fue más marcado en las muestras de cutina de frutos inmaduros, donde el cambio de tendencia fue brusco al superar los 20 – 23 °C, reflejándose de forma menos marcada en la cutícula. Este comportamiento fue interpretado como la presencia de una transición de segundo orden, transición vítrea, caracterizada por una T_g alrededor de los 23.7 °C.

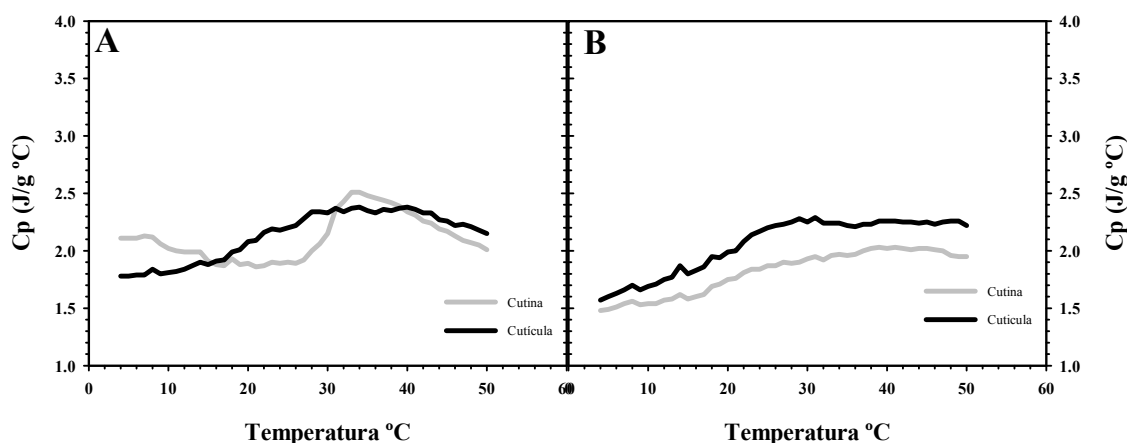


Figura 3.24: Variación del calor específico, C_p , registrado en la cutícula de frutos de Cascada y su correspondiente cutina de frutos en estadio inmaduro (A) y maduro (B).

Las muestras de cutina de Gardeners Delight mostraron un comportamiento muy similar al de Cascada, si bien la transición fue menos marcada incluso en las muestras de cutina de frutos de tomate en estadio inmaduro (Figura 3.25), no determinándose una T_g en las muestras en el estadio maduro.

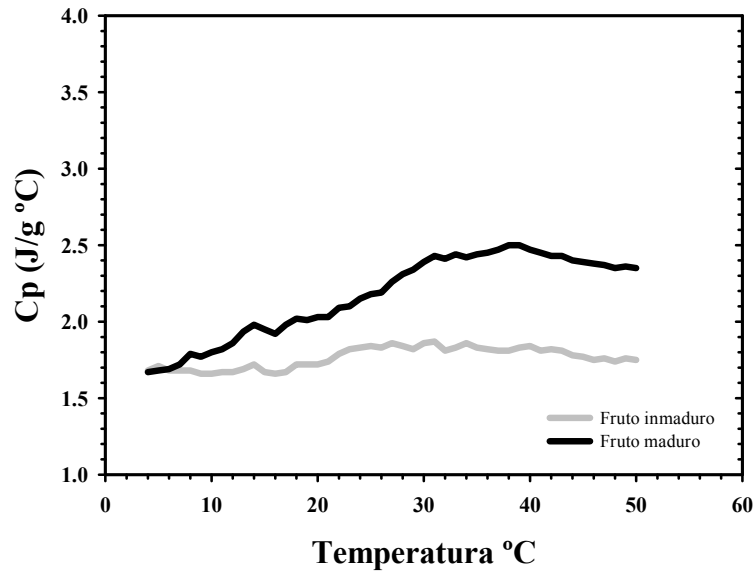


Figura 3.25: Variación del C_p en cutina purificada de frutos de tomate de Gardeners Delight en estadio inmaduro (línea clara) y maduro (línea oscura).

Para determinar si la transición de segundo orden registrada en la cutina frutos inmaduros de Cascada era una transición vítrea las muestras se sometieron a varios ciclos de calentamiento y enfriamiento bruscos. Los resultados se muestran en la Figura 3.26A, en la que se observa cómo los sucesivos ciclos de calentamiento y enfriamiento bruscos modificaron el comportamiento de C_p en el rango de temperaturas estudiado, hasta hacer desaparecer la transición.

La Figura 3.26B muestra el efecto de la hidratación de la muestras en la variación del C_p de cutina de frutos de Cascada en estadio inmaduro. La cantidad de agua adsorbida fue del 5.5% del peso de la muestra y se observó una disminución significativa de la T_g , alcanzando un valor de 16.3 °C, hecho interpretado como una plastificación del polímero.

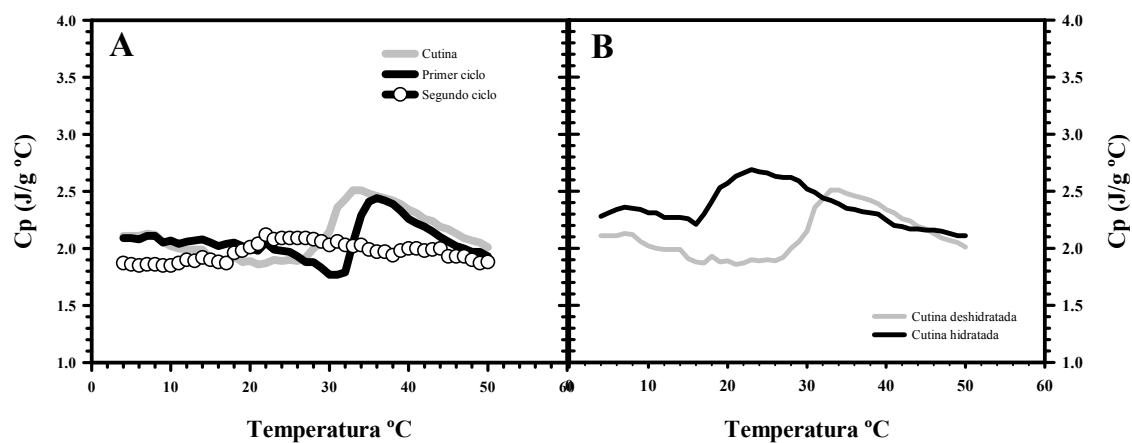


Figura 3.26: (A) Variación del C_p en una misma muestra de cutina de frutos en estadio inmaduro de Cascada sometida a dos ciclos de calentamiento-enfriamiento bruscos. (B) Modificación del comportamiento del C_p en muestras de cutina de frutos en estadio inmaduro de Cascada al ser hidratada con un 5.5% en peso de agua.

Propiedades mecánicas

Las propiedades biomecánicas de la cutícula y su relación con la humedad relativa y la temperatura se estudiaron en cutículas de frutos maduros de Cascada, Josefina y Gardeners Delight.

Comportamiento biomecánico de la cutícula

Los ensayos de fluencia de la cutícula mostraron dos fases bien diferenciadas cuando fue sometida a incrementos en la fuerza de tensión de 0.098 N en intervalos de 1200 s a 23 °C y una humedad relativa del 40 % (Figura 3.27). Una primera fase, que comprendió desde 0 a 0.49 N de fuerza (con un total de cinco incrementos de fuerza), en la cual la cutícula respondió a cada incremento con una extensión instantánea (sobre un 0.5 % de deformación en cada incremento) sin observarse ninguna extensión adicional hasta el siguiente incremento de la fuerza; la deformación en esta fase fue esencialmente elástica. La segunda fase se manifestó a fuerzas de tensión superiores a 0.49 N y la cutícula respondió con una extensión instantánea (deformación elástica) seguida de una extensión adicional durante el tiempo que se mantuvo la misma fuerza de tensión (deformación viscoelástica). La transición del régimen elástico al viscoelástico fue gradual, con la deformación elástica predominando sobre la viscoelástica desde 0.49 a 0.784 N (del 5° al 8° incremento de fuerza) y siendo predominante el viscoelástico en fuerzas mayores de 0.784 N.

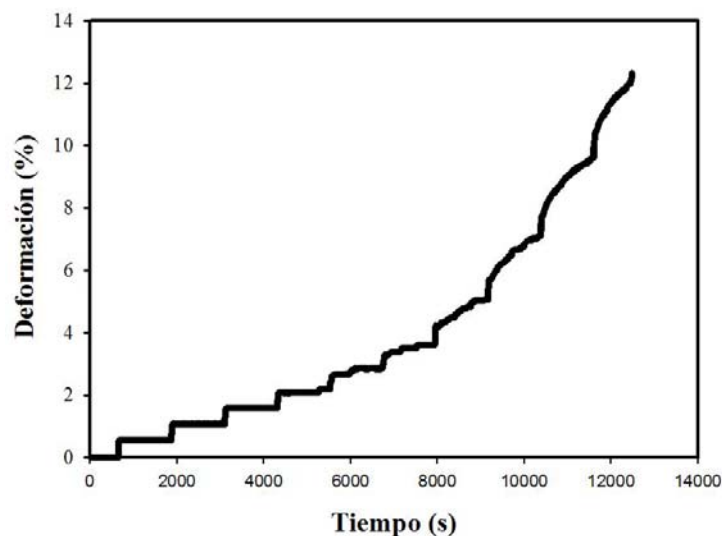


Figura 3.27: Ensayo de fluencia con incremento sucesivo de fuerza de una cutícula de fruto de Cascada a 40% de humedad relativa y 23 °C. Los datos fueron tomados cada 3 s. Los incrementos de fuerza estuvieron entre los 0.098N hasta la fractura de la muestra con incrementos de 0.098N cada 1200 s.

Este comportamiento bifásico pudo ser observado en los diagramas esfuerzo-extensión a 23 °C y 40 % de humedad relativa donde la relación entre el esfuerzo aplicado y la deformación obtenida puede ser definida mediante las diferentes pendientes de la curva (Figura 3.28). Las curvas de esfuerzo-extensión permitieron calcular el módulo de tensión, E , a partir de la pendiente de la fase lineal elástica de la curva, E_e , y de la fase lineal viscoelástica, E_v . Para estimar el área transversal de aplicación de las fuerzas, necesario para el cálculo del módulo de tensión de cada muestra, se tomó el grosor medio de la cutícula entre la pared celular epidérmica y la superficie exterior de la cutícula. Los valores tomados, estimados a partir del análisis de imagen de microfotografías de cortes histológicos de cutículas aisladas, fueron de $7.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ para Cascada, $5.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$ para Gardeners Delight y de $6.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ para Josefina.

Efecto de la humedad relativa y la temperatura sobre el comportamiento biomecánico de la cutícula

Las curvas de esfuerzo-extensión obtenidas a 40% y 80% de humedad relativa siempre se compusieron de dos fases lineales en el rango de temperaturas ensayado (10 – 45 °C). Las curvas de Cascada a 23 °C se muestran en la Figura 3.28 como ejemplo del comportamiento observado. La principal diferencia entre las curvas de esfuerzo-extensión a 40% y a 80% de humedad relativa fue una reducción en el módulo de tensión de la fase elástica, E_e (para Cascada a 23 °C $E_{e40\%} = 693 \pm 56 \text{ MPa}$ y $E_{e80\%} = 371 \pm 17 \text{ MPa}$).

Cuando se sumergieron las cutícula en solución acuosa (sistema experimental con las muestras sumergidas), las curvas de esfuerzo-extensión mostraron un carácter monofásico que se correspondió con una deformación viscoelástica, y el módulo de tensión fue considerablemente menor que E_e al 80% de humedad relativa (Figura 3.28). Este módulo de tensión, obtenido en condiciones experimentales de mojado, fue similar al obtenido para la pendiente de la segunda fase lineal al 40% y 80% de humedad relativa. Como ejemplo Cascada tuvo unos valores para $E_{v40\%} = 201 \pm 25 \text{ MPa}$ y $E_{v80\%} = 182 \pm 34 \text{ MPa}$). El módulo de tensión de la fase viscoelástica de las curvas de esfuerzo-extensión pareció ser independiente tanto de la temperatura como de la humedad relativa.

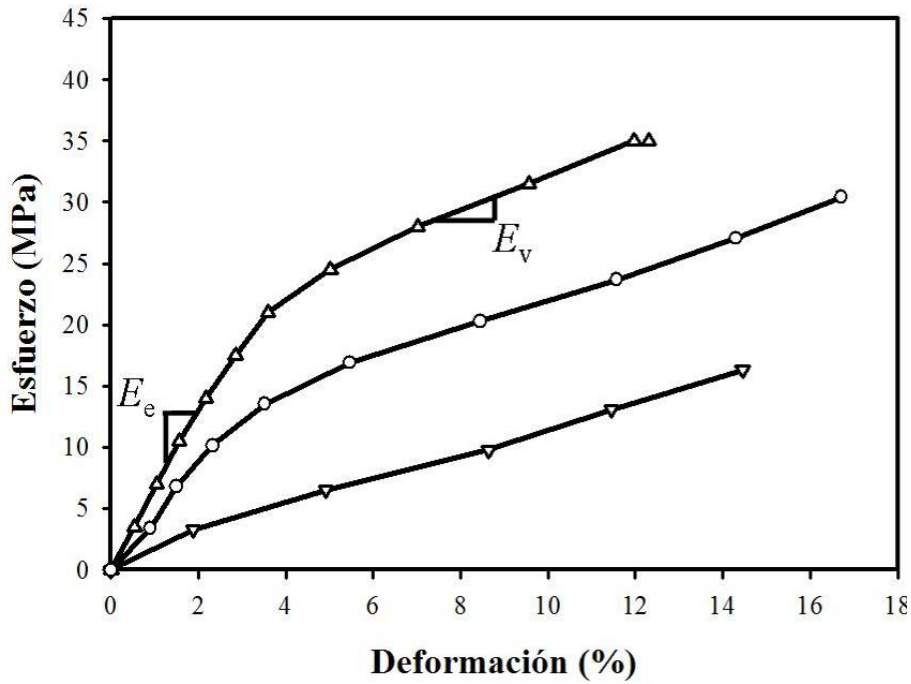


Figura 3.28: Respuesta mecánica de la cutícula del fruto de Cascada bajo fuerzas de tensión al 40% (Δ) y 80% (\circ) de humedad relativa y mojado (∇). La temperatura se mantuvo constante a 23 °C.

En la Figura 3.29 se muestra el efecto combinado de la temperatura y la humedad relativa sobre el módulo de tensión de la fase elástica. El módulo de tensión disminuyó cuando la temperatura aumentó desde 10 a 45 °C a una humedad relativa del 40%. Esta disminución no fue lineal pudiéndose identificar dos zonas independientes de la temperatura, el rango 10 – 30 °C donde los valores de E_e de Cascada rondaron los 705 MPa, y el rango 35 – 45 °C con valores de E_e de Cascada alrededor de 435 MPa, además de una transición entre ambas zonas abarcando el rango de temperaturas 30 – 35 °C. En las muestras de Cascada se observó que, en todo el rango de temperaturas ensayado, el módulo de tensión obtenido a una humedad relativa del 80% fue siempre menor del obtenido al 40%. Además las diferencias en los valores de E_e fueron significativas en los dos rangos de temperatura inferior y superior a la transición, pero la transición fue más amplia, extendiéndose entre los 23 y 35 °C.

La transición terminó a 35 °C tanto para las muestras incubadas a un 40% como para las incubadas a un 80% de humedad relativa, siendo estas dos humedades relativas donde la transición fue observada más claramente. Sin embargo, el comienzo de la transición pareció depender de la humedad relativa ya que se observó a una temperatura igual o superior a 30 °C para un 40% y entre 23 y 30 °C para un 80% de humedad relativa (Figura 3.29).

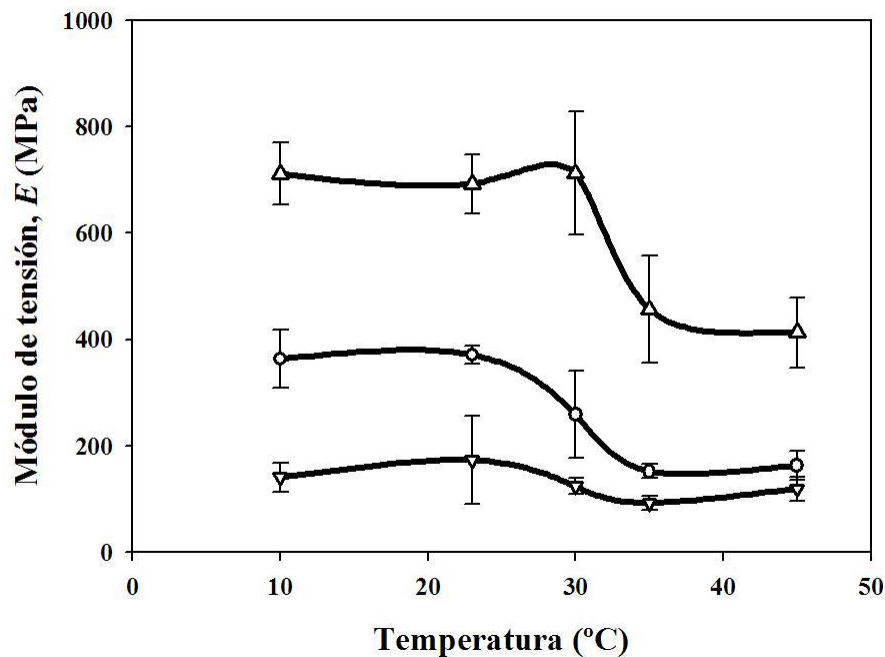


Figura 3.29: Dependencia de la temperatura de la rigidez de la cutícula de fruto de Cascada al 40% RH (Δ) y 80% RH (\circ) de humedad relativa y mojado (∇). Medias \pm error típico con $3 \leq n \leq 7$.

Considerando que E fue independiente de la temperatura por debajo y por encima de la transición, se calcularon los valores medios de E correspondientes a la zona de temperaturas inferiores a la transición y a la zona de temperaturas superiores a la transición para las tres condiciones de humedad relativa ensayadas, 40%, 80% y mojado. El módulo de tensión disminuyó al aumentar la humedad relativa tanto en temperaturas superiores como inferiores a la transición. En términos absolutos, la disminución de E fue mayor a temperaturas inferiores a la transición (707 – 163 MPa en el caso de Cascada) que a temperaturas superiores (437 – 99 MPa); sin embargo, la disminución fue relativamente similar, un 77%, en ambos casos. En las muestras que se ensayaron en condiciones de mojado, E_v no mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en el rango de temperaturas ensayado; sin embargo, se observaron diferencias

significativas para $\alpha = 0.07$ entre los valores medios de E_v a 10 y 23 °C respecto a los valores medios de E_v a 35 y 45 °C (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Rigidez (E , MPa) y esfuerzo en el punto de fractura (σ_b , MPa) de las cutículas de fruto de Cascada en tres condiciones de humedad (HR, %) y cinco temperaturas (T , °C), y valores medios de E y σ_b , a temperaturas inferiores y superiores a la zona de transición. Medias \pm error típico con $3 \leq n \leq 7$. En cada humedad los valores seguidos de la misma letras no fueron diferentes mediante Tukey-Kramer HSD con un $\alpha = 0.05$.

RH	T	E	Zona (°C y E)	σ_b	Zona (°C y σ_b)
40	10	711.26 a	(10 a 30 °C) 706.90 a	46.25 a	
	23	692.61 a		31.57 b	(23 a 30 °C) 32.25 a
	30	712.23 a		32.79 b	
	35	456.20 b	(35 a 45 °C) 436.57 b	25.57 b	(35 a 45 °C) 26.54 a
	45	413.02 b		27.70 b	
80	10	363.43 a	(10 a 23 °C) 367.28 a	29.53 a	(10 a 30 °C) 29.35 a
	23	371.14 a		30.29 a	
	30	259.11 b		28.45 a	
	35	151.90 c	(35 a 45 °C) 155.86 b	22.66 a	(35 a 45 °C) 21.82 b
	45	162.45 c		20.42 a	
100	10	140.95 a	(10 a 23 °C) 163.23 a	24.12 a	(10 a 30 °C) 21.39 a
	23	172.78 a		20.19 a	
	30	124.17 a		21.43 a	
	35	92.28 a	(35 a 45 °C) 99.39 a	13.40 a	(35 a 45 °C) 14.05 b
	45	118.94 a		15.84 a	

Los valores de E obtenidos para las cutículas de Gardeners Delight y Josefina se muestran en la Tabla 3.6 junto a los de Cascada. Tanto humedad relativa como la temperatura tuvieron un efecto similar en las cutículas de Josefina y Gardeners Delight. La disminución en los valores de E fue significativa en ambos casos y los valores registrados fueron, independientemente de la temperatura, similares a los de cutícula de Cascada en las condiciones de no mojado. En condiciones de mojado, los valores de E de la cutícula de Gardeners Delight fueron significativamente menores que los obtenidos para los otros dos genotipos en las dos temperaturas.

Tabla 3.6: Módulo de tensión (E , MPa) de la cutícula de frutos de Cascada, Josefina y Gardeners Delight en dos condiciones de humedad (40% HR y mojado) y dos temperaturas (23 y 35 °C) diferentes. En cada humedad los valores seguidos de la misma letras no fueron diferentes mediante Tukey-Kramer HSD con un $\alpha = 0.05$. sd: sin datos.

	23 °C (previo a transición)		35 °C (posterior a transición)	
	40%	Mojado	40%	Mojado
Cascada	692.6 a	172.8 a	456.2 a	92.3 a
Josefina	692.9 a	190.9 a	481.9 a	sd
Gardeners	741.6 a	97.5 b	385.7 a	62.3 b

El esfuerzo en el punto de fractura (σ_b) mostró un comportamiento similar al módulo de tensión, con dos zonas de temperatura diferenciadas, una inferior a 30 °C y superior a 35 °C y de nuevo una transición entre ambas (Figura 3.30). Las diferencias encontradas entre las temperaturas altas y bajas fueron significativas para las muestras incubadas al 80% de humedad relativa y mojado. Debido al elevado valor de σ_b a 10 °C, la zona de baja temperatura a 40% de humedad relativa no pudo definirse claramente. El esfuerzo en el punto de fractura decreció al incrementarse la temperatura tanto en la zona de temperatura inferior como la superior a la transición aunque, en el caso de Cascada, la disminución fue similar en ambas zonas (32 – 21 MPa en la inferior y 26 – 14 MPa en la superior).

En la Tabla 3.7 se muestran los valores de σ_b para las cutículas de los tres genotipos. Mientras que la humedad relativa indujo cambios significativos en el valor de σ_b en las cutículas de los tres genotipos independientemente de la temperatura, la variación de σ_b provocada por la temperatura tan solo fue significativa para la cutícula de Gardeners Delight a un 40% de humedad relativa y mojado; para la cutícula de Cascada sólo en condiciones de mojado. En las condiciones de ensayo, Josefina mostró un valor de σ_b mayor que los otros dos genotipos salvo a 35 °C y 40% de humedad relativa donde no se observaron diferencias significativas aunque sí una tendencia en este sentido. Las diferencias entre Cascada y Gardeners Delight no fueron significativas en ningún caso, aunque los valores de este parámetro para Cascada siempre fueron algo superiores y la variación de σ_b de la cutícula de Gardeners Delight por efecto del mojado fue siempre superior a los otros dos genotipos.

Tabla 3.7: Esfuerzo en el punto de fractura (σ_b , MPa) de la cutícula de frutos de Cascada, Josefina y Gardeners Delight en dos condiciones de humedad (40% HR y mojado) y dos temperaturas (23 y 35 °C) diferentes. En cada humedad los valores seguidos de la misma letra no fueron diferentes mediante Tukey-Kramer HSD con un $\alpha = 0.05$.

	23 °C o previo a transición				35 °C o previo a transición			
	40%		Mojado		40%		Mojado	
Cascada	31.6	a	20.2	a	25.6	ab	13.4	b
Josefina	54.5	b	33.8	b	41.6	a	36.0	a
Gardeners	29.9	a	17.1	a	21.1	b	10.0	b

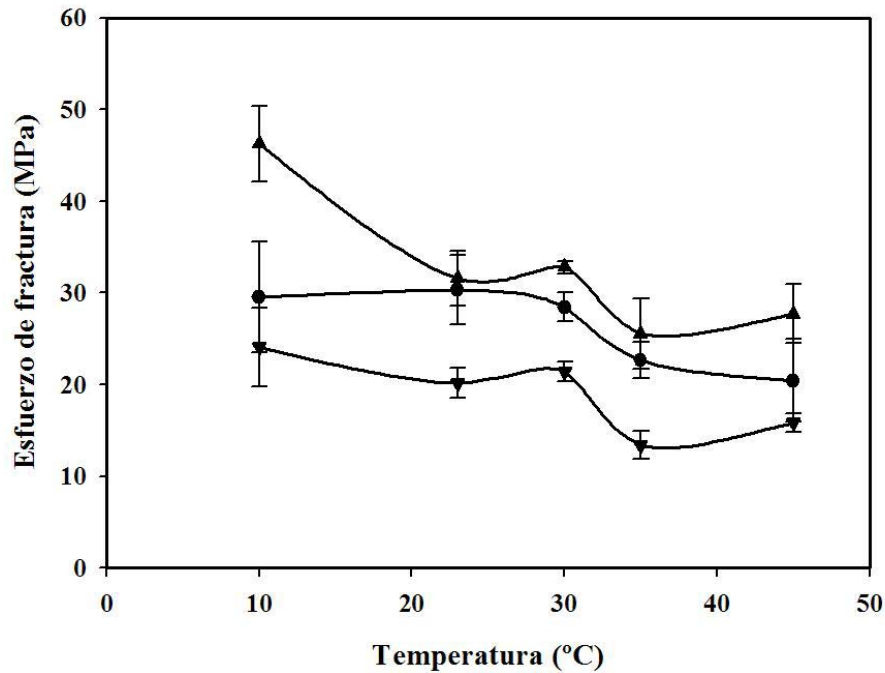


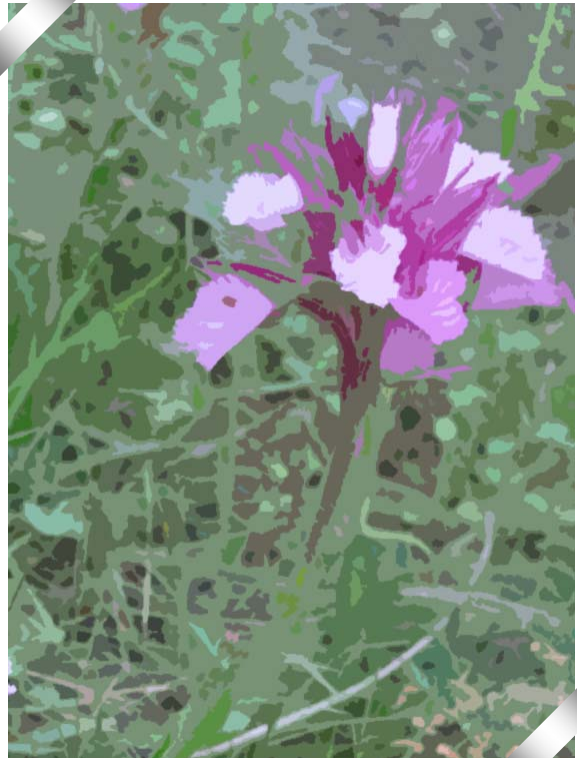
Figura 3.30: Dependencia de la temperatura del esfuerzo en la fractura de la cutícula de fruto de Cascada al 40% RH (▲) y 80% RH (●) de humedad relativa y mojado (▼). Medias \pm error típico con $3 \leq n \leq 7$.

No se encontraron diferencias significativas en la deformación máxima (ϵ_b) entre diferentes temperaturas o humedades relativas en las muestras de cutícula de Cascada ni de Josefina. Los valores medios de ϵ_b fueron para la cutícula de Cascada $13.8 \pm 0.5\%$ y para Josefina $16.2 \pm 1.1\%$. Por último, Gardeners Delight mostró diferencias significativas en los valores de ϵ_b cuando se realizaron los ensayos en condiciones de mojado, si bien no hubo diferencias en cuanto al efecto de la temperatura. También sus valores fueron diferentes a los de Cascada y Josefina al 40% de humedad relativa y 23 °C mientras que para las demás condiciones de ensayo no se encontraron diferencias (Tabla 3.8).

Tabla 3.8: Deformación máxima (ϵ_b , MPa) de la cutícula de frutos de Cascada, Josefina y Gardeners Delight en dos condiciones de humedad (40% HR y mojado) y dos temperaturas (23 y 35 °C) diferentes. En cada humedad los valores seguidos de la misma letras no fueron diferentes mediante Tukey-Kramer HSD con un $\alpha = 0.05$.

	23 °C (previo a transición)		35 °C (posterior a transición)	
	40%	Mojado	40%	Mojado
Cascada	9.99 ab	15.08 a	12.89 a	14.49 a
Josefina	17.17 a	18.53 a	12.71 a	15.35 a
Gardeners	6.64 b	14.99 a	10.77 a	15.73 a

DISCUSIÓN



*“Para las personas creyentes, Dios esta al principio;
para los científicos está el final de todas sus reflexiones.”*

Max Planck

"Ut tensio sic vis"

R. Hooke, 1678

Material Vegetal

Los genotipos elegidos para el estudio en la presente memoria constituyeron un buen material experimental ya que abarcaban todo el rango de la susceptibilidad al agrietado: Cascada muy resistente, Gardeners muy sensible y Josefina con sensibilidad intermedia en el cultivo realizado en La Mayora, y Cornell Inbred 10 muy resistente, Sausalito Cocktail como intermedio y Sweet 100 como el más sensible en el cultivo realizado en la Universidad de Cornell.

Además, entre los genotipos estudiados, Josefina y Sausalito Cocktail son actualmente empleados en las producciones comerciales, especialmente Josefina, considerado un referente de calidad en el mercado europeo (Berenguer y col., 2002) por su sabor y equilibrada acidez. Sausalito Cocktail a su vez se comercializa con éxito en el mercado norteamericano (Territorial Seed Co., Cotage Grove, Oregon EEUU). Son, por tanto, buenos indicadores de los problemas que actualmente aparecen en los cultivos de tomate cereza. Sweet 100 ha dejado de comercializarse por la elevada incidencia del agrietado en sus frutos, aunque aún mantiene cierta cota de mercado en Norteamérica. De igual modo, Gardeners Delight dejó de comercializarse hace ya bastante tiempo, siendo usado actualmente como una planta de ornamentación y jardinería. En cuanto a los genotipos más resistentes, Cascada se ha mostrado muy constante en los diversos cultivos y ha mantenido unos niveles de agrietado muy bajos ante las diversas condiciones de ensayo, por lo que se revela como un buen modelo de estudio de la resistencia. Cornell Inbred 10 por su parte también ha mantenido unos muy bajos niveles de incidencia de agrietado y, siendo una línea pura, permitiría realizar estudios sobre la heredabilidad de su resistencia, tanto desde un punto de vista de la genética clásica como una aproximación desde la biología molecular.

Agrietado

Emmons y Scott (1997) establecen una correlación entre los episodios de lluvia y la cantidad de lluvia con la incidencia de agrietado cuando la lluvia ocurre en las dos semanas anteriores a que los frutos alcancen el estadio óptimo de recogida: verde maduro y maduro. Estos resultados completan las observaciones de Young (1947) y de Reynard (1951) aunque este último no encontró relación con la cantidad de lluvia, tan solo con el número de eventos de lluvia. En nuestros resultados no pudimos establecer ninguna correlación significativa entre la incidencia de agrietado en las recogidas y las condiciones ambientales que precedían a cada recogida. La única variación atribuible a la aparición de lluvia durante el cultivo se registró en Gardeners Delight, para la que se observó un aumento en los frutos agrietados en la tercera recogida (Figura 3.3C, R3) que se realizó tras un breve período de lluvia, sin embargo en Josefina, si bien se observó un ligero incremento en el agrietado, las diferencias no fueron significativas con el resto de recogidas y Cascada registró una disminución de frutos agrietados en la misma recogida aunque sin diferencias significativas. Hacia el final del cultivo se produjeron nuevos episodios de lluvia que no se reflejaron en el agrietado de ninguno de los genotipos, siendo estable la incidencia en Gardeners Delight con cierta tendencia a disminuir en las últimas recogidas. Cortés y col. (1983) proponen que los factores ambientales influirían más en la aparición de agrietado en las primeras semanas de cultivo, disminuyendo esta relación al avanzar el cultivo. Esto implica una diferencia en cuanto a la susceptibilidad del agrietado favorecido por factores ambientales en función de la fase del cultivo y, de acuerdo con nuestras observaciones, según el genotipo incluso sin darse las condiciones ambientales adversas que favorecerían la aparición del agrietado (Frazier y Bowers, 1947). El agrietado estaría condicionado pues, no sólo por los factores ambientales sino por los aspectos fisiológicos del fruto y de la planta determinados por las características propias de cada genotipo.

En trabajos anteriores se había propuesto que los frutos con mayores tasas de crecimiento al final del desarrollo serían susceptibles de mostrar una mayor incidencia del agrietado (Bakker, 1988), pudiendo estar relacionada esta mayor tasa de crecimiento bien con una mayor toma de agua, bien con un mayor aporte de nutrientes (Peet y Willits, 1995). Entre los genotipos que se han estudiado en la presente memoria solamente Gardeners Delight presentó una maduración de fruto más rápida que, además,

coincidió con una mayor incidencia de agrietado. No se observaron diferencias significativas entre los frutos de Cascada y Josefina en cuanto a la tasa de crecimiento, si bien estos dos genotipos se diferenciaron claramente en cuanto a la susceptibilidad al agrietado. Por otra parte, los genotipos cultivados en Cornell no mostraron diferencias significativas respecto a la tasa de crecimiento y maduración de los frutos frente a las diferencias significativas en la incidencia al agrietado que han mostrado cada uno de los genotipos. Estos resultados coinciden con los publicados por Ehret y col. (1993) en los que no pudo relacionar la mayor susceptibilidad al agrietado con una mayor tasa de crecimiento relativo sobre el período de cultivo ni sobre momentos concretos.

No pudo relacionarse el tamaño del fruto con la susceptibilidad al agrietado comparando los tamaños de los distintos genotipos como había sido propuesto por Emmons y Scott (1996), quienes tampoco encontraron correlación alguna, ya que los dos genotipos más susceptibles, Gardeners Delight y Sweet 100 son, al mismo tiempo, los que producen los frutos de mayor y menor calibre respectivamente. Tampoco se pudo establecer una correlación entre el tamaño del fruto y la tendencia a agrietarse de los de mayor calibre como propone Peet (1992) en ninguna de los genotipos estudiados.

Algunos trabajos han propuesto que el principal factor que induce el agrietado de tomate tipo cereza sería una entrada de solutos en el fruto durante las primeras horas de la mañana. Esta entrada incrementaría la presión interna del fruto y llevaría a la epidermis a sobrepasar su límite de extensión máximo (Ohta y col., 1997). El aumento en agrietado de los frutos podría estar relacionado entonces con un incremento en el aporte o cambios en la distribución de fotoasimilados en la planta. Esta idea se refuerza por el hecho de que el agrietado disminuye conforme disminuye la irradiancia (Ehret y col., 1993). Otros trabajos apuntaban a la entrada de agua de lluvia hacia el fruto promovida por el contenido en osmolitos, y a un incremento en el potencial de turgencia celular, como la causa de la aparición de agrietado en cerezas tras un episodio de lluvia. Sin embargo, para un cultivar susceptible, se determinó que el agrietado no es una función directa del porcentaje de sólidos solubles, potencial osmótico, potencial de turgencia o potencial hídrico (Andersen y Richardson, 1982). Estos resultados coinciden con nuestra observación que establece que los frutos más susceptibles no son los que tienen un mayor contenido en sólidos solubles, caso de Gardeners Delight (Tabla 3.1).

El método de inducción de agrietado por inmersión de los frutos en agua y la aplicación de vacío para forzar la entrada de agua al fruto propuesto por Hepler (1961) y empleado en varios estudios (Thompson, 1965; Armstrong y Thompson, 1969) no reproduce las condiciones fisiológicas del frutos cuando se produce el agrietado natural, pues se reemplaza el aire de los espacios intercelulares por agua, que entra de forma masiva, provocando un incremento significativo del volumen del fruto (Peet, 1992). La inmersión de frutos en agua, sin ejercer vacío, tal como la aplica Lichter y col. (2002), ha resultado ser un buen método para inducir agrietado artificialmente. Se puede observar una buena correlación con el agrietado natural registrado para la misma recogida cuando las condiciones del ensayo se mantuvieron con el agua a una temperatura relativamente baja, 12°C, y los frutos estuvieron sumergidos en ella un periodo variable, alrededor de 2 h. Los frutos procedentes de cultivares poco sensibles al agrietado son los que mejor respondieron a la inducción de agrietado, pero para evaluar posibles tratamientos (Lichter y col., 2002) y genotipos y poder discriminar entre pequeñas diferencias en agrietado es, precisamente, para lo que resultaría útil un método artificial de inducción del agrietado.

El método de inducción de agrietado ha permitido observar un incremento significativo de los frutos agrietados, a igual temperatura y tras el mismo tiempo de ensayo, cuando estos frutos se sumergían en agua destilada respecto a frutos que se dejaban en una atmósfera con elevada humedad relativa, incluso en genotipos resistentes como Cascada (Figura 3.4). Este incremento parece debido a la presencia de agua en forma líquida sobre la superficie del fruto, si bien, este agua líquida podría tener un efecto directo sobre la piel del fruto (Sekse, 1995; Lichter y col., 2002), o podría penetrar en los tejidos del fruto como consecuencia de la diferencia de potencial osmótico con el apoplasto incrementando la presión interna y el diámetro del fruto (Peet M, 1992; Aloni y col., 1999).

Agrietado y variables ambientales

La incidencia del agrietado en los frutos de tomate se ha relacionado con numerosas variables ambientales. Desde los primeros estudios han destacado dos de dichas variables: la presencia de agua en sus diversas formas tal que alta humedad relativa o en forma líquida sobre la superficie del fruto por condensación o por lluvia incrementaban el número de frutos agrietado, y temperatura de forma que las altas

temperaturas se correlacionaban con una mayor incidencia del agrietado en los frutos (Young, 1947; Peet, 1992).

Peet (1992) y otros autores proponen que la presión interna del fruto sería la responsable del agrietado, sin embargo, este modelo no permite explicar satisfactoriamente el agrietado en postcosecha pues, en los ambientes controlados donde se almacenan los tomates, no existiría una entrada efectiva de agua al fruto. Al contrario, con el paso del tiempo el fruto perdería agua y presión, siendo menos propenso a agrietarse. Lichter y col. (2002) encuentran diferencias en la tasa de agrietado inducido en función del tipo de solución que emplean para la inmersión de forma que los quelantes incrementan el agrietado, mientras que las soluciones de calcio lo reducen. Su interpretación se basa en el lavado de iones calcio por los quelantes, o la aportación de iones de calcio a la pared, en el caso de las soluciones de calcio. Esto implicaría que el agua que entra al fruto tiene una acción local sobre las estructuras de las primeras capas de células lo que estaría de acuerdo con la hipótesis de Sekse (1995) sobre la desintegración de estructuras de la piel de los frutos de cereza por el paso de agua desde la superficie. Según estos resultados sería la piel la que pierde capacidad de resistir la presión interna sin que exista una variación brusca de la misma.

En ninguno de los trabajos consultados se refleja la cantidad de agua que entraría al fruto ni si ésta sería suficiente para provocar un incremento de presión (Thompson, 1965; Armstrong y Thompson, 1969). En nuestro caso sí hemos medido el agua que penetraba en los frutos y los resultados mostraron que entraba agua al fruto y que la cantidad variaba significativamente en función del genotipo, si bien, no pudo correlacionarse con la susceptibilidad al agrietado. Sin embargo, teniendo en cuenta el tamaño de los frutos, la variación en el volumen y, por tanto, en la superficie del fruto fue muy pequeña. Esta extensión en la superficie está lejos de los valores que se pueden encontrar en la bibliografía para la capacidad de extensión de la piel del fruto de tomate cuando es sometida a tensión mecánica y que puede alcanzar un 20% de extensión lineal en algunos casos (Thompson, 2001).

Por otro lado, el método de inducción de agrietado también ha permitido evaluar el efecto que las altas temperaturas pueden ejercer incrementando la incidencia del agrietado en los frutos de los tres genotipos (Figura 3.6). Se ha observado una mayor frecuencia de aparición del agrietado en variedades menos densas en follaje (Frazier y

Bowers, 1947) lo que se relaciona con la irradiancia recibida por el fruto, bien mediante un efecto significativo sobre la temperatura de la superficie del fruto (Ehret y col., 1993) o por otra serie de causas no demostradas como podrían ser la alteración de las ceras epicuticulares por la radiación ultravioleta o el efecto de expansión de los gases internos por el incremento de la temperatura (Emmons y Scott, 1997). La relación del agrietado con las altas temperaturas ya fue propuesta por Young (1947) si bien no se ha establecido un mecanismo de acción que lo relacione directamente con la incidencia del agrietado. Este autor observó que influía más en los frutos más maduros en los que la pared celular habría perdido consistencia, y la pared cutinizada por sí sola no soportaría el incremento de presión interior, hecho que puede estar relacionado con los procesos de degradación de la pared celular mediados por la actividad de diversas enzimas. Así, Hobson (1965), mediante la comparación de distintas variedades de tomate, y empleando dos métodos de compresión mecánica, determinó que la firmeza de algunas variedades se correlacionaba con su actividad de la poligalacturonasa, revelando un papel importante en el proceso de degradación de las pectinas y en los cambios en firmeza del fruto. En un trabajo más reciente, Moctezuma y col. (2003) demuestran que la supresión de la expresión del gen β -galactosidasa (TBG6) en frutos de tomate logra alterar los procesos de desarrollo del fruto, induciendo cambios en la pared celular, principalmente a nivel de modificación de las pectinas (Hamson, 1952; Lichter y col., 2002), y en la firmeza del fruto que se correlacionaron con un incremento en la incidencia del agrietado.

Existen, por tanto, trabajos que apoyan la idea de que una entrada de agua al fruto, bien por un incremento en la toma desde la raíz o bien a través de la superficie del fruto, provocaría un incremento en la presión interna constituyendo la principal causa del agrietado, y es posible que así sea en algunos tipos de agrietado (Peet, 1992; Peet y Willits, 1995; Otha y col., 1997, 1998; Li y col., 2002). Sin embargo existen agrietados que no responden a este mecanismo como lo demuestran los cultivos en invernadero donde los aportes de agua están muy regulados sin dar lugar a esas entradas de agua desequilibradas, y el agrietado que se produce una vez recogido el fruto y, por tanto, imposibilitado para recibir aportes de agua que incrementen la presión interna. Por otra parte, según los resultados presentados en esta memoria, la cantidad de agua que entra al fruto en un tiempo que se ha visto apropiado para inducir un agrietado

equivalente al natural, provocaría un incremento en diámetro y una expansión de la superficie del fruto muy pequeña.

Diversos trabajos apuntan a que la modificación de las propiedades de la epidermis (cutícula) por factores endógenos (maduración) y exógenos (agua y temperatura) sí serviría para explicar este tipo de agrietado sin incremento de presión interna (Frazier y Bowers, 1947; Bakker, 1988; Emmons y Scott, 1998b; Aloni y col., 1999; Litcher y col., 2002). En este sentido hay que considerar que la piel del tomate ha sido descrita como el componente singular más importante en cuanto al esfuerzo mecánico que soporta el fruto, actuando como una membrana más o menos rígida que rodea una masa de material mucho más deformable (Miles y col., 1969) y que su solidez fue relacionada con la susceptibilidad al agrietado de ciertos genotipos (Voisey y col., 1970).

Para comprender el papel de la piel en el agrietado es necesario conocer el papel que pueden jugar cada uno de sus componentes, de ahí que sea necesario entrar en la histología de la piel del fruto. Los escasos trabajos que han estudiado este aspecto apuntan a que los distintos componentes del exocarpo: cutícula, epidermis y colénquima muestran variaciones entre variedades de distinto grado de susceptibilidad. Dichas variaciones podrían explicar, al menos en parte, los distintos grados de susceptibilidad al agrietado (Cotner y col., 1969).

Los resultados obtenidos en esta Memoria sobre la caracterización anatómica y biomecánica de la piel del fruto de tomate de distintos genotipos indican que las muestras de cutícula aislada contienen material celulósico a pesar de la digestión con celulasas tal como indican las propiedades ópticas de birrefringencia. Desde un punto de vista reológico, la presencia de este material podría contribuir significativamente al comportamiento biomecánico de la cutícula y, por tanto, de la piel. La presencia de este material celulósico está justificada biológicamente, pues la cutícula en sentido estricto es parte integral de la pared celular de las células epidérmicas, y podría ser considerada una especialización de la pared celular de aquellas células expuestas al medio externo (Essau, 1977).

Según los datos aportados por la presente memoria, tanto la piel como la cutícula de los frutos de estos tres genotipos, Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100, se

podrían considerar materiales isotrópicos, viscoelásticos y, aunque con marcadas diferencias, que se endurecen con la deformación. Las propiedades mecánicas de la piel de todos los cultivares son un reflejo de las de sus respectivas cutícula, las cuales actúan como cubiertas tensoras y cuyo comportamiento mecánico se encontraría altamente correlacionado con su grosor.

Tanto el comportamiento mecánico como las magnitudes de las propiedades mecánicas que se han obtenido en el presente trabajo son consistentes con los escasos estudios publicados hasta la fecha. Así, Wiedemann y Neinhuis (1998) observaron un módulo de Young y un esfuerzo de fractura para la cutícula aislada de frutos de tomate e hidratada de 60 MPa y ≥ 2 MPa respectivamente. El carácter viscoelástico de la piel fue observado por Thompson (2001) quién obtiene fenómenos de endurecimiento por la deformación cuando aplica ensayos de fluencia cíclicos de carga y descarga, lo que sugiere que dichos ensayos provocaban una disminución sucesiva de la tasa de fluencia. Por último, Petracek y Bukovac (1995), quienes también mostraron el carácter viscoelástico de la cutícula, obtuvieron resultados similares a los obtenidos por nosotros en los que se observa que la deformación elástica supera a la deformación plástica cuando se somete el tejido a deformaciones pequeñas. Por lo tanto, podríamos pensar en una fenomenología general de la piel y la cutícula del fruto de tomate, que podría llevar hacia un modelo general, a pesar incluso de las notables variaciones obtenidas en las propiedades mecánicas de tres genotipos como los presentados en esta memoria.

Los valores medios del trabajo de fractura de la cutícula de los distintos genotipos son comparables con los encontrados en la bibliografía para poliésteres y algunas resinas epoxy (i.e. $W \sim 100 \text{ J/m}^2$; Gordon, 1978). Es conocido que las células periféricas de un órgano vegetal que se mantiene en turgencia por la presión hidrostática soportan los esfuerzos de tensión más elevados (Kutschera, 1989; Niklas y Paolillo, 1997, 1998), es por esto que la situación de la cutícula, en la parte más externa del órgano donde las fuerzas son máximas (Considine y Brown, 1981), la predispone en el fruto del tomate a hacer frente a los esfuerzos mecánicos derivados del crecimiento y a las fluctuaciones diarias producidas por la afluencia de savia o por los cambios en temperatura. Sin embargo, los datos obtenidos indican que los tejidos subepidérmicos desempeñan un importante papel en la resistencia mecánica. Así, si tenemos en cuenta que el trabajo de fractura de un material es inversamente proporcional a su módulo de

Young, las células subepidérmicas del fruto presentaron un valor de E menor que el obtenido para la cutícula, siendo por tanto estas células capaces de absorber más energía de deformación de modo que se requeriría significativamente más energía para propagar una grieta a través de la piel del fruto que a través de su cutícula aislada. Este hecho queda patente si se comparan los valores de W entre la cutícula y la piel (Figura 3.14).

Técnicamente no ha sido posible estudiar las propiedades mecánicas en tensión del tejido subepidérmico debido a la imposibilidad de retirar el material cuticular sin desintegrar la estructura celular del tejido. Así, la única forma de inferir el valor de E para este tejido sería a través de un modelo predictivo. De forma general, el modelo de Voigt (Niklas, 1992b) predice un valor de E de 24 MPa para el tejido subepidérmico, lo que es significativamente menor que el obtenido para la cutícula de cualquiera de los cultivares con los que hemos trabajado. Este modelo asume que el módulo de Young de la piel (E_p) del fruto sería la suma de los módulos de la cutícula (E_{CM}) y del tejido subepidérmico (E_{sb}) corregidos por el factor de contribución en volumen de cada uno de ellos (f_{CM} y f_{sb} respectivamente) tal que:

$$E_p = E_{CM} f_{CM} + E_{sb} f_{sb}$$

Tomando como ejemplo los valores medios de Inbred 10, $E_p = 43.5$ MPa, $E_{CM} = 70.3$ MPa y asumiendo que la cutícula representa un 25% del total de la piel, deducido a partir de las imágenes de los cortes histológicos teñidos (Figura 3.7) ($f_{CM} = 0.25$ y $f_{sb} = 0.75$), obtenemos según el modelo de Voigt un valor para $E_{sb} = 34.6$ MPa. Aplicando el modelo de igual forma para Sausalito Cocktail se obtendría un valor $E_{sb} = 26.2$ MPa y para Sweet 100 $E_{sb} = 21.5$ MPa. El rango de valores que predice este modelo para las muestras analizadas es consistente con los valores de E observados para el colénquima de hojas de *Apium graveolens* L. y *Levisticum officinale* Koch, alrededor de los 22 MPa según Esau (1936) y Ambrónn (1881) respectivamente recogidos por Niklas (1992a).

Los resultados de los ensayos de fluencia y de fractura por tensión llevarían a considerar al tejido como un material compuesto, integrado por la unión física de la cutícula al colénquima. En este material compuesto se puede dar una incompatibilidad por deformación cuando la piel se extiende por encima de la deformación máxima de la cutícula, produciéndose la separación de la estructura bilaminada que compone la piel del fruto. Este fenómeno fue observado en algunos de los ensayos de fractura por

tensión. Pequeñas grietas se propagaban por la superficie de la cutícula mientras que el colénquima de la subepidérmis soportaba sin romperse el incremento progresivo de tensión mecánica. Es conocido que el colénquima es capaz de soportar grandes deformaciones elásticas sin llegar a romperse (Esau, 1936, 1977; Niklas, 1992a).

La incompatibilidad por deformación descrita fue más pronunciada en Sweet 100 que en los otros genotipos, lo que puede tener un significado fisiológico en el desarrollo de los frutos. Si un fruto recibe un aporte de agua que provoque su expansión, la cutícula podría experimentar fuerzas de tensión que excedan su capacidad de deformación elástica, produciendo pequeñas fracturas que dejaría expuesto el tejido subyacente. Este escenario podría explicar porqué los frutos de variedades susceptibles como Sweet 100 se agrietan cuando están aún en la planta mientras que variedades más resistentes apenas producen frutos agrietados. Serviría, además, para explicar porqué se producen las grietas en la cutícula de los frutos y luego se extienden en longitud y penetran hacia los tejidos interiores del fruto como ha sido descrito por distintos autores en tomate (Emmons y Scott, 1998a) y en manzana (Maguire y col., 1999).

No hay que olvidar, sin embargo, que existen otros escenarios igualmente posibles, cuando no excluyentes, para la existencia del agrietado. Otro de estos escenarios se explicaría por el hecho de que Sweet 100, la variedad más susceptible, presenta fenómenos de fatiga en la cutícula aislada, y de forma más discreta en la piel, cuando son sometidas a ciclos de extensión y relajación (Fig. II-5). La fatiga mecánica podría llevar a la piel del fruto a agrietarse durante los repetidos ciclos diarios de expansión y contracción del fruto. Por el contrario, Inbred 10 presenta un característico endurecimiento por deformación durante los mismos ensayos cíclicos, incrementando por tanto su capacidad para soportar mayores fuerzas de tensión.

Los resultados de nuestros ensayos y del estudio anatómico de la piel del fruto de tomate sugieren que los fenómenos de endurecimiento por deformación y la fatiga, o ablandamiento por deformación, reflejan la respuesta del material celulósico imbuido en la matriz cuticular a las fuerzas de tensión. Trabajos anteriores indicaban que los componentes microfibrilares en la pared celular pueden alinearse progresivamente en la dirección de las fuerzas de tensión aplicadas tal que el módulo de Young efectivo se incrementaría (Köhler y Spatz, 2002). Sin embargo, si la extensión es excesiva, las fibrillas de celulosa que componen estas microfibrillas podrían deslizarse unas sobre

otras, al tiempo que la matriz que las envuelve se deformaría de forma plástica y el módulo de Young tendería a disminuir. El deslizamiento de las fibrillas llevaría a la rotura y, por tanto, a una disminución la sección resistente, perdiendo capacidad mecánica al deformarse. Aunque de forma especulativa, esta fenomenología sugiere un modelo reológico simple para explicar el comportamiento mecánico de la piel y la cutícula del fruto de tomate. Este modelo, presentado en la Figura 4.1, tendría en cuenta la abundancia relativa de microfibrillas incluidas en la cutícula al tiempo que las diferencias anatómicas entre los genotipos estudiados.

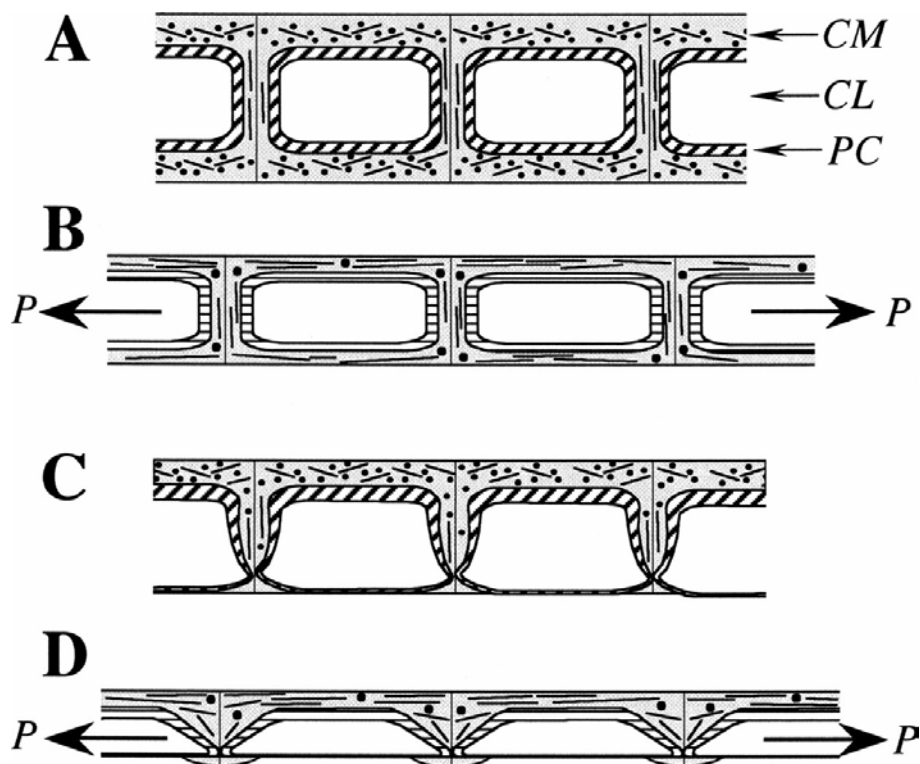


Figura 4.1: Representación esquemática del modelo propuesto para explicar el comportamiento biomecánico de la membrana cutícula (cutícula) de Inbred 10 (A y B) y Sweet 100 (C y D) en sus estados relajados o en reposo (A y C) y cuando son extendidos por una fuerza P (la dirección de aplicación se indica mediante flechas en B y D). La cutícula presenta componentes microfibrilares orientados al azar (representados mediante puntos y líneas). La pared celular no cutinizada (PC) que rodea las células epidérmicas (CL) presenta componentes microfibrilares orientados (representados mediante líneas ordenadas). La aplicación de la fuerza P provoca un alineamiento de los componentes microfibrilares en la dirección de aplicación de la fuerza (B y D), que supone un endurecimiento por deformación de la cutícula y PC. Una excesiva extensión por la fuerza P provocaría la deformación de la cutina, matriz de la cutícula (área gris) y un deslizamiento entre si de las fibrillas de celulosa, causando una fatiga del material (no representado en este esquema). Cortesía del Prof. Karl J. Niklas.

De acuerdo con este modelo, una fuerza de tensión causaría que las microfibrillas de la pared celular se alinearan paralelamente a la dirección en la que se aplica la fuerza o perpendiculares a ella. En el caso de un fruto esférico como el tomate y ante un incremento en diámetro, la alineación sería paralela a la superficie del fruto. Al alinearse las microfibrillas opondrían mayor resistencia a la deformación, incrementando el módulo de Young de la cutícula, estando ante un fenómeno de endurecimiento por deformación. Cuando la extensión sea superior al límite máximo de deformación de las microfibrillas, el deslizamiento de la estructura interna de las microfibrillas, originado por la pérdida de capacidad mecánica de la fibrillas de celulosa unido a la incapacidad de la matriz que las contiene, en este caso la cutina de la cutícula, el módulo de Young disminuiría, estando entonces ante un fenómeno de fatiga o ablandamiento por deformación. La magnitud de la fuerza crítica para alcanzar el punto en el que la fibrillas comenzarían a romperse o a perder resistencia mecánica dependerá de la (orientación neta inicial), de la resistencia mecánica de las fibrillas y de la abundancia de fibrillas incluidas en la cutícula. Debido a las diferencias observadas en la cutícula de Inbred 10 y de los otros genotipos, especialmente Sweet 100, este modelo predice que la cutícula de Sweet 100, experimentaría fenómenos de fatiga a fuerzas de tensión menores que lo harían las cutícula de Sausalito Cocktail e Inbred 10.

Los resultados de la serie de ensayos biomecánicos sobre la piel y la cutícula de los frutos de Inbred 10, Sausalito Cocktail y Sweet 100 indican que existe una alta correlación positiva entre la anatomía de la piel del fruto del tomate, especialmente en el grosor de la cutícula, y sus propiedades mecánicas, particularmente la rigidez y el trabajo de fractura. Asimismo, el comportamiento mecánico de la cutícula está íntimamente ligado a la anatomía del tejido y se podría considerar la cutícula como un importante componente por su papel en la resistencia mecánica y por sus propiedades físicas.

La cutícula de Inbred 10, el genotipo más resistente, es más gruesa, más rígida y más fuerte que la de Sweet 100, el genotipo más susceptible al agrietado. Presenta incluso un trabajo de fractura mayor que las CMs de los otros dos genotipos. De igual forma, la cutícula de Sausalito Cocktail, genotipo de resistencia intermedia, presenta unas propiedades mecánicas y anatómicas que la hacen más robusta que la cutícula del genotipo más susceptible. En este sentido, habría que apuntar que no es esperable correlación alguna entre el grosor de la cutícula y el módulo de Young o el esfuerzo de

fractura (ya que para la estimación de ambas propiedades se normalizan los valores de las fuerzas aplicadas respecto a la sección de área transversal de la cutícula) a igualdad de composición de la cutícula. Por tanto, las diferencias significativas observadas en los módulos de Young y en los esfuerzos de fractura entre las muestras de piel y cutícula de los genotipos resistentes y susceptibles, indican que la piel y la cutícula de sus frutos presentan diferencias en las propiedades mecánicas de los tejidos o en algún aspecto estructural de los mismos, como por ejemplo la continuidad de la cutícula a través de las paredes periclinales de las células subepidérmicas.

Sin embargo, es esperable una buena correlación entre el grosor de la cutícula y la capacidad de la piel del fruto para resistir el agrietado ya que la rigidez y la resistencia del pericarpo dependerán tanto de la cantidad como de las propiedades mecánicas de la cutícula. De esta forma se esperaría que, incluso si las propiedades de la cutícula fuesen equivalentes entre varios genotipos, aquellos frutos con una cutícula más gruesa fuesen más resistentes al agrietado que los que presentaran una cutícula más delgada. Es esperable, por tanto, que la cutícula de un genotipo resistente fuese más gruesa al tiempo que más rígida y mecánicamente más resistente que la cutícula de un genotipo susceptible.

Quedarían, sin embargo, diversos aspectos por completar en los estudios sobre la anatomía de la cutícula y su relación con el resto de componentes de la piel. Así, por las tinciones realizadas a las muestras de estos tres genotipos no podemos estimar diferencias cuantitativas en cuanto a la cantidad del material celulósico embebido en la matriz cuticular, ni inferir si todo este material participaría de las propiedades mecánicas que se han observado y conducido a la elaboración del modelo. Por otra parte la orientación de la fibrillas aquí descrita tendría que ser corroborada por técnicas más finas que permitieran realizar una cuantificación de las distintas fracciones según su orientación relativa a la superficie del fruto y comprobar si existen diferencias entre los cultivares susceptible y los resistente.

Si estamos en lo cierto y la cutícula juega un papel determinante en las propiedades mecánicas del fruto y, por extensión, en el proceso de agrietado del fruto, las modificaciones que sobre la cutícula o sus propiedades mecánicas pudieran ejercer variables ambientales, como luz, humedad o temperatura, así como los métodos de cultivo que ejerzan influencia sobre el desarrollo del fruto, podrían ser determinantes

para comprender cómo estas variables influyen en la aparición del agrietado del fruto. En este sentido, son escasos los trabajos que abordan como varían las propiedades de la cutícula con variables que estén más o menos directamente relacionadas con la aparición de agrietado.

Composición de la cutícula

Las cutículas aisladas de fruto de tomate presentaron una relación entre los componentes principales similar en todos los genotipos estudiados. Los valores obtenidos están comprendidos entre los datos publicados para cutículas de tomate aisladas de diferentes genotipos (Riederer y Schönher, 1984; Chaumat y Chamel, 1991; Luque, 1994). Sin embargo, los diferentes genotipos presentaron diferencias significativas en estos valores si se expresaban en función de la cantidad de cutícula por unidad de área, una expresión del espesor o densidad de la cutícula empleado por algunos autores para estudiar el desarrollo de los frutos (Martin y Juniper, 1970; Baker y col., 1982).

Si bien no se pudo correlacionar la cantidad de cutícula por unidad de superficie al grado de susceptibilidad al agrietado de cada genotipo, estos valores destacaron que los genotipos que presentan una mayor resistencia al agrietado, Cascada y Cornell Inbred 10, se diferenciaban claramente de los que mostraban algún grado de susceptibilidad, Josefina y Gardeners en el primer caso y Sausalito Cocktail y Sweet 100 en el segundo. En este mismo sentido se establecieron las diferencias en cuanto a la cantidad de cutina por unidad de área, en la que destacaba Cascada con un 40% más de este material sobre los otros dos genotipos y los compuestos hidrolizables donde presentaba casi un 50% más de éstos por unidad de área que Josefina y Gardeners Delight. Esta diferenciación de los genotipos resistentes frente a los susceptibles, independientemente del grado de susceptibilidad que presente, es importante si tenemos en cuenta que estos dos componentes son los mayoritarios, frente a las ceras que sólo representaron sobre un 5% en peso, y son considerados la base estructural de la cutícula (Heredia, 2003).

A las diferencias observadas en los componentes estructurales de la cutícula de los resistentes frente a los susceptibles hay que unirle las diferencias en el grosor de la cutícula en su zona más estrecha, la localizada sobre la pared periclinal externa de las

células epidérmicas. Esta diferencia de grosor si se correlacionó con el grado de susceptibilidad de los diferentes genotipos si se tiene en cuenta los dos cultivos realizados. Aunque con diferencias en los valores absolutos, Cascada y Cornell Inbred 10 mostraron un mayor grosor al tiempo que la mayor resistencia en sus respectivos cultivos. Los de menor grosor y muy similares en los valores fueron los más susceptibles, Gardeners Delight y Sweet 100, quedando en valores intermedios los genotipos caracterizados como de resistencia intermedia.

Estructura de la cutícula

La cutícula de fruto de tomate es, sin duda, una de las más estudiadas en relación a su composición analítica y estructural. Su caracterización pasa invariablemente por métodos de análisis que emplean de algún modo los principios y técnicas de la espectroscopía vibracional. En este sentido, es conocido que estas técnicas en conjunción con otro tipo de técnicas fisicoquímicas son capaces de proporcionar información detallada acerca de la estructura de los polímeros (Siesler y Hollan Moritz, 1989; Campbell y White, 1989; Round y col., 2000). A pesar de que las diferencias observadas en la cantidad de cutina y compuestos hidrolizables en la cutícula de algunos genotipos, no se ha encontrado diferencias significativas en la estructura mediante estas técnicas de caracterización estructural.

Con la intención de elucidar la estructura de la cutícula en relación con el agrietado se realizó una comparación de la cutícula de frutos maduros, estadio en el que ocurre el agrietado, con cutícula de frutos no maduros en los que no aparece agrietado. Las diferencias encontradas apuntan a un incremento en la complejidad de la estructura de la cutícula, con un mayor grado de entrecruzamiento y un incremento en la rigidez de la cutícula debido, entre otras cosas, a la acumulación de compuestos no lipídicos característicos de la maduración del fruto, tal como indicaban las absorciones en los espectros de infrarrojos. Estas absorciones se asignaron principalmente a grupos funcionales como fenoles o estructuras características tipo flavonoides presentes en la cutícula y la cutina de los frutos de tomate maduro que no aparecen en las cutículas de frutos sin coloración y que ha ampliamente desarrollado en la literatura científica (Ramírez y col., 1992; Luque y col., 1995; Laguna y col., 1999; Villena y col., 2000;). En la misma línea, la resonancia magnética nuclear (RMN) de estado sólido de las cutinas purificadas indicaba que la presencia de resonancias adicionales en la muestras

de fruto maduro a 115 y 130 ppm se corresponderían, según la asignación realizada por Zlotnik-Mazori y Stark (1988), con la presencia de compuestos aromáticos e insaturados.

Otra diferencia en la cutícula debida a la maduración es el incremento en el entrecruzado, observado mediante la espectroscopía de infrarrojos y parece coincidir con el hecho de que se incrementa el peso de cutícula por unidad de área, pasando de 994 $\mu\text{g cm}^{-2}$ de la cutícula de frutos inmaduros de Cascada a 1916 $\mu\text{g cm}^{-2}$ de las cutículas de frutos maduros, por ejemplo. Así mismo, los resultados de otros métodos de caracterización estructural se orientan en el mismo sentido, como la menor movilidad molecular registrada en las muestras de cutina de frutos maduros mediante los tiempos de relajación en los espectros RMN.

El entrecruzado en la matriz de cutina se establece a partir de la esterificación de grupos funcionales hidroxilo secundarios, tal como indica la resonancia a 173 ppm del espectro de ^{13}C de RMN, a diferencia con lo indicado en anteriores trabajos donde se proponía que la esterificación se realizaría principalmente con los hidroxilo primarios, quedando al menos el 50% de los secundarios libres (Luque, 1994). Aunque no se excluye la presencia de enlaces éster a partir de grupos hidroxilo primarios (desplazamiento de la resonancia hacia 168 ppm; Zlotnik-Mazori y Stark, 1988), también presentes en la matriz de cutina.

Otra metodología ampliamente empleada para caracterizar la macroestructura, y concretamente la superficie, de la cutícula es la microscopía electrónica de barrido. Sin embargo, mediante esta técnica no se consigue una alta resolución que permita estudiar los detalles estructurales más finos ya que se deposita una capa de oro, normalmente de entre 20 y 50 nm, en la superficie de la muestra. Por su parte, la microscopía de fuerza atómica (AFM) ha sido usada con éxito en la caracterización detallada de estructuras y morfologías de superficies de polímeros amorfos y cristalinos así como de sistemas macromoleculares (Benítez, 2002), aunque se deben tener en consideración algunas cuestiones cuando se estudian muestras de cutícula de fruto de tomate mediante AFM.

Entre los diferentes modos de trabajo de la microscopía de fuerza atómica el más usado es el llamado modo de contacto, normalmente empleado por su gran resolución y por la posibilidad de emplearlo para estudios de las propiedades mecánicas de las

superficies a una escala nanoscópica. Sin embargo trabajando en este modo las relativamente elevadas fuerzas aplicadas sobre la superficie de las muestras podrían infringir daños estructurales y alterar los resultados. En el único estudio publicado sobre las propiedades mecánicas de la cutina de frutos de tomate empleando modo contacto (Round y col., 2000), no se han descrito estas posibles alteraciones de igual modo que no han sido observadas usando otra metodología de la presentada en esta memoria.

Los cambios estructurales observados en la superficie de las muestras estudiadas mediante AFM en la presente memoria están de acuerdo con las características moleculares y las propiedades que han manifestado las muestras en los diferentes estudios con espectroscopía de infrarrojos y RMN, así como con los datos de las extracciones y la evolución de la cantidad de cutícula por unidad de área, ayudándonos a aumentar nuestro conocimiento sobre este biopolímero. Así, la cutina aislada de los frutos de tomate aparece como un poliéster amorfo principalmente formado por la esterificación de grupos funcionales hidroxilo secundarios de monómeros dihidroxigrasos con una textura cambiante que depende del estado de maduración del fruto. Esta textura sería la consecuencia del grado de entrecruzado del polímero en cada momento. La cutina purificada a partir de la cutícula de fruto de tomate maduro es más densa y entrecruzada y se caracterizaría por una textura aplanada y suave, al tiempo que por la formación de superestructuras alargadas con una orientación preferente.

Propiedades biomecánicas

Las curvas de esfuerzo-deformación de la cutícula de fruto de tomate revelaron un comportamiento bifásico cuando los ensayos se realizaron a humedades relativas menores de 100% y distintas del mojado. Cuando se aplicaron esfuerzos menores de 0.49 N la cutícula mostró deformaciones instantáneas características de un comportamiento elástico. En contraste, cuando se aplicaron esfuerzo mayores de 0.59 N, la deformación se produjo por un proceso de fluencia. Este comportamiento bifásico no ha sido descrito previamente en los escasos estudios de las propiedades biomecánicas de la cutícula de fruto de tomate (Petracek y Bukovac, 1995; Wiedemann y Neinhuis, 1998) ni en cutícula de frutos de otras especies. Sin embargo, el comportamiento bifásico de otros tejidos vegetales ha sido descrito para fibras de *Agave americana* L. o *Cocos nucifera* L., madera de *Juniperus virginiana* L., tejidos sometidos a tensión de *Fontinalis antipyretica* Hedw. y *Equisetum hyemale* L., y para tallos de diversas especies de *Aristolochia* L. (Köhler, 2000 y varias citas en este trabajo). Köhler (2000) indicaba que, en el caso de las paredes celulares de los tallos de *Aristolochia*, las microfibrillas de celulosa son las responsable del comportamiento elástico, mientras que el resto de la matriz de la pared celular contribuye al desarrollo de las características mecánicas de carácter plástico. La cutícula puede considerarse, de igual modo, como un biopolímero compuesto principalmente por un poliéster de naturaleza amorfa (cutina) y una pequeña cantidad de ceras, y polisacáridos (compuestos hidrolizables) principalmente celulosa. La disposición macromolecular de cada uno de estos biopolímeros podría constituir la base molecular para explicar estos dos comportamientos mecánicos, elástico y viscoelástico, en la cutícula del fruto de tomate. Sin embargo, este conocimiento ha sido difícil de alcanzar por el momento (Heredia, 2003), pero será un área de estudio de gran importancia para completar nuestro conocimiento de las propiedades mecánicas de la cutícula.

El módulo de tensión, E , una medida directa de la rigidez de la muestra, ha sido ampliamente usado para caracterizar tejidos vegetales (Niklas, 1992a; Hershko y col., 1994) y para cuantificar la respuesta de estos tejidos a distintas variables como temperatura y humedad relativa (Murase y Merva, 1977; Hole, 2000). Los valores de E obtenidos en la presente memoria para la cutícula aislada de frutos de tomate se aproximan a los presentados en otros trabajos como Andrews y col. (2002) y

Wiedemann y Neinhuis (1998) para un amplio número de muestras de cutícula aislada de frutos y hojas.

Los resultados presentados en esta memoria indican que las propiedades mecánicas de la cutícula aislada de fruto de tomate dependen de la humedad relativa y de la temperatura. El módulo de tensión y el esfuerzo máximo de las muestras de cutícula varió en el mismo sentido con la humedad relativa y con la temperatura: mientras mayor la humedad relativa y la temperatura menor rigidez y esfuerzo en la fractura. Una regresión múltiple sobre el módulo de tensión reveló que los efectos combinados de la humedad relativa y la temperatura explicaban el 89.8% de la varianza observada para E (tomando como ejemplo los valores de Cascade, $R^2 = 0.898$, $P < 0.001$). La regresión de E con la temperatura o con la humedad relativa, por separado, la bondad del ajuste disminuyó considerablemente, con unos valores de R^2 de 0.146 para la temperatura y 0.789 para la humedad relativa.

Por tanto, tanto la humedad relativa como la temperatura afectaron la rigidez de la cutícula en el mismo sentido (con lo coeficientes de la regresión siempre negativos) tal que a mayor humedad relativa y mayor temperatura, menor el valor de E , aunque la humedad relativa explicase en mayor medida la varianza de E (78% y 15% respectivamente). A su vez se observa una diferencia significativa en el grado que la humedad afecta a los valores de E para la cutícula del genotipo resistente, Cascada, frente a los de Gardeners Delight, el más susceptible al agrietado. En este sentido la cutícula del fruto de Gardeners Delight se afecta en mayor grado por la acción del agua, disminuyendo su rigidez y siendo más maleable.

Humedad relativa y temperatura explicaron conjuntamente el 63% de la varianza observada en σ_b de la cutícula de Cascada ($R^2=0.630$, $P<0.001$). De igual forma que para el módulo de tensión, la humedad relativa explicó la variabilidad de σ_b ($R^2 = 0.383$) en mayor medida que la temperatura ($R^2 = 0.247$), aunque en este caso la contribución de cada uno fue más similar que para E (38% y 25% respectivamente). Por tanto, la resistencia de la cutícula se vio afectada por la humedad relativa y por la temperatura. Sin embargo, la dependencia que E mostró de la humedad relativa y la temperatura se ha podido demostrar sólo en la fase elástica de las curvas de esfuerzo-extensión; el módulo de tensión calculado en la fase viscoelástica, E_v , fue independiente de ambas variables ambientales, indicando que tanto humedad relativa como

temperatura afectaron el componente estructural responsable de la rigidez sólo en la parte elástica de la curva. Además de lo anterior, la rigidez y el esfuerzo en la fractura parecen estar correlacionados a través de la humedad relativa y la temperatura.

El conjunto de las 77 muestras de cutícula de Cascada en las que se determinaron tanto la rigidez como la resistencia fueron utilizadas para estudiar la posible relación entre estas dos características. En general, E y σ_b variaron en el mismo sentido, a mayores valores de E , mayores valores de σ_b (Figura 4.2). La relación entre las dos variables se ajustó a una regresión lineal ($R^2 = 0.55$, $P > 0.99$) y no pudo encontrarse un ajuste mejor mediante regresiones polinómicas, logarítmicas o exponenciales.

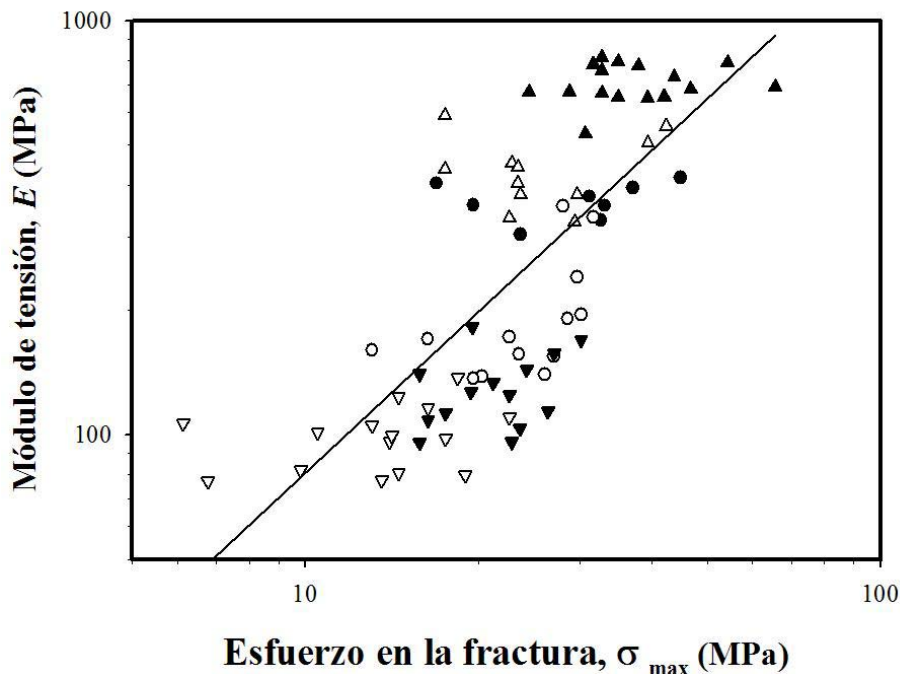


Figura 4.2: Ajuste de regresión entre la rigidez y la resistencia muestras de cutícula de frutos de Cascada al 40 % de humedad relativa (RH) y temperaturas menores (▲) y mayores (△) de la transición, al 80 % RH y temperaturas menores (●) y mayores (○) de la transición, y mojadas y a temperaturas menores (▼) y mayores (▽) de la transición.

Tras comprobarse que tanto la humedad relativa como la temperatura afectaban a E y a σ_b , se estudió la relación entre estas dos variables empleando las mismas muestras de cutícula a una misma humedad relativa y a una misma temperatura. Para una humedad relativa del 40% o del 80%, la variación de σ_b producida por el cambio de temperatura entre 10 y 45 °C tan solo permitió explicar el 28% de la varianza observada en E ; siendo la tasa de incremento de E próxima a 7 MPa por cada MPa que incrementó

σ_b . Cuando las muestras de cutícula se mojaron, E y σ_b fueron independientes (Tabla 4.1). A las temperaturas constantes de 10, 23, 35 y 45 °C, la variación de σ_b producida por el cambio de la humedad relativa entre 40% y mojado permitió explicar aproximadamente la mitad (44 – 49%) de la variación de E , siendo en este caso la tasa de incremento de E próxima a 15 MPa por cada MPa que incrementó σ_b . A 30 °C, la variación de σ_b producida por el cambio de la humedad relativa permitió explicar una alta proporción de la varianza de E (hasta un 70%). Esto puede ser debido a que la temperatura de 30 °C está próxima, o dentro de, la transición, donde dieron grandes variaciones en E y σ_b con pequeños cambios en la temperatura.

Tabla 4.1: Correlaciones lineales entre la rigidez (y) y la resistencia (x) y entre ε_b (y') y la resistencia (x') para muestras de cutícula de frutos de Cascada al 40 y 80 % de humedad relativa y mojado, y temperaturas de 10, 23, 30, 35 y 45 °C.

Variable	Nº de muestras	Regresión lineal	R ²	Regresión lineal	R ²
40% HR	25	$y = 7.46x + 347$	0.28	$y' = 0.30x' + 2.21$	0.41
80% HR	21	$y = 7.19x + 71$	0.27	$y' = 0.37x' + 4.8$	0.63
Mojado	31	$y = 3.32x + 66$	0.14	$y' = 0.37x' + 8.1$	0.29
10°C	14	$y = 12.34x + 36$	0.49	$y' = 0.17x' + 9.4$	0.25
23°C	15	$y = 19.82x + 149$	0.44	$y' = 0.06x' + 12.1$	0.01
30°C	16	$y = 40.72x - 757$	0.70	$y' = -0.38x' + 23.9$	0.28
35°C	21	$y = 11.68x - 34$	0.45	$y' = 0.30x' + 8.5$	0.25
45°C	11	$y = 15.80x - 92$	0.47	$y' = 0.14x' - 8.5$	0.10
General	77	$y = 16.19x - 95$	0.55	$y' = 0.15x' - 10.0$	0.11

Aunque estudios previos de la biomecánica de la cutícula aislada de fruto de tomate describieron una reducción de los valores de E después de hidratar la muestra o de eliminar las ceras (Petracek y Bukovac, 1995; Wiedemann y Neinhuis, 1998), ninguno de estos autores describe los efectos que la humedad relativa y la temperatura podrían tener sobre las propiedades mecánicas de la cutícula del fruto de tomate.

La presencia de agua en las muestras de cutícula determina en gran medida sus propiedades mecánicas. Nuestros resultados muestran que la rigidez de la cutícula mostró una gran disminución del valor de E cuando se sumergió en agua, confirmando los resultados obtenidos por Petracek y Bukovac (1995) y Wiedemann y Neinhuis (1998). Adicionalmente, en la presente memoria se han caracterizado las propiedades mecánicas de las muestras de cutícula sumergidas, demostrando que presentan un comportamiento viscoelástico que produce una curva esfuerzo-extensión lineal monofásica, con los menores módulos de tensión y esfuerzo de fractura. A humedades

relativas por debajo del 100%, no mojado, la curva de esfuerzo-extensión es bifásica y se establece una correlación negativa entre E y la humedad relativa. Sin embargo, para elaborar una explicación más completa y acertada del efecto de la humedad relativa en las propiedades mecánicas de la cutícula se debe tener en cuenta el efecto de la temperatura. Más aun, los resultados presentados en esta memoria revelan que los efectos de la temperatura y la humedad relativa sobre la rigidez y la fuerza de fractura están estrechamente ligados.

Se ha mostrado que E y σ_b en la fractura de la cutícula de fruto de tomate disminuyeron al aumentar la temperatura. Esta relación no fue lineal sino que mostró dos estados o zonas, en las que estas propiedades del material fueron independientes de la temperatura, separadas por una zona de transición que variaba entre 23 y 35 °C dependiendo de la humedad relativa a la que se realizaron los ensayos. Esta característica de la respuesta de E y σ_b con la temperatura se podría relacionar con la presencia de una transición térmica en la cutina de las cutícula aisladas de fruto de tomate.

El estudio de las propiedades térmicas de la cutícula aislada de fruto de tomate ha revelado la presencia de un evento térmico en la cutícula, y que se muestra más patente en la cutina purificada. Las muestras de cutina presentaron una clara transición de segundo orden, del tipo transición vítrea, en un rango de temperaturas de 18-30 °C. En general, la transición vítrea se puede interpretar como un rango de temperatura en el cual el movimiento de los segmentos de una macromolécula se activa por la temperatura. La temperatura a la que se inicia la transición vítrea, T_g , en los biopolímeros aumenta con la rigidez de las cadenas y la intensidad de las interacciones inter- e intramoleculares, incluyendo el impedimento de la rotación interna a lo largo de la cadena macromolecular. Por esto, la transición vítrea representa una pseudo-transición termodinámica de segundo orden que se manifiesta como un cambio instantáneo en sus propiedades físicas, como la viscosidad, el coeficiente de expansión y el calor específico. La transición es un proceso cinético y de relajación de los sistemas que están lejos del equilibrio, esto es un estado de no equilibrio que tiende a relajarse hacia un equilibrio estable (Wunderlich, 1982). La importancia de la existencia de temperaturas de transición vítrea en los sistemas biológicos no está completamente establecida. En el caso de la cutina vegetal, entendida como el armazón de la cutícula, la presencia de la temperatura de transición vítrea implica la existencia de determinados cambios

conformacionales en la disposición macromolecular amorfa del poliéster. Adicionalmente, se conoce que la transición de segundo orden, en particular la temperatura de transición vítrea, marca el comienzo de la movilidad de los segmentos de un polímero, condicionado sus propiedades mecánicas y reológicas (Rodríguez, 1989). La presencia de una transición vítrea en las muestras de cutícula, y concretamente en la cutina, aislada de frutos de tomate sugiere la coexistencia, en un intervalo de temperaturas fisiológico, de dos estados con diferentes características estructurales y viscoelásticas: por debajo de la temperatura de transición el poliéster permanece con una libertad vibracional y de rotación restringidas, además de una efectiva pérdida de movimiento de traslación. Por encima de la temperatura de transición se produce un incremento en el movimiento de las cadenas, mayor libertad vibracional y de rotación, y un aumento en los espacios entre cadenas, lo que conduce a una fluidificación del poliéster.

Los cambios que se producen en el polímero una vez que se supera la temperatura de transición vítrea pueden modificar las características iniciales del material si se produce un enfriamiento brusco, tal que puede llegar a desaparecer la transición debido a una nueva reorganización de las cadenas del polímero que no experimente los cambios inducidos por un incremento en la temperatura, tal como se observa en la Figura 3.26A. Esta modificación de las propiedades térmicas del material, conocida como curado o “annealing” se manifiesta también en el espaciado interno del poliéster. En los difractogramas de rayos X se observó un desplazamiento del máximo en el espaciado del poliéster de cutina, cuando tras un calentamiento y posterior enfriamiento a una temperatura inferior a la T_g (Figura 3.18), lo que parece indicar que el polímero se reordena y condensa, manifestándose como una disminución de 0.036 nm en el espaciado d_0 descrito por Luque (1994; Luque y col., 1995).

Es interesante notar que la cutícula de los frutos maduros apenas registra la presencia de transición vítrea al tiempo que, por otro lado, no se observa una reordenación en el espaciado en la cutina purificada y analizada por difracción de rayos X. Esto sería indicativo de una mayor rigidez del polímero, con una capacidad de movimiento de sus cadenas limitada, reflejo de un mayor entrecruzamiento del entramado éster, o por la deposición de otros materiales cuticulares como fenoles (principalmente flavonoides) y polisacáridos (Holloway, 1982b), o ceras intra- y epicuticulares.

En conjunto, todos estos resultados permitirían elaborar un modelo macromolecular para el comportamiento biomecánica de la cutícula del fruto de tomate estudiado y descrito en la presente memoria: la elevada rigidez asociada a un estado vítreo por debajo de la temperatura de transición y características plásticas, asociadas a su vez a un estado más viscoso, por encima de la temperatura de transición.

El agua, a su vez, jugaría un papel fundamental en este complejo escenario. La temperatura de transición vítrea, T_g , disminuye hasta 16.3 °C cuando la muestra absorbía agua, en lo que aparece como un claro efecto de plastificación del material. Si consideramos que las cutículas aisladas (y en cierta medida también la cutina purificada) adsorben cantidades variables de agua en función de la humedad relativa (Chamel y col., 1991; Luque y col., 1995), las variaciones observadas en la cutícula y en sus propiedades mecánicas se verán, en consecuencia, alteradas.

El efecto de plastificado se puede describir en una disminución de la fuerza de fractura, el módulo elástico y, posiblemente, la viscosidad del polímero. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Round y col. (2000) mediante microscopía de fuerza atómica y RMN de estado sólido tal como se puede observar en la Figura 3.29 para los valores de E en función de la humedad relativa y la temperatura. Estos autores indicaban que el agua adsorbida por la cutina del fruto de tomate actuaba como un plastificador favoreciendo una flexibilidad molecular que ablandaba el polímero y, en consecuencia, disminuía su módulo elástico (Round y col., 2000). Así, el efecto plastificador del agua podría deberse a un debilitamiento de los puentes de hidrógeno y otras interacciones intermoleculares por un apantallamiento de estas fuerzas, principalmente atractivas, por el agua, disminuyendo o alterando las interacciones entre los distintos componentes de la cutícula.

En suma, la hidratación y la temperatura tienen un efecto muy importante en la rigidez y en la fuerza de fractura de la cutícula aislada del fruto de tomate. Aún más, aunque no hay a priori una relación teórica entre E y σ_b , los resultados presentados en esta memoria muestran que la rigidez y el esfuerzo en la fractura están linealmente relacionados. Considerando que la rigidez y el esfuerzo en la fractura de un material biológico compuesto, como la cutícula de fruto de tomate, dependen de los componentes del material (principalmente cutina y polisacáridos en el caso de la cutícula de fruto de tomate) y en la relación estructural que se establezca entre estos

componentes, la correlación empírica observada en estos resultados entre rigidez y esfuerzo en la fractura podría indicar el efecto del agua y la temperatura en la relación estructural entre los componentes de la cutícula del fruto de tomate. Serán necesarios más estudios para elucidar cuales son las bases estructurales del comportamiento mecánico de la cutícula y como la disposición estructural entre los diversos componentes se modifican o cambian por el efecto de la temperatura y del agua que contenida en el material.

A diferencia de E y σ_b , la máxima deformación alcanzada antes de la fractura permaneció constante en el rango de temperaturas y humedad relativa ensayados. La deformación máxima y la rigidez de la cutícula fueron independientes tanto si se tomaban todas las muestras en conjunto como si se distribuían en función de la misma humedad relativa o la misma temperatura. De igual forma la deformación máxima y el esfuerzo máximo fueron independientes al tomar el conjunto de todas las muestras, sin embargo, cuando se analizaron los resultados agrupados por la misma humedad relativa, se observó una correlación positiva significativa a un 40% y a un 80% de humedad relativa (Tabla 4.1). No se observó esta correlación entre ϵ_b y σ_b cuando se agruparon los resultados para una misma temperatura.

Considerando el caso de un fruto de tomate, la relajación de la presión interna por una deformación de su superficie, y de su cutícula, sería similar en diferentes condiciones ambientales, tal que el agrietado de la cutícula del fruto dependerá de la rigidez y de la fuerza de fractura del material, por un lado, y de la presión interna por otro siendo la capacidad de extensión máxima de su piel un valor característico de cada genotipo y, posiblemente, del estadio de desarrollo del fruto.

CONCLUSIONES



“En el majestuoso conjunto de la creación, nada hay que me conmueva tan hondamente, que acaricie mi espíritu y dé vuelo desusado a mi fantasía como la luz apacible y desmayada de la luna.”

Gustavo Adolfo Bequer

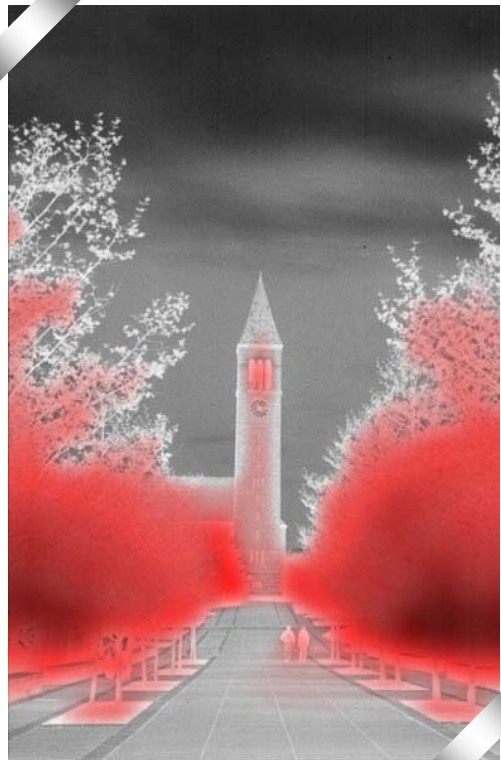
Conclusiones

El agrietado del fruto de tomate es un proceso complejo en el que intervienen numerosos aspectos, tanto factores ambientales como características propias del fruto. En el proceso de agrietado del fruto, la piel juega un papel crucial como estructura que soporta las tensiones procedentes de la presión interna del fruto y que establece una relación directa con algunos de los factores ambientales externos al fruto, como son la presencia de agua y la temperatura. En este papel de soporte, la cutícula del fruto se sitúa como el elemento estructural que más responde a los efectos combinados de la hidratación y la temperatura siendo este comportamiento crítico para explicar la biomecánica de la piel del fruto.

En esta Memoria, hemos determinado que una elevada temperatura y el mojado del fruto provocan un incremento en el agrietado de los frutos en postcosecha, no por un aumento de la presión interna del fruto, sino por una alteración de las propiedades biomecánicas de la piel, disminuyendo la rigidez y la resistencia de la cutícula, modificando el comportamiento viscoelástico mediante un incremento del carácter plástico, y perdiendo elasticidad. Además, la anatomía de la piel y la cutícula y sus propiedades mecánicas determinan, en cierta medida, la susceptibilidad de cada genotipo. El grosor de la cutícula, además de ser un factor determinante en la biomecánica de la piel, es un carácter asociado a la resistencia al agrietado de los frutos en los genotipos estudiados, constituyendo, por tanto, un potencial marcador para la selección y mejora de líneas de resistencia.

Por tanto, para disminuir el agrietado de los frutos de tomate habría que evitar que se mojasen o se condensase agua en ellos y que estuvieran a temperaturas elevadas, mas somos consientes de las dificultades implícitas en el control de la humedad y la temperatura en los invernaderos actuales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS



“Todo lo que una persona puede imaginar, otras podrán hacerlo realidad.”

Julio Verne

Referencias bibliográficas

Aalbersberg I.W. y Stolk J.H. 1994. A method for assessing the extent of fruit crazing in tomato varieties. *Plant Varieties and Seeds* **7**(2): 121-125.

Agrios G.N. 1967. Net-like and ring-like cracking of pear fruit. *Phytopathology* **57**(8): 801-&.

Almeida D.P.F. y Huber D.J. 2001. Transient increase in locular pressure and occlusion of endocarpic apertures in ripening tomato fruit. *Journal of Plant Physiology* **158**(2): 199-203.

Aloni B., Karni L., Rylski I., Cohen Y., Lee Y., Fuchs M., Moreshet S. y Yao C. 1998. Cuticular cracking in pepper fruit. I. Effects of night temperature and humidity. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73**(6): 743-749.

Ambrohn, H. 1881. Über die Entwicklungsgeschichte und die mechanischen Gewebesystems. *Jahrbuch der Wissenschaften Botanis* **12**:473 – 541.

Andersen P.C. y Richardson D.G. 1982. A rapid method to estimate fruit water status with special reference to rain cracking of sweet cherries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**(3): 441-444.

Andrews J., Adams S.R., Burton K.S. y Evered C.E. 2002. Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *Journal of Experimental Botany* **53**(378): 2185-2191.

Anterson T.L. 1995. Fracture mechanics—fundamentals and applications. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Ariza J. 2005. Agrietado del fruto de tomate tipo cereza. Estudio de algunos factores implicados y posibles soluciones. Proyecto Fin de Carrera. Ingeniero Técnico Agrícola. Universidad de Almería.

Armstrong R.J. y Thompson A.E. 1967. A diallel analysis of tomato fruit cracking. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **91**:505-&.

Armstrong R.J. y Thompson A.E. 1969. A rapid and accurate system for scoring tomato fruit cracking. *Hortscience* **4**(4): 288-290.

Baker E.A., Batt R.F., Roberts M.F. y Martin J.T. 1962 Studies on plant cuticle: progress report. *Report of the Agricultural and Horticultural Research Station*, pp 114-123. University of Bristol, Reino Unido.

Baker E.A., Bukovac M.J. y Hunt G.M. 1982 Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. En: *The plant cuticle*, pp 33-44. Cutler D. F., Alvin K. L. y Price C. E., eds. Academic Press, Londres, Reino Unido.

Bakker J.C. 1988. Russeting cuticle cracking in glasshouse tomatoes in relation to fruit growth. *Journal of Horticultural Science* **63**(3): 459-464.

Bally I.S.E. 1999. Changes in the cuticular surface during the development of mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kensington Pride. *Scientia Horticulturae* **79**(1-2): 13-22.

Bargel H., Spatz H.C., Speck T. y Neinhuis C. 2004. Two-dimensional tension tests in plant biomechanics sweet cherry fruit skin as a model system. *Plant Biology* **6**(4): 432-439.

Batal K.M., Weigle J.L. y Foley D.C. 1970. Relation of stress strain properties of tomato-d skin to cracking of tomato-d fruit. *Hortscience* **5**(4): 223-224.

Bauhin C. 1623. Pinax theatri botanici. *Basel: Regis*, 310-313.

Benítez JJ. 2002. Análisis de Materiales Por Afm: Conceptos, Instrumentación, Aplicaciones. En: Técnicas Instrumentales y su Aplicación al Estudio del Patrimonio Histórico y Cultural. Curso Teórico Practico. Sevilla. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. Vol. 1. 2002. Pag. 109-115.

Bennett H.S. 1950. The microscopical investigation of biological materials with polarized light, p. 591 – 677. En: M.R. McClung Jones (ed.). McClung's handbook of microscopical technique. Paul B. Hoeber, Inc., New York.

- Berenguer, J.J., Escobar I. y Cuartero J.** 2002. Greenhouse cultivation of cherry tomatoes in Spain. Ist International Symposium on Cherry Tomatoes. Santorini, Greece.
- Bonner L.J. y Dickinson H.G.** 1989. Anther dehiscence in *Lycopersicon esculentum*. I. Structural aspects. *New Phytologist* **113**:97-115.
- Brown G., Wilson S., Boucher W., Graham B. y Mcglasson B.** 1995. Effects of copper calcium sprays on fruit cracking in sweet cherry (*Prunus-Avium*). *Scientia Horticulturae* **62**(1-2): 75-80.
- Brown G.S., Kitchener A.E., McGlasson W.B. y Barnes S.** 1996. The effects of copper and calcium foliar sprays on cherry and apple fruit quality. *Scientia Horticulturae* **67**(3-4): 219-227.
- Buchholz A. y Schönherr J.** 2000. Thermodynamic analysis of diffusion of non-electrolytes across plant cuticles in the presence and absence of the plasticiser tributyl phosphate. *Planta* **212**:103-111.
- Bukovac M.J., Knoche M., Pastor A. y Fader R.G.** 1999. The cuticular membrane: a critical factor in rain-induced cracking of sweet cherry fruit. *Hortscience* **34**(3): 549.
- Bukovac M.J., Rasmussen H.P., Shull V.E.** 1981. The cuticle: surface structure and funcion. *Scanning electron microscopy*. 213-223 Part. 3.
- Campbell D. y White J.R.** 1984. Polymer characterization. Chapman y Hall [eds] London, UK.
- Cánovas F.** 1995. Manejo del cultivo sin suelo. En: F. Nuez, (Ed.), El cultivo del tomate, Mundi-Prensa, Madrid pp. 227-254.
- Casado C.G. y Heredia A.** 2001. Specific heat determination of plant barrier lipophilic components: biological implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1511**(2): 291-296.

Castilla N.C. 1995. Manejo del cultivo intensivo con suelo. In: Nuez, F. (ed.). El cultivo del tomate. Madrid: Mundi Prensa. p. 189-225, 1995.

Chamarro, J. 1995. Anatomía y fisiología de la planta. En: Nuez F., (Ed.), El cultivo del tomate, Mundi-Prensa. Madrid pp. 41-91.

Chamel A., Pineri M. y Escoubes M. 1991. Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant, Cell and Environment* **14**:87-95.

Chaumat E. y Chamel A. 1991. Suptiton and permeation to phenylurea herbicides of isolated cuticles of fruit and leaves. Effects of cuticular characteristics and climatic parameters. *Chemosphere* **22**:85-97.

Chretien S., Gosselin A. y Dorais M. 2000. High electrical conductivity and radiation-based water management improve fruit quality of greenhouse tomatoes grown in rockwool. *Hortscience* **35**(4): 627-631.

Chu M.C. y Thompson A.E. 1972. Morphology and genetics of fleshy calyx and their relation to crack resistance in tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **97**(2): 197-203.

Considine J.A, y Kriedemamm P.E. 1972. Fruit splitting in grapes - determination of critical turgor pressure. *Australian Journal of Agricultural Research* **23**(1): 17-24.

Considine J.A. y Brown K. 1981. Physical aspects of fruit-growth - theoretical-analysis of distribution of surface growth forces in fruit in relation to cracking and splitting. *Plant Physiology* **68**(2): 371-376.

Cortes C., Ayuso M.C., Palomares G., Cuartero J. y Nuez F. 1983. Relationship between radial and concentric cracking of tomato fruit. *Scientia Horticulturae* **21**(4): 323-328.

Cotner S.D., Burns E.E, y Leeper P.W. 1969. Pericarp anatomy of crack-resistant and susceptible tomato fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **94**(2): 136-8.

- Cuartero J., Palomares G., Balasch S. y Nuez F.** 1981. Tomato fruit cracking under plastic-house and in open air. II. General and specific combining abilities. Genetics and breeding of tomato. *Proceeding of the Meeting Eucarpio Tomato Working Group*. Avignon, 91-98.
- Desmet M., Lammertyn J., Verlinden B.E. y Nicolai B.M.** 2002. Mechanical properties of tomatoes as related to puncture injury susceptibility. *Journal of Texture Studies* **33**(5): 415-429.
- Domínguez E.** 2000. Mejora genética de la fertilidad del polen de tomate a bajas temperaturas: aprovechamiento de la selección gametofítica. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Ehret D.L. y Helmer T.** 1995. Factors contributing to cuticle cracking in greenhouse tomato fruit. *Hortscience* **30**(4): 846.
- Ehret D.L., Helmer T. y Hall J.W.** 1993. Cuticle cracking in tomato fruit. *Journal of Horticultural Science* **68**(2): 195-201.
- Emmons C.L.W. y Scott J.W.** 1996. Factors affecting cuticle cracking in tomato. *Proceeding of Florida State Horticultural Society* **109** 178-182.
- Emmons C.L.W. y Scott J.W.** 1997. Environmental and physiological effects on cuticle cracking in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**(6): 797-801.
- Emmons C.L.W. y Scott J.W.** 1998a. Ultrastructural and anatomical factors associated with resistance to cuticle cracking in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Plant Sciences* **159**(1): 14-22.
- Emmons C.L.W. y Scott J.W.** 1998b. Diallel analysis of resistance to cuticle cracking in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **123**(1): 67-72.
- Esau K.** 1936. Ontogeny and structure of collenchyma and of vascular tissues in celery petioles. *Hilgardia* **10**:431 – 476

Esau K. 1977. Anatomy of seed plants (2^{ed}). John Wiley & Sons, Nueva York, Estados Unidos.

Esquinas-Alcázar J. y Nuez F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: *el cultivo del tomate*, pp 11-42. Nuez F. ed. Mundi-Prensa. Madrid.

Flores P., Navarro J.M., Carvajal M., Cerda A. y Martinez V. 2003. Tomato yield and quality as affected by nitrogen source and salinity. *Agronomie* **23**(3): 249-256.

Frazier W.A. 1934. A study of some factors associated with the occurrence of cracks in the tomato fruit. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **32**:519-523.

Frazier W.A. y Bower J.L. 1947. A final report on studies of tomato fruit cracking in Maryland. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **49**:241-255.

García-Luis A., Duarte A.M.M., Porrás I., García-Lidón A. y Guardiola J.L. 1994. Fruit splitting in “Nova” Irbid mandarin in relation to the anatomy of the fruit and fruit set treatments. *Scientia Horticulturae* **57**:215-231.

Georget D.M.R., Smith A.C. y Waldron K.W. 2001. Effect of ripening on the mechanical properties of Portuguese and Spanish varieties of olive (*Olea europaea* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**(4): 448-454.

Glenn G.M. y Poovaiah B.W. 1989. Cuticular properties and postharvest calcium applications influence cracking of sweet cherries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **114**(5): 781-788.

Gordon J.E. 1978. Structures. Plenum Publishing Company, New York, NY.

Guichard S., Bertin N., Leonardi C. y Gary C. 2001. Tomato fruit quality in relation to water and carbon fluxes. *Agronomie* **21**(4): 385-392.

Hamilton R.J. 1996. Waxes: chemistry molecular biology and functions. The oily press, Dundee.

Hamson A.R. 1952. Measuring firmness of tomatoes in a breeding program. *American Society for Horticultural Science* **60**:425-433.

Hankinson B. y Rao V.N.M. 1979. Histological and physical behavior of tomato skins susceptible to cracking. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **104**(5): 577-581.

Hasan M.A. y Chattopadhyay P.K. 1996. Correlation of pulp nitrogen, phosphorus and potassium and peel calcium with fruit cracking in litchi (*Litchi chinensis*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* **66**(1): 25-27.

Hepler R.W. 1961. The measurement and inheritance of resistance to fruit cracking in the tomato. PhD Thesis, Univ. of Illinois, Urbana.

Heredia A. 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1620**(1-3): 1-7.

Heredia A., Casado C.G., Laguna L., Reina J.J., Serrano J.M. y Dominguez E. 1998. La cutícula vegetal: estructura y funciones. *Ecología* **12**:293-305.

Hernández T.P. y Nassar S.H. 1970. Breeding tomatoes for radial fruit crack resistance and other characters. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **95**(2):223-226.

Hershko V., Rabinowitch H.D. y Nussinovitch A. 1994. Tensile characteristics of ripe tomato skin. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **27**(4): 386-389.

Hobson G.E. 1965. Firmness of tomato fruit in relation to polygalacturonase activity. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **40**(1): 66-72.

Hole C.C., Drew R.L.K. y Gray D. 2000. Humidity and mechanical properties of onion skins. *Postharvest Biology and Technology* **19**(3): 229-237.

Holloway P.J. 1982a. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. En: *The plant cuticle*, pp 1-32. Cutler D. F., Alvin K. L. y Price C. E., eds. Academic Press, Londres, Reino Unido.

Holloway P.J. 1982b. The chemical constitution of plant cuticles. En: *The plant cuticle*, pp 45-86. Cutler D. F., Alvin K. L. y Price C. E., eds. Academic Press, Londres, Reino Unido.

Hopfinger A.J., Koehler M.G. y Pearlstein R.A. 1988. Molecular modeling of polymers. IV. Estimation of glass transition temperatures. *Journal of Polymers Science: Part B: Polymer Physics* **26**:2007-2028.

Huang X.M., Wang H.C, Gao F.F. y Huang H.B. 1999. A comparative study of the pericarp of litchi cultivars susceptible and resistant to fruit cracking. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **74**(3): 351-354.

Hunt G.M. y Baker E.A. 1980. Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* **19**(5): 1415-1419.

Jeffree C. E. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. En: *Plant cuticles: an integrated functional approach*, pp 33-82. G. Kerstiens ed. BIOS scientific publishers, Oxford.

Josan J.S., Sandhu A.S. y Kaur J. 1995. Pericarp anatomy in relation to fruit cracking in lemon (*Citrus limon*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* **65**(6): 410-413.

Köhler L. 2000. Biphasic mechanical behaviour of plant tissues. *Materials Science and Engineering C* **11**:51-56.

Köhler L. y Spatz H.C. 2002. Micromechanics of plant tissues beyond the linear-elastic range. *Planta* **215**(1): 33-40.

Kolattukudy P.E. 1981. Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Reviews of Plant Physiology* **32**:539-567.

Kraemer, G.P., y Chapman D.J. 1991. Biomechanics and alginic acid composition during hydrodynamic adaptation by *Egregia menziesii* (Phaeophyta) juveniles. *Journal of Phycology* **27**:47 – 53.

Kutschera U. y Schopfer P. 1986. Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleptiles. *Planta* **167**:527-535.

Kutschera, U. 1989. Tissue stresses in growing plant organs. *Physiologia Plantarum* **77**:157-163.

Lane W.D., Meheriuk M. y Mckenzie D.L. 2000. Fruit cracking of a susceptible, an intermediate, and a resistant sweet cherry cultivar. *Hortscience* **35**(2): 239-242.

Lendzian K.J. y Kerstiens G. 1991. Sorption and transport of gases and vapors in plant cuticles. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* **121**:65-128.

Li K.Z. y Gao Z.S. 1990. Preliminary study on the mechanism of fruit cracking in Chinese jujube. *Journal of Fruit Science* **7**(4): 221-226.

Li Y.L., Stanghellini C. y Challa H. 2001. Effect of electrical conductivity and transpiration on production of greenhouse tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Scientia Horticulturae* **88**(1): 11-29.

Li Y.L., Stanghellini C. y Challa H. 2002. Response of tomato plants to a step-change in root-zone salinity under two different transpiration regimes. *Scientia Horticulturae* **93**(3-4): 267-279.

Lichter A., Dvir O., Fallik E., Cohen S., Golan R., Shemer Z. y Sagi M. 2002. Cracking of cherry tomatoes in solution. *Postharvest Biology and Technology* **26**(3): 305-312.

Lidia L., Carolina G.C. y Heredia A. 1999. Flavonoid biosynthesis in tomato fruit cuticles after in vivo incorporation of 3 H-phenylalanine precursor. *Physiologia Plantarum* **105**(3): 491-498.

Luque P. y Heredia A. 1994. Glassy state in plant cuticles during growth. *Zeitschrift für Naturforschung* **49c**: 273-275.

Luque P. y Heredia A. 1997. The glassy state in isolated cuticles: differential scanning calorimetry of tomato fruit cuticular membranes. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**(3): 251-256.

Luque P., Bruque S. y Heredia A. 1995. Water permeability of isolated cuticular membranes: a structural analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **317**(2): 417-422.

Luque P., Gavara R. y Heredia A. 1995. A study of the hydration process of isolated cuticular membranes. *New Phytologist* **129**(2): 283-288.

Maguire K.M., Lang A., Banks N.H., Hall A., Hopcroft D. y Bennett R. 1999. Relationship between water vapour permeance of apples and micro-cracking of the cuticle. *Postharvest Biology and Technology* **17**(2): 89-96.

Marga F., Pesacreta T.C. y Hasenstein K.H. 2001. Biochemical analysis of elastic and rigid cuticles of *Cirsium horridulum*. *Planta* **213**(6): 841-848.

Maroto J.V., Bardisi A., López S., Pascual B. y Alagada J. 1995a. Influence of relative humidity in the appearance of cracking in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Acta Horticulturae* **412**:306:312.

Maroto J.V., López S., Bardisi A., Pascual B. y Alagada J. 1995b. Influence of irrigation dosage and its form of application on cracking response in cherry tomato fruits. *Acta Horticulturae* **379**:181-185.

Martin T.J. y Juniper B.E. 1970. The cuticles of plants. Edward Arnold Ltd, Londres, Reino Unido.

Matthews M.A., Cheng G. y Weinbaum S.A. 1987. Changes in water potential and dermal extensibility during grape berry development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **112**(2): 314-319.

Miles J.A., Fridley R.B. y Lorenzen C. 1969. Strength characteristics of tomatoes subjected to quasi-static loading. *Transactions of the ASAE* **12**:627-630.

Moctezuma E., Smith D.L. y Gross K.C. 2003. Antisense suppression of a β -galactosidase gene (TB G6) in tomato increases fruit cracking. *Journal of Experimental Botany* **54**(390): 2025-2033.

Muller C.H. 1940. A revision of genus *Lycopersicon*. USDA Misc. Publ., 382.

Murase H. y Merva G.E. 1977. Static elastic-modulus of tomato epidermis as affected by water potential. *Transactions of the Asae* **20**(3): 594-597.

Niklas K.J. 1992a. Plant biomechanics. University of Chicago press, Chicago, Illinois, USA.

Niklas K.J. 1992b. Voigt and Reuss models for predicting changes in Young's modulus of dehydrating plant organs. *Annals of Botany* **70**:347- 355.

Niklas K.J. y Paolillo D.J. 1997. The role of the epidermis as a stiffening agent in *Tulipa* (Liliaceae) stems. *American Journal of Botany* **84**(6):735-744

Niklas K.J. y Paolillo D.J. 1998. Preferential states of longitudinal tension in the outer tissues of *Taraxacum officinale* (Asteraceae) peduncles. *American Journal of Botany*. **85**:1068-1081.

Ohta K., Hosoki T., Matsumoto K., Ohya M., Ito N., y Inaba K. 1997. Relationships between fruit cracking and changes of fruit diameter associated with solute flow to fruit in cherry tomatoes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **65**(4): 753-759.

Ohta K., Ito N., Hosoki T. Endo K. y Kajikawa O. 1993. Influence of the nutrient solution concentrations on cracking of cherry tomato fruit grown hydroponically. *Journal of the Japan Society for Horticultural Science* **62**(2): 407-412.

Ohta K., Ito N., Hosoki T. y Sugi Y. 1991. Influence of relative humidity on fruit cracking of cherry tomato grown on hydroponic culture and its control. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **60**(2): 337-343.

Ohta K., Ito N., Hosoki T., Inaba K. y Bessho T. 1994. The Influence of the concentration of the hydroponic nutrient culture solutions on the cracking of cherry tomato with special emphasis on water relationship. *Journal of the Japan Society for Horticultural Science* **62**(4): 811-816.

Ohta K., Tsurunaga K. y Hosoki T. 1998. Possibility of controlling fruit-cracking in cherry tomatoes by light treatment at night. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **67**(2): 216-218.

Opara L.U., Studman C.J. y Banks N.H. 1997. Fruit skin splitting and cracking. *Horticultural Reviews* **19**:217-263.

Orgell W.H. 1955. The isolation of plant cuticle with pectic enzymes. *Plant Physiology* **30**:78-80.

Pagalda L. y Ruíz M. 1983. Estructura histológica de la piel de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en relación con su resistencia mecánica. *Anales del Instituto Nacional de Investigación Agrícola. Serie Agrícola* **22**:71-83.

Pascual B., Bardisi A., Lopez-Galarza S., Alagarda J. y Maroto J.V. 1998. Influencia del riego y del potencial matricial en el rendimiento y en el rajado del tomate (*Lycopersicon esculentum* (L.) Fawell). *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal* **13**(1-3):5-19.

Peacock H.D. 1966. Elementary microtechnique. E. Arnold, London.

Peet M.M. 1992. Fruit Cracking in Tomato. *HortTechnology* **2**(2): 216-223.

Peet M.M. y Willits D.H. 1995. Role of excess water in tomato fruit cracking. *Hortscience* **30**(1): 65-68.

- Peralta I.E., Knapp S. y Spooner D.M.** Monografía aún no publicada. Fuente: *Solanaceae Genomics Network* (http://sgn.cornell.edu/help/about/solanum_nomenclature.html).
- Petracek P.D. y Bukovac M.J.** 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiology* **109**: 675-679.
- Ramírez F.J., Luque P., Heredia A. y Bukovac M.J.** 1992. Fourier transform IR study of enzymatically isolated tomato fruit cuticular membrane. *Biopolymers* **32**:1425-1429.
- Reynard G.B.** 1951. Inherited resistance to radial cracks in tomato fruits. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **58**: 231-244.
- Rick C.M.** 1979. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. En: *The Biology and taxonomy of the Solanaceae*, pp. 667-678. Hawkes J.G., Lester R.N., Skelding A.D. eds. Academia Press, Nueva York.
- Riederer M. y Schönherr J.** 1984. Accumulation and transport of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in plant cuticles: I. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **8**: 236-247.
- Rodríguez F.** 1989. Principles of polymer systems, Hemisphere Publishing Corporation, New York.
- Roelofsen P.A.** 1959. The plant cell wall. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Round A.N., Yan B., Dang S., Estephan R., Stark R.E. y Batteas J.D.** 2000. The influence of water on the nanomechanical behavior of the plant biopolyester cutin as studied by AFM and solid-state NMR. *Biophysical Journal* **79**(5):2761-2767.
- Schönherr J.** 1982. Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin, suberin and associated lipids. En O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, y H. Ziegler [eds.], *Encyclopedia of plant physiology*, 153 – 179. Springer Verlag, Berlin.

Schreiber L. y Schönherr J. 1990. Phase transitions and thermal expansion coefficients of plant cuticles The effects of temperature on structure and function. *Planta* **182**:186-193.

Sekse L. 1995. Fruit cracking in sweet cherries (*Prunus-Avium* L) - Some Physiological-Aspects - A Mini Review. *Scientia Horticulturae* **63**(3-4): 135-141.

Siesler H.W. y Holland Moritz K. 1980. Infrared and Raman sprectroscopy of polymers. Marcel Dekker, NY, EEUU.

Spatz H.C., Kohler L. y Niklas K.J. 1999. Mechanical behaviour of plant tissues: Composite materials or structures? *Journal of Experimental Biology* **202**(23): 3269-3272.

Taylor I.B. 1986. Biosystematics of the tomato. En: *The tomato crop: a scientific basis for improvement*, pp 1-34. Atherton J.G. y Rudich J. eds. Chapman and Hall, Londres.

Thiagu R., Chand N. y Ramana K.V.R. 1993. Evolution of mechanical characteristics of tomatoes of 2 varieties during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**(2): 175-183.

Thompson A.E. 1965. Breeding tomato varieties with increased resistance to fruit cracking. *Illinois Research* **7**(2):12-13.

Thompson D.S. 2001. Extensiometric determination of the rheological properties of the epidermis of growing tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1291-1301.

Thompson D.S., Davies W.J. y Ho L.C. 1998. Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes. *Plant Cell and Environment* **21**(6): 589-599.

Tukey H.B. 1970. The leaching of substances from plants. *Annual Review of Plant Physiology* **21**:305-24.

- van de Vooren J. Welles G.W.H. y Hayman G.** 1986. Glasshouse crop production. En *The Tomato Crop* (eds) J.G. Atherton & J. Rudich pp. 581-623. Chapman & Hall, New York.
- Villena J.F., Dominguez E. y Heredia A.** 2000. Monitoring biopolymers presents in plant cuticles by FT-IR spectroscopy. *Journal of Plant Physiology* **156**:419-422.
- Voisey P.W., Lyall L.H. y Kloek M.** 1970. Tomato skin strength - Its measurement and relation to cracking. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **95**(4): 485-488.
- Wiedemann P. y Neinhuis C.** 1998. Biomechanics of isolated plant cuticles. *Botanica Acta* **111**(1): 28-34.
- Williams W.T., Cifuentes S., Delaguila V. y Perez R.** 1992. Rejuvenation of a peach orchard in the highlands of Guatemala through integrated management. *Tropical Agriculture* **69**(4): 341-346.
- Wilson L.A. y Sterling C.** 1976. Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cuticle. *Zeitschrift Pflanzenphysiologie* **77**: 359-371.
- Wunderlich B.** 1982. *Thermal Analysis*, Academic Press, London.
- Yamada M., Sato A. y Ukai Y.** 2002. Genetic differences and environmental variations in calyx-end fruit cracking among Japanese persimmon cultivars and selections. *Hortscience* **37**(1): 164-167.
- Yamada Y., Wittwer S.H. y Bukovac M.J.** 1964. Penetration of ions through isolated cuticles. *Plant Physiology*. 39:28-32.
- Yamamoto T., Satoh H. y Watanabe S.** 1992. The effects of calcium and naphthalene acetic-acid sprays on cracking index and natural rain cracking in sweet cherry fruits. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **61**(3): 507-511.
- Young P.A.** 1947. Cuticle cracks in tomato fruits. *Phytopathology* **37**(2): 143-145.

Zlotnik-Mazori T. y Stark R.E. 1998. Nuclear magnetic resonance studies of cutin, an insoluble plant polyester. *Macromolecules* **21**:2412-2417.

ANEXOS



“País agreste, lleno de zarzales y peñascos. Al fondo, una selva; a un lado una roca, morada de Abubilla.

En escena:

EVÉLPIDES, llevando un grajo sobre el puño.

PISTETERO, llevando igualmente una corneja; y los dos en busca del reino de las Aves.”

Aristófanes, Las Aves.

ANEXO 1

Determinación del calor específico mediante Calorimetría Diferencial de Barrido

Todos los ensayos se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Casado y Heredia (2001) y que se detalla a continuación. Las muestras se CM se maceran en un mortero de ágata y se deshidratan en cámaras estancas con sílica gel. En crisoles de aluminio se coloca una cantidad conocida de muestra en polvo. Normalmente esta cantidad osciló entre 4 y 7 mg.

Antes de realizar el ensayo con la muestra se calibra el calorímetro de la siguiente forma: Se colocan dos crisoles de aluminio vacíos uno en el horno de referencia y otro en el de la muestra y se inicia un programa de temperatura a lo largo de un rango determinado (generalmente, desde -20°C hasta 65°C), a una velocidad de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Se registra la línea base isotérmica a la temperatura inferior a la del rango, posteriormente se inicia el programa de temperatura a lo largo del rango determinado y después se registra la línea base isotérmica a la temperatura superior a la del rango, tal y como se muestra en la parte inferior de la Figura 5.1. Las dos líneas base isotérmicas se utilizan para interpolar una línea base en la zona de barrido como se indica en la parte superior de la Figura 5.1. A continuación se repite el procedimiento con una cantidad de muestra conocida obteniéndose un registro de dH/dt frente al tiempo. El flujo de calor en la muestra viene dado por la expresión:

$$dH/dt = mC_p dT/dt \quad (1)$$

donde m (g) es el peso de la muestra, C_p (J/g K) es el calor específico y dT/dt ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) es la velocidad programada de aumento de temperatura.

La ecuación 1 podría ser utilizada para obtener capacidades caloríficas específicas directamente, pero cualquier error cometido al leer el dato de ordenadas, dH/dt , y en la velocidad programada, dT/dt , afectaría a la exactitud de aquéllos. Para reducir estos errores a un valor mínimo se repite el procedimiento empleando una cantidad conocida de una sustancia de referencia, Al_2O_3 , en nuestro caso, cuya capacidad calorífica específica está perfectamente determinada, y se obtiene un nuevo registro. En la Figura 5.2 se observa un esquema del método. Así, el cálculo sólo

requiere la comparación de la variación, tanto de la muestra como de la sustancia de referencia, respecto a la línea base en el eje de ordenadas a una misma temperatura. Teniendo en cuenta esto, las variaciones de la muestra (y) y del Al_2O_3 (y^*) respecto a la línea base vienen dadas por las expresiones:

$$y = m C_p \quad (2)$$

$$y^* = m^* C_p^* \quad (3)$$

Dividiendo la ecuación (2) por la (3) y reagrupando términos obtenemos:

$$C_p/C_p^* = m^*y/my^* \quad (4)$$

Para cada muestra, C_p fue determinada experimentalmente en un rango de temperaturas prácticamente establecido, pudiéndose obtener para cada caso una expresión de C_p en función del tiempo según la ecuación polinómica:

$$C_p = a + bT + cT^2 \quad (5)$$

Una vez obtenida el calor específico es posible obtener las funciones termodinámicas entalpía (H) y entropía (S) por medio de las expresiones:

$$H = \int C_p dT \quad (6)$$

$$S = \int C_p dT/T \quad (7)$$

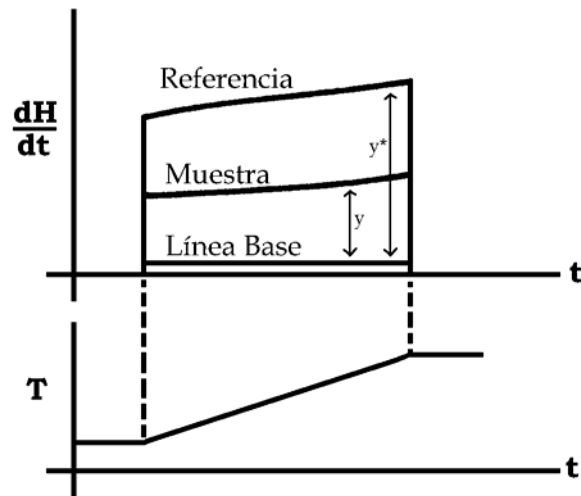


Figura 5.1. Esquema donde se indica el programa de temperatura utilizado a lo largo de un rango determinado (para detalles ver texto).

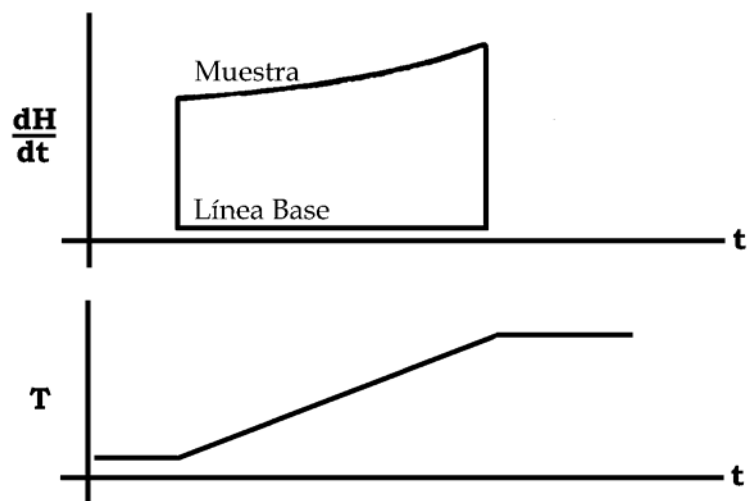


Figura 5.2. Esquema del método seguido para el cálculo de C_p .

ANEXO 2

Recursos en Internet

Bases de datos

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
Datos de FAOSTAT – Agricultura. Última actualización diciembre 2003.

🌐 <http://www.fao.org>

El Cultivo Protegido en Clima Mediterráneo

🌐 <http://www.fao.org/DOCREP/005/S8630S/s8630s00.htm#Contents>

Ministerio de Economía. Servicio Oficial de Inspección, Vigilancia y Regularización de
las Exportaciones (SOIVRE)

🌐 <http://www.mineco.es>

Software científico

JMP (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)

🌐 <http://www.jmp.com/>

SigmaPlot (Systat Software Inc. Richmond, California, USA)

🌐 <http://www.systat.com/products/SigmaPlot/>

TELIX (deltaComm's)

🌐 <http://www.telix.com/delta/deltacom/tfd/>

Empresas de semillas

Frunet s.l.

Ⓢ <http://www.frunet.net/>

Hazera España 90, S.A.

Ⓢ <http://www.hazera.es>

Hazera Genetics

Ⓢ <http://www.hazera.co.il>

Zeraim Ibérica, S.A. (Zeraim Gedera)

Ⓢ <http://www.ediho.es/zeraim/menu.htm>

Investigación y docencia

Estación Experimental “La Mayora”- Grupo de Mejora de Hortícolas

Ⓢ <http://www.eelm.csic.es/Mejora/InvestigacionMejora.htm>

Dpto. Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, UMA – Grupo de Caracterización y Síntesis de Biopolímeros Vegetales (CBV).

Ⓢ <http://www.bmbq.uma.es/cutic/CBVweb.htm>

Plant Biology, Cornell University

Ⓢ <http://www.plantbio.cornell.edu/main.php>

Estación Experimental Las Palmerillas – CAJAMAR

Ⓢ <http://laspalmerillas.cajamar.es>

Solanaceae Genomics Network

Ⓢ <http://sgn.cornell.edu/>

Plant Biomechanics Group - Institute for Biology III

Albert-Ludwigs-University – Freiburg

Ⓢ <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio3/spatz/index.html>

Dr. Mary Peet -Sustainable Practices for Vegetable Production in the South

Ⓢ <http://www.cals.ncsu.edu/sustainable/peet/profiles/c19tom.html>

K State Research and Extensi3n-Horticulture 2002 Newsletter

Ⓢ <http://www.oznet.ksu.edu/hfrr/hnewslet/2002/ksht0236.htm>

Physiological Disorders in Greenhouse Tomatoes: Physiological Disorders Related to Irrigation and Fertilization: Fruit cracking

Ⓢ http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/greenhouse_veg/topics/waterfert_pages/cracking.html

Tomato Varieties for the Northwest

Ⓢ http://www.kuow.washington.edu/weekday_garden_notes/010221.txt

Universidad de Georgia. Cultivo de Hortalizas. El cultivo del tomate

Ⓢ <http://www.uga.edu/vegetable/tomato.html>

University of Florida- Physiological, Nutritional, and Other Disorders of Tomato Fruit

Ⓢ http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_HS200

Foros y sitios Web relacionados con el cultivo del tomateAgriSupportOnline

Ⓢ http://www.agrisupportonline.com/Articles/cracking_in_tomatoes.htm

Agroinformaci3n

Ⓢ <http://www.infoagro.com>

Cultivo del tomate-Recomendaciones de abonado (Fertiberia)

Ⓢ http://www.fertiberia.com/servicios_on_line/guia_de_abonado/tomate4.html

Foro GardernWeb

Ⓢ <http://www.gardenweb.com/forums/>

Foro Dave's Gardern.com

Ⓢ <http://davesgarden.com/forums/t/39283/>

Organic Garden-Prevent Tomato Diseases

Ⓢ <http://www.organicgardening.com/feature/0,7518,s1-5-22-194,00.html>

Tomato--Cousin Ricky's Gardening Notes

Ⓢ <http://cac.uvi.edu/staff/rc3/garden/tomato.html>

ANEXO 3

Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticles

Antonio J. Matas^b, Jesús Cuartero^b, Antonio Heredia^{a,*}

^a *Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Grupo de Caracterización y Síntesis de Biopolímeros Vegetales, Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, Spain*

^b *Estación Experimental La Mayora, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), E-29750, Algarrobo-Costa, Spain*

Received 8 January 2003; received in revised form 8 May 2003; accepted 17 June 2003

Abstract

The specific heat of isolated tomato fruit cuticles and their corresponding cutins have been measured by first time for the physiological temperature in the range of 0–55 °C. Variation of specific heat of the different isolates during fruit growth have been also measured. Isolated cuticles and cutin from young tomato fruits presented a clear glass transition temperature around 23 °C. Water sorption on cutin samples shifted the glass transition temperature to 16.3 °C indicating a clear plasticization of the biopolymer. The presence of these second-order transitions in these lipophilic plant material that act as a molecular barrier between the atmosphere and the plant cell, determine the mechanical and rheological properties of this biological barrier modulating the mass transfer between the environment and the plant cell.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Plant cuticle; Plant cutin; Glass transition; Rheological properties

1. Introduction

A continuous extra-cellular layer, the cuticle, covers aerial parts of higher plants. The plant cuticle is chemically heterogeneous in nature, basically consisting of a wax fraction, soluble in organic solvents, and an insoluble cuticular matrix, the cutin, that forms the framework of the cuticle. The biopolyester cutin is mainly formed by inter-esterification of C₁₆ and C₁₈ hydroxyalkanoic acids [1]. Structural and physico-chemical studies on plant cutin, including spectroscopical and X-ray diffraction analyses, have been previously reported [2,3]. All data suggest that cutin is an amorphous cross-linked polyester.

A few years ago our research group reported various temperature-dependent changes in isolated plant cuticles and the interactions between their different components, which are predominantly waxes and cutin [4]. Briefly, we reported the occurrence of a glass transition temperature in isolated tomato fruit cutin at subzero temperatures together a weak secondary phase transition in isolated cuticles around

30 °C. These results agreed with previously published data by Schreiber and Schönherr [5] who, calculating volume expansion coefficients, found that the isolated cuticles of several species exhibited second-order phase transitions between 40 and 50 °C. More recently, we discussed the biological implications of these secondary phase transitions after determining the heat capacity of isolated cuticles and dewaxed isolated cuticles from different plants [6]. The thermal characteristics control mechanical behaviour and other properties of these complex biopolymers that act as a barrier between the plant epidermal cell and the atmosphere. In the present paper we report by first time the exact contribution of isolated and purified cutin, the main component of the plant cuticle, in the thermal behaviour of tomato fruit cuticles as well its variation during fruit growth. The effect of water sorption on these properties has been also described.

2. Experimental

2.1. Plant material

Fruit cuticular membranes were enzymatically isolated from greenhouse-grown tomato fruits, cv Cascade

* Corresponding author. Tel.: +34-952-131-940; fax: +34-952-132-000.

E-mail address: heredia@uma.es (A. Heredia).

(*Lycopersicon esculentum* Mill.) using an aqueous solution of a mixture of fungal origin cellulase (0.2% w/v) and pectinase (2% w/v). After 4–7 days the cuticles were separated from the epidermis. Cuticular waxes were removed by refluxing the dry fruit cuticles in chloroform–methanol (1:1) for 12 h. Cutin was obtained after exhaustive hydrolysis of the cuticle isolates in a solution of HCl 6 N at 110 °C during 18 h. The residual material was kept under dry conditions until further use.

2.2. Differential scanning calorimetry

The variation of heat capacity (C_p) in samples of cuticular membranes and purified cutin isolated from tomato fruits has been measured using differential scanning calorimetry with computer-aided data analysis (DSC, Shimadzu Corp., model DSC-50, Kyoto, Japan), with temperatures ranging from 0 to 60 °C, following the procedure previously described by Casado and Heredia [6]. All experiments followed the same protocol. To establish a baseline, the programme was carried out on an empty pan. The temperature range studied was from 0 to 60 °C at the scanning rate of 3 °C min⁻¹. This procedure is then repeated, with a weighed sample added to the sample holder. The heat flow into the sample is calculated using the following equation:

$$\frac{dH}{dt} = mC_p \frac{dT}{dt}$$

where dH/dt is the heat flow (J min⁻¹), m the sample mass (g), C_p the specific heat (J °C g⁻¹) and dT/dt the scan rate (°C min⁻¹).

In order to use the above equation for a specific heat calculation, the ordinate calibration and the temperature programme rate must be known. These two parameters may be eliminated from the calculations using a material with a known specific heat. In this case aluminium oxide was used for this purpose. On the other hand, temperature calibration of the calorimeter was achieved using a sample of indium.

2.3. Water sorption

Water sorption of cutin samples isolated from cuticles of tomato fruits was achieved in a small closed chamber containing an oversaturated solution of monosodium phosphate (98% relative humidity) at room temperature. The amount of water sorbed after 10 h was practically constant. This amount of water was determined by differences of weight between the corresponding samples. DSC experiments with hydrated samples were made using sealed aluminium pans.

3. Results and discussion

Fig. 1 shows the specific heat variation, C_p , of the isolated and purified cutin from young and ripe tomato fruits in a temperature range from 0 to 55 °C. Previously, the chemical characteristics of the membranes were checked by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) as described previously [2]. C_p values obtained for cutin from ripe tomato fruit cuticles showed a small increase with temperature (Fig. 1). On the other hand, C_p values measured in the case of young tomato fruit cutin samples showed a different behaviour: the variation of C_p with temperature showed a gradual increase

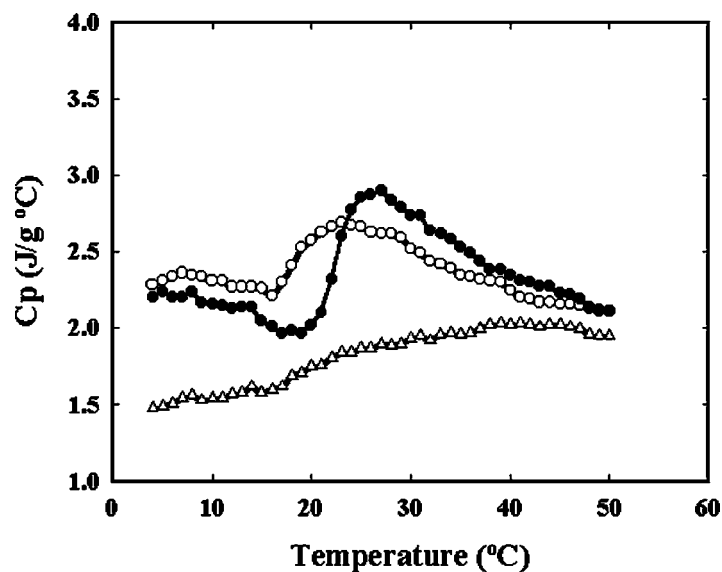


Fig. 1. The temperature dependence of the specific heat capacity (C_p) of a sample of dry purified young tomato fruit cutin (14 days after anthesis) (●), the same sample containing a 5.5% (w/w) of water sorbed (○) and a sample of mature red tomato fruit cutin (49 days after anthesis) (△). C_p was calculated based upon the data of the corresponding thermograms recorded following the methodology described in Section 2 and previously reported by Casado and Heredia [6].

Table 1
Measured glass transition temperatures (T_g) of isolated cuticles (CM) and cutins (CUT) of tomato fruits (*L. esculentum* Mill., cv Cascade) at different growth stages^a

Fruit characteristics		T_g (°C)	
Days after anthesis	Transversal diameter (cm)	CM	CUT
14	20.1 (2.2)	25.2 (1.9)	23.2 (1.1)
21	27.7 (1.8)	23.6 (3.2)	18.6 (0.1)
28	33.0 (2.8)	22.7 (1.3)	21.0 (1.7)
35	37.7 (4.7)	–	22.3 (4.1)
41	39.2 (1.3)	–	21.8 (1.1)
49	39.7 (2.3)	–	–

^a T_g (mid-point temperature) was calculated at the mid-point of the overall transition. Parenthesis indicates the standard deviation of three different samples. Transversal diameters were determined with at least 25 fruits.

until 20 °C followed by a sharp increase just above 20 °C (see again Fig. 1). This is a typical feature of the onset of a glass transition characterized in this case by the temperature, T_g , of 23.7 °C. Table 1 shows that the existence of a glass transition is a property of cutin isolated from tomato fruits through the different periods of growth with the exception of cutin isolated from ripe fruit tomato. Moreover, isolated cuticles from young and mature green tomato fruits also showed a clear glass transition temperature (Table 1).

Generally, the glass transition can be interpreted as the range of temperatures at which segment motion of macromolecules becomes thermally activated. The T_g of biopolymers increases with chain rigidity and the intensity of both inter- and intra-molecular interactions, including hindrance to internal rotation along the macromolecular chain. Thus, the glass transition represents a pseudo second-order thermodynamic transition manifested by instantaneous solid-like changes in their physical properties, e.g. viscosity, expansion coefficient and heat capacity. The transition is a kinetic and relaxational process of systems out of internal thermodynamic equilibrium, i.e., it is a non-equilibrium state that trends to relax toward a stable equilibrium [7]. The relevance and importance of glass transition temperatures in biological systems is not completely established. In the case of plant cutin, the framework of the cuticle, the existence of a glass transition temperature implies the existence of severe conformational changes in the amorphous macromolecular arrangement of the polyester. Additionally, it is known that second-order transition, in particular the glass transition temperature, marks the onset of segmental mobility for a polymer conditioning their mechanical and rheological properties [8]. The presence of a glass transition in samples of cuticle and cutin isolated from fruits in development suggests the coexistence, in a physiological interval of temperature, of two stages with different structural and viscoelastic characteristics: below the glass transition temperature the polyester would remain with restricted rotational and vibrational freedom in addition to an effective loss of translational motion. It contributes to a major preservation

of cuticular membranes in continuous growth. The cutin of these cuticles have a low degree of cross-linking and it could constitute the chemical basis of these physical and physiological characteristics, especially during the fruit growth. It is interesting to note that cuticle and cutin from ripe tomato fruits did not present any glass transition (Table 1). It could be a consequence of the chemical annealing process in the polyester due to the accumulation of other non-lipid compounds such as phenolics (mainly flavonoids in tomato fruits cuticles) and polysaccharides [1] into the molecular arrangement of the cutin polymer. In the case of the isolated cuticles, the presence of epicuticular and intracuticular waxes additionally contribute to the quenching of the glass transition at early stages of development (Table 1).

Fig. 1 also indicates an important characteristic of the cutin glass transition: water absorption of 5.5% dry weight in the sample plasticizes the cutin isolated from young fruits. The glass transition temperature, T_g , shifted to 16.3 °C when the polymer absorbed water. If we consider that isolated cuticles and cutins can sorb variable amount of water as a function of the relative humidity [9,10], the above-mentioned structural changes in the biopolymer and their mechanical and rheological properties will be consequently modified. The plasticizing effect can be described in terms of lowering of the fracture strength, elastic modulus and viscosity of the biopolymer–water mixtures with an increase in plasticizer content. Our data agree well with the recently reported by Round et al. [11] obtained by the atomic force microscope and solid-state nuclear magnetic resonance. These authors indicated that water absorbed by the tomato fruit cutin functions as a plasticizer promoting molecular flexibility that softens the polymer network and thus decreases its elastic modulus [11]. Thus, the plasticizing effect of water may be based in weakening hydrogen bonds and other intermolecular interactions due to the shielding of these mainly attractive forces by water molecules.

Finally we would like to stress the physiological importance of these findings. Because of the cuticle's barrier role, its rheology is of great interest. Factors that affect the rheological properties of the plant cuticle, such as plasticizing by water or exogenous applied chemicals dissolved or dispersed in adjuvant solutions, could modify the permeability of the biopolymer by modulating the mass transfer between the environment and the plant cell. To conclude, further research will be necessary to complete our understanding of the plant cuticle and its relationships with the environment but it is important to stress that accurate characterization of a glassy state in plant cutin is a critical factor for further rheological studies.

References

- [1] P.J. Holloway, in: D.F. Cutler, C.L. Alvin, C.E. Price (Eds.), *The Plant Cuticle, The Chemical Constitution of Plant Cutins*, Academic Press, London, 1982, p. 45.

- [2] F.J. Ramírez, P. Luque, A. Heredia, M.J. Bukovac, Fourier transform IR study of enzymatically isolated tomato fruit cuticular membranes, *Biopolymers* 32 (1992) 1425–1429.
- [3] P. Luque, S. Bruque, A. Heredia, Water permeability of isolated cuticular membranes: a structural analysis, *Arch. Biochem. Biophys.* 317 (1995) 417–422.
- [4] P. Luque, A. Heredia, The glassy state in isolated cuticular membranes: differential scanning calorimetry of tomato fruit cuticular membranes, *Plant Physiol. Biochem.* 35 (1997) 251–256.
- [5] L. Schreiber, J. Schönherr, Phase transitions and thermal expansion coefficients of plant cuticles. The effects of temperature on structure and function, *Planta* 182 (1990) 186–193.
- [6] C.G. Casado, A. Heredia, Specific heat determination of plant barrier lipophilic components: biological implications, *Biochim. Biophys. Acta* 1511 (2001) 291–296.
- [7] B. Wunderlich (Ed.), *Thermal Analysis*, Academic Press, London, 1982.
- [8] F. Rodríguez (Ed.), *Principles of Polymer Systems*, Hemisphere Publishing Corporation, New York, 1989.
- [9] P.M. Chamel, M. Escoubes, Quantitative determination of water sorption by plant cuticles, *Plant Cell Environ.* 14 (1991) 87–95.
- [10] P. Luque, R. Gavara, A. Heredia, A study of the hydration process of isolated tomato fruit cuticular membranes, *New Phytol.* 129 (1995) 283–288.
- [11] A.N. Round, B. Uan, S. Dang, R. Estephan, R.E. Stark, J.D. Batteas, The influence of water on the nanomechanical behaviour of the plant biopolyester cutin as studied by AFM and solid-state NMR, *Biophys. J.* 79 (2000) 2767–2791.

BIOMECHANICS AND ANATOMY OF *LYCOPERSICON ESCULENTUM* FRUIT PEELS AND ENZYME-TREATED SAMPLES¹

ANTONIO J. MATAS,² EDWARD D. COBB,³ JAMES A. BARTSCH,⁴
DOMINICK J. PAOLILLO, JR.,⁵ AND KARL J. NIKLAS^{5,6}

²Department of Horticulture, Estación Experimental La Mayora (CSIC), Algarrobo-Costa 29750, Malaga, Spain; ³Department of Plant Breeding, Cornell University, Ithaca, New York 14853 USA; ⁴Department of Biological and Environmental Engineering, Cornell University, Ithaca, New York 14853 USA; and ⁵Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, New York 14853 USA

We report the biomechanics and anatomy of fruit wall peels (before and after cellulase/pectinase treatment) from two *Lycopersicon esculentum* cultivars (i.e., Inbred 10 and Sweet 100 cherry tomatoes). Samples were tested before and after enzyme treatment in uniaxial tension to determine their rate of creep, plastic and instantaneous elastic strains, breaking stress (strength), and work of fracture. The fruit peels of both cultivars exhibited pronounced viscoelastic and strain-hardening behavior, but differed significantly in their rheological behavior and magnitudes of material properties, e.g., Inbred 10 peels crept less rapidly and accumulated more plastic strains (but less rapidly), were stiffer and stronger, and had a larger work of fracture than Sweet 100 peels. The cuticular membrane (CM) also differed; e.g., Sweet 100 CM strain-softened at forces that caused Inbred 10 to strain-harden. The mechanical behavior of peels and their CM correlated with anatomical differences. The Inbred 10 CM develops in subepidermal cell layers, whereas the Sweet 100 CM is poorly developed below the epidermis. Based on these and other observations, we posit that strain-hardening involves the realignment of CM fibrillar elements and that this phenomenon is less pronounced for Sweet 100 because fewer cell walls contribute to its CM compared to Inbred 10.

Key words: cellulose microfibrils; epidermis; fruit cracking; plant biomechanics; Solanaceae; strain-hardening; tomato fruit.

As traditionally defined, the cuticle is the nonliving covering produced by the epidermis of all primary vascular plant organs (Esau, 1977). Following the terminology of Wattendorf and Holloway (1980), Holloway (1982), and Jeffree (1996), it typically consists of an external layer of epicuticular waxes (ECW) overlying a comparatively thin layer of saponifiable lipids (the cuticle proper, CP) that covers an inner layer of waxes and fibrous polysaccharides embedded in a cutin matrix (the cuticular layer, CL). The CP and CL comprise the cuticular membrane (CM), which sensu stricto develops within cell walls (Esau, 1977). The structure of the CM and the extent to which it extends beneath the epidermis vary among and sometimes within species (Jeffree, 1996). For example, although it is frequently confined to the outer periclinal and anticlinal walls of the epidermis, the CM may develop in subepidermal cell walls (Fig. 1). Significant ultrastructural and chemical differences in the CM also exist across and within species (see Kolattukudy, 1980, 1996; Jeffree, 1996; Wiedemann and Neinhuis, 1998).

These differences can significantly affect the physiological performance of the CM, which reduces uncontrolled water loss, the entry of pathogenic organisms and various organic compounds, and the deleterious effects of excessive sunlight (see Esau, 1977; Schönherr, 1982; Eller, 1985; Riederer, 1990; Juniper, 1991; Riederer and Schreiber, 2001). Likewise, chem-

ical and anatomical differences may affect the mechanical function of the CM (see Petracek and Bukovac, 1995; Wiedemann and Neinhuis, 1998). Nevertheless, because the walls of the epidermis and adjoining cells are placed in tension when primary organs are turgid (Kutschera, 1989; Niklas and Paolillo, 1997, 1998), the CM can function as a tensile “skin” depending on its thickness and material properties.

In this paper, we report the tensile properties and anatomy of peels from the fruits of two *Lycopersicon esculentum* cultivars, which differ in their susceptibility to cracking, i.e., the crack-resistant Inbred 10 and the crack-prone Sweet 100. We also report the mechanical properties and anatomy of their cellulase/pectinase-isolated CM. Our objective is to determine the extent to which the CM contributes to the ability of fruit walls to resist tensile failure. Because the outer fruit wall is composed of different anatomical constituents, some of which could not be isolated and tested individually (subcuticular cell layers), the volume fractions of various peel constituents were used to determine their relative mechanical contributions.

Based on this study, we propose a simple rheological model for the tomato fruit wall that attributes strain-hardening to the passive realignment of fibrils in the CM and its associated cell walls. This model is discussed in the context of the mechanical and anatomical features of Inbred 10 and Sweet 100 fruits and their susceptibility to cracking when ripe.

MATERIALS AND METHODS

Culture and sampling—Four Inbred 10 and eight Sweet 100 cherry tomato plants were grown in pots to maturity (using commercially available seeds and Cornell potting mix) under greenhouse conditions without supplemental lighting. Each plant was irrigated and fertilized on a regular schedule. Flowers were handled daily to facilitate pollination. Each inflorescence was labeled and monitored to evaluate fruit development and ripening. Between 30 and

¹ Manuscript received 14 August 2003; revision accepted 7 October 2003.

The authors thank Prof. Hanns-Christof Spatz (Institut für Biologie III, Universität Freiburg) who as an Associate Editor of the *American Journal of Botany* supervised the review process and served as the acting Editor-in-Chief for this manuscript, and two anonymous reviewers whose comments improved this paper. Funding (to K. J. N.) from the College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, and from the Spanish Ministry of Education and Cajamar (to A. J. M.) is gratefully acknowledged.

⁶ E-mail: kjn2@cornell.edu; Phone: 607-255-8727; FAX: 607-255-5407.

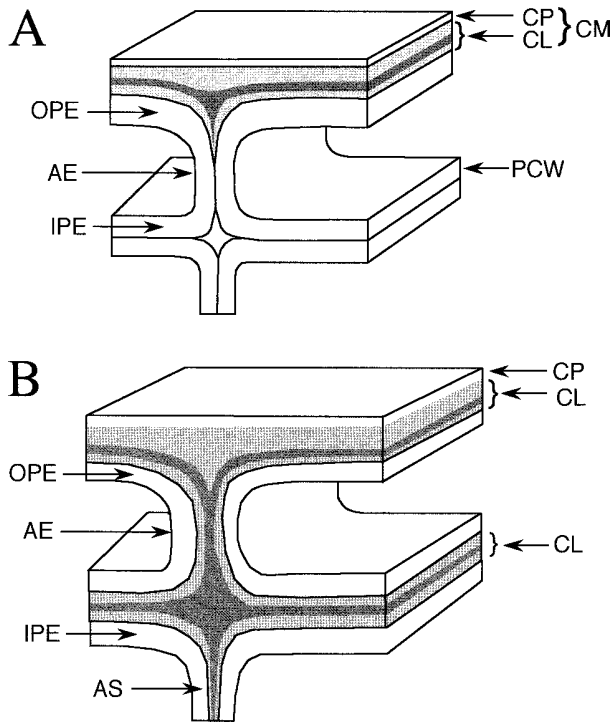


Fig. 1. Schematic representation of cuticularized epidermis and subepidermal cells. (A) The CM consisting of the cuticle proper (CP) and the cuticular layer (CL) develops the outer periclinal walls of the epidermis (OPE) and to epidermal anticlinal walls (AE). (B) The CM develops in the inner periclinal walls of the epidermis (IPE) and the anticlinal walls of subepidermal cells (AS). Darker areas in the CL represent pectin-rich regions. Epicuticular waxes not shown.

50 fruits were selected from each cultivar for anatomical and mechanical study when fully ripe in the sequence of their appearance between one and two days after reaching the “breaker” stage, i.e., the transition from green to yellow/orange color. Samples were tested mechanically within 5 h of harvesting.

Sample preparation—Rectangular paradermal segments of the outer fruit wall (aligned either longitudinally or equatorially with respect to the pedicel-style fruit axis) were removed using two parallel razor blades bonded to a metal block to assure uniform segment width (5.25 mm) and depth of cut ($230 \pm 35 \mu\text{m}$). Segment length varied due to differences in fruit size and shape. The outer fruit wall was peeled off by hand, placed in a petri dish subepidermal side downward on filter paper, and hydrated with the liquid and soft pulp of the fruit from which it was removed to reduce desiccation, maintain tissue osmolarity, and prevent direct wetting of the CM. A small portion of the outer fruit wall next to each peel was also removed and preserved in FAA for anatomical study. Microscopic measurements of peel and CM thickness were used to determine the cross sectional areas of samples tested mechanically (see Mechanical tests).

Duplicate peels were removed from each fruit for enzyme treatment following the protocol of Orgell (1955) as modified by Yamada et al. (1964; see Petracek and Bukovac, 1995). Excised samples were suspended in a fungal origin mixture of cellulase and pectinase (0.2% m/v and 2.0% m/v, respectively; Sigma) and 1 mmol/L NaN_3 (to prevent microbial growth) in sodium citrate buffer (50 mmol/L, pH 4.0). Suspensions were aspirated to aid enzyme penetration before incubation at 35°C for 7–10 d (during which suspensions were agitated by hand daily). Samples were then rinsed in citrate buffer and inspected microscopically before testing.

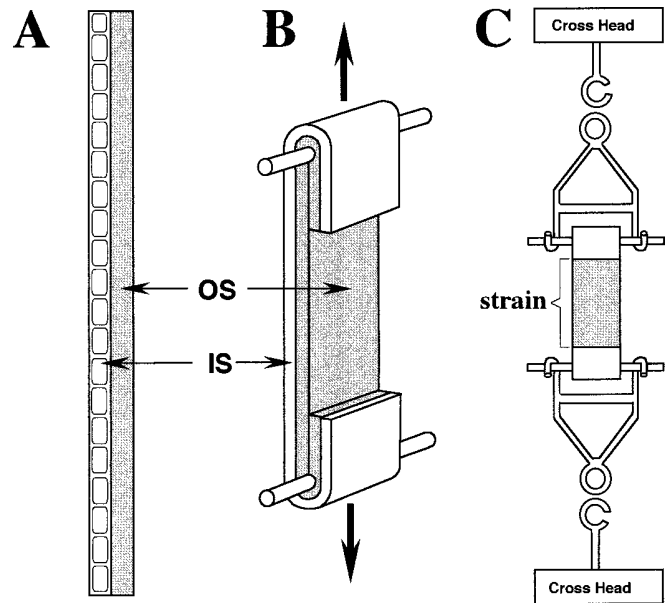


Fig. 2. Method for mounting peels for mechanical testing. (A) Side view of peel showing the orientation of the outer and inner surfaces, OS and IS, respectively. (B) Ends of the peel are folded over two metal bars so that CM makes contact at each fold. (C) Metal bars holding the peel are placed in stirrups oriented parallel to Instron cross heads. Strains are measured as the extension of the “single ply” (exposed) portion of the sample.

Mechanical tests—Peels and their enzyme-isolated CM were mounted for tests using two small metal rods suspended by stirrups between the cross heads of a model 4502 Instron testing machine (Fig. 2). A dab of fast-drying super glue was spread over the middle of each rod and the external surface of the ends of each sample, which were then folded over each of the two rods before aligning the stirrups parallel to the Instron cross-head axis. Samples were continuously hydrated during each test with the liquid extracted from their corresponding fruits by means of a micropipette applied to their subepidermal surface. A small piece of hydrated tissue paper was placed on this surface to maximize uniform hydration and further reduce desiccation during testing. Unless otherwise noted, a 2.0 mm/s strain rate (i.e., cross-head displacement rate) was used in loading-unloading and uniaxial tension tests. This high rate of extension was used to mimic rapid fruit swelling due to diurnal water influx. In this context, preliminary tests using slower strain rates (e.g., 0.2 mm/s) gave results that were qualitatively indistinguishable from those reported here.

To determine tensile strains, the total length and the length between the two folds of each sample were measured before extension with a hand-held microcaliper (see Fig. 2B–C). Subsequent measurements during tests indicated that strains were the result of the extension of the length of the “single ply” portion of samples. This extension was used to calculate strain (see Fig. 2C). To determine stresses, the applied tensile force was divided by the mean cross-sectional area of single ply sections for each cultivar. Given the large number of peels tested, it was not convenient to measure the cross-sectional area of each sample. Rather, cross sections were measured for 20 peels from each cultivar; their standard errors were deemed sufficiently small (i.e., $\pm 4.2\%$ for Inbred 10 and $\pm 3.7\%$ for Sweet 100) such that the mean cross section for each cultivar could be used to calculate stresses. The cross-sectional areas of the CM were determined by weighing cut-outs of light micrographs of CM and subepidermal tissues and calculating the percent area of each for 10 peels from each cultivar. The non-cuticularized cell wall of the CM were included as part of the CM cross section. The standard errors for CM measurements were small ($\pm 3.8\%$ for Inbred 10 and $\pm 3.0\%$ for Sweet 100; $n = 10$ each).

Three general types of mechanical tests were performed: (1) transient creep tests to determine the rate of creep and the instantaneous elastic strain upon

loading, (2) successive loading-unloading (cyclical) tests to determine the sum of plastic strains resulting from repeated applications of varying tensile forces (strain history) and the affects of repeated load applications on the Young's modulus of a sample (strain-hardening or -softening), and (3) uniaxial tension tests to determine breaking stress, breaking strain, and the work of fracture. Because no sample could be tested each way, the data from all three tests were juxtaposed to determine the mechanical properties of peels and their isolated CM. The protocols for each of the three types of tests were as follows.

Secondary (transient) rates of creep and instantaneous elastic strains were determined by sustaining samples in uniaxial tension under a constant load for ≥ 20 min during which the longitudinal extension of each sample was recorded every 2 s. The rate of creep was determined from the slope of the log-log linear regression curve of strain vs. time for the secondary phase of creep (Fig. 3A). The instantaneous elastic strain was taken as the strain recorded 4 s after the application of each tensile load. Each peel was tested repeatedly using either an ascending sequence of sustained tensile forces (from 0.10 N to 0.65 N in 0.05 N load increments) or a descending sequence (from 0.65 N to 0.10 N with 0.10 N load increments between 0.60 N and 0.10 N).

Noting that equivalent tensile forces do not generate equivalent stresses in peels and their enzyme-treated counterparts (because the CM contributes only a fraction f of the total cross sectional area of a peel), the f occupied by the CM was used to compute the tensile forces required to produce equivalent stresses in CM samples, i.e., equivalent stress forces $P_e = f P_p$, where P_e is the equivalent stress force, P_p is the force used to test a peel, and f is the CM decimal fraction. For convenience, data from creep tests (and loading-unloading tests; see below) of enzyme-treated samples are plotted as a function of P_e .

Successive loading-unloading (cyclical) tests were used to determine the effects of prior mechanical loadings on sample stiffness and the sum of plastic strains. Each peel was increasingly extended (using an increasing sequence of forces from 0.10 N to 0.65 N in 0.05 N increments) and allowed to relax before reloading (Fig. 3B–C). Equivalent stress forces P_e exerted on peels were used for loading-unloading tests of corresponding enzyme-treated samples. Stresses and strains were continuously monitored during each loading cycle every 0.5 s. Plastic deformations were recorded at the end of each loading cycle; sample stiffness (Young's modulus E) was determined from the slope of the linear portion of the stress σ vs. strain ϵ plot after compensating for the plastic strains in each previous loading cycle, i.e., $E = \Delta\sigma/\Delta\epsilon$.

Uniaxial tensile tests to failure were performed using the aforementioned protocol. The maximum stress σ_b and strain ϵ_b were recorded as the breaking stress and the breaking strain, respectively. These tests were also used to determine the work of fracture W (the energy per unit cross section required to propagate a crack) by making a small cut of specified length ℓ on one edge of a sample before testing. The Young's modulus E and the breaking stress of each sample were then used to compute W using the formula $W = \pi\ell\sigma_b^2/2E$ (see Kraemer and Chapman, 1991; Niklas, 1992a; Anderson, 1995). The dimension of ℓ was established for each cultivar from preliminary notch-sensitivity analyses (data not shown).

Anatomical protocols—Materials were washed in 50% ethanol, rehydrated, and sectioned at a thickness of 10 μm , frozen in water, and using a cryostat. The sections were observed unstained or stained in zinc-chlor-iodine for detection of cellulosic walls (Peacock, 1966). Unstained sections were also observed between crossed polarizers, with and without the insertion of a rose plate, which develops a color image that allows for the determination of the net orientation of unstained cellulose wall microfibrils (Bennett, 1950). Stained sections were also examined using a single polarizing filter beneath the specimen and a rotating stage to detect dichroism, which allows the determination of the net orientation of stained cellulose wall fibrils (Roelofsen, 1959). Photographs were obtained using an image capture program under the control of a microcomputer.

Statistical analyses—All analyses were performed using the JMP software package (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). The mean values for reported mechanical properties are based on 10 samples (one from 10 different

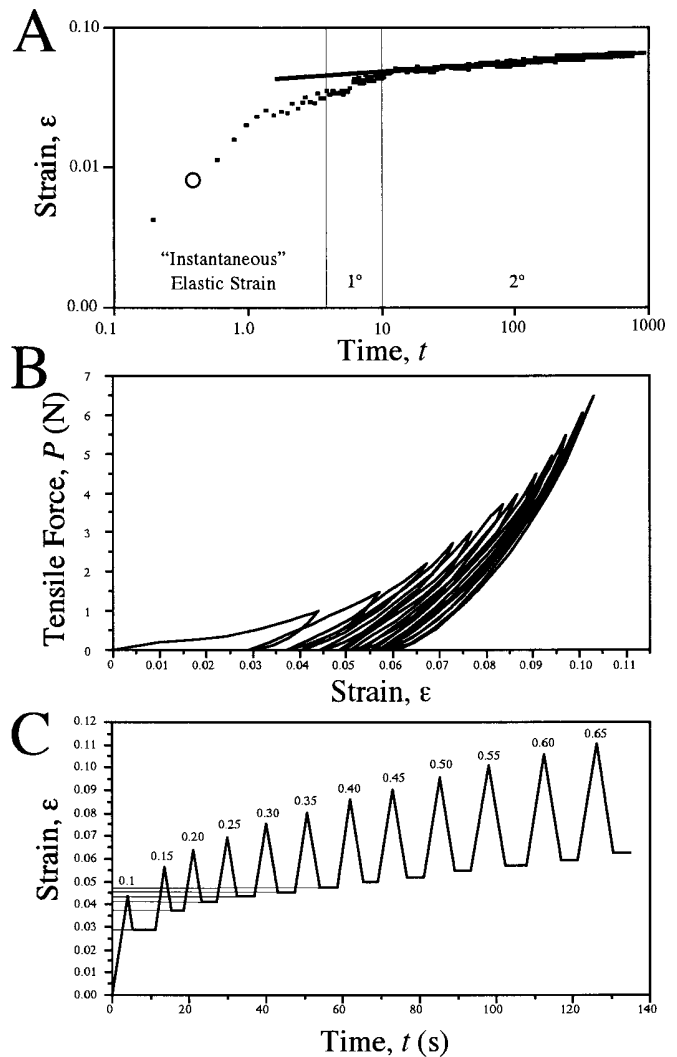


Fig. 3. Representative data from a transient creep test of a Sweet 100 peel held in tension with 0.1 N (A) and in a successive loading-unloading test (B–C). (A) Log-log plot of strain ϵ vs. time t with three phases: instantaneous elastic strain (recorded after 4 s, datum shown by open circle); primary (1°) creep (log-log nonlinear region); and secondary (2°) creep (log-log linear region). The slope of 2° creep is the rate of creep ($\Delta\epsilon/\Delta s$). (B) Tensile force vs. strain for successive cycles of extension and relaxation using tensile forces 0.1–to 0.65 N, in 0.05 N increments. (C) Strain vs. time. Flat lines between strain peaks denote time intervals between successive loading cycles; horizontal lines drawn to ordinate mark plastic strains for the first six loading cycles (0.1–0.35 N).

fruits) from a minimum of four different plants ($n = 10$ peels or CM; $n \geq 4$ plants). With the exception of the data from tensile tests to failure (see below), ordinary least squares regression and correlation analyses were performed based on 12 means (one for each tensile force used in either a creep or a loading-unloading test). Statistical differences in the slopes of regression curves were determined on the basis of the 95% confidence intervals of slopes; regression curve fits were rejected if $P > 0.0001$. All pair-wise comparisons (Tukey-Kramer HSD; $\alpha = 0.05$) among means of E , σ_b , or W were used to determine whether these properties differed between the cultivars ($n = 4$ means, one mean for the fruits produced by each of four plants).

RESULTS

All pair-wise comparisons between the mechanical properties measured for longitudinally and equatorially oriented peels

or their CM indicated that these materials are isotropic, i.e., mechanical behavior is indifferent to the direction of applied tensile forces. Therefore, for convenience, the results from longitudinally excised samples are reported.

Mechanical properties of peels—The rate of creep decreased when peels were tested with progressively larger tensile forces (Fig. 4A). With a 0.1-N force, the rate of creep for Sweet 100 peels was, on average, 40% faster than that of Inbred 10 (i.e., 0.106 s^{-1} and 0.076 s^{-1} , respectively). However, with progressively larger forces, all pair-wise comparisons of mean values ($n = 4$) indicated that the difference in the rate of creep between the peels from the two cultivars decreased and became statistically indistinguishable for forces $\geq 0.20 \text{ N}$. Likewise, when peels were initially loaded with 0.60 N, the rate of creep for the two cultivars differed significantly (based on all pair-wise comparisons of means), decreased sharply for 0.60 N, and remained approximately unchanged for progressively smaller tensile forces (Fig. 4B).

Although no statistically distinguishable difference was observed for the instantaneous elastic strain measured with progressively larger forces (Fig. 5A), the rate at which plastic strains accumulated (indicated by the slope of the sum of plastic strains vs. tensile forces) was faster for Sweet 100 compared to Inbred 10 peels. The magnitude of plastic strains was greater for Inbred 10 peels compared to Sweet 100 peels (Fig. 5B). These results were interpreted to indicate that peels are viscoelastic and strain-hardening bio-composites and that those of Inbred 10 plastically deform more than those of Sweet 100.

The results from successive loading-unloading (cyclical) tests were consistent with this interpretation. Peels strain-hardened when successively stretched, i.e., the Young's modulus E increased with progressively larger forces (Fig. 6A). However, the two cultivars differed in the magnitudes of E and the rate of strain-hardening (given by the slope of E vs. P). The E of Inbred 10 peels was significantly higher ($P < 0.0001$) than that of Sweet 100 for each of the tensile forces used and increased more rapidly than that of Sweet 100. For example, the average E measured for Inbred 10 and Sweet 100 peels extended with 0.10 N were $5.89 \pm 0.77 \text{ MPa}$ and $2.61 \pm 0.87 \text{ MPa}$, respectively, whereas the E measured after the last extension with 0.65 N was $21.8 \pm 3.2 \text{ MPa}$ and $10.8 \pm 1.5 \text{ MPa}$, respectively (Fig. 6C).

The peels of the two cultivars also differed significantly with respect to average E , σ_b , and W (Fig. 6C). The E of Inbred 10 was, on average, 20% larger than that of Sweet 100 peels (i.e., $43.5 \pm 4.83 \text{ MPa}$ and $27.1 \pm 1.93 \text{ MPa}$, respectively), whereas the σ_b of Inbred 10 peels was, on average, 15% greater than that of Sweet 100 (i.e., $1.16 \pm 0.105 \text{ MPa}$ and $0.97 \pm 0.052 \text{ MPa}$, respectively). The average W for Inbred 10 and Sweet 100 peels was $154.7 \pm 12.7 \text{ J/m}^2$ and $127.8 \pm 16.6 \text{ J/m}^2$, respectively. The average σ_b of Inbred 10 was significantly larger than that of Sweet 100 (i.e., 0.17 ± 0.02 and 0.10 ± 0.02 , respectively). Therefore, before failing in tension, Inbred 10 peels sustained, on average, significantly larger tensile forces and deformed more compared to Sweet 100. Inbred 10 peels also required, on average, almost 65% more energy per unit area to tear than Sweet 100 walls.

Mechanical properties of isolated CM—With increasing equivalent tensile forces P_e , the rate of creep decreased log-log linearly for both cultivars (Fig. 4C). The rate of creep of Inbred 10 CM was significantly slower than that of Sweet 100

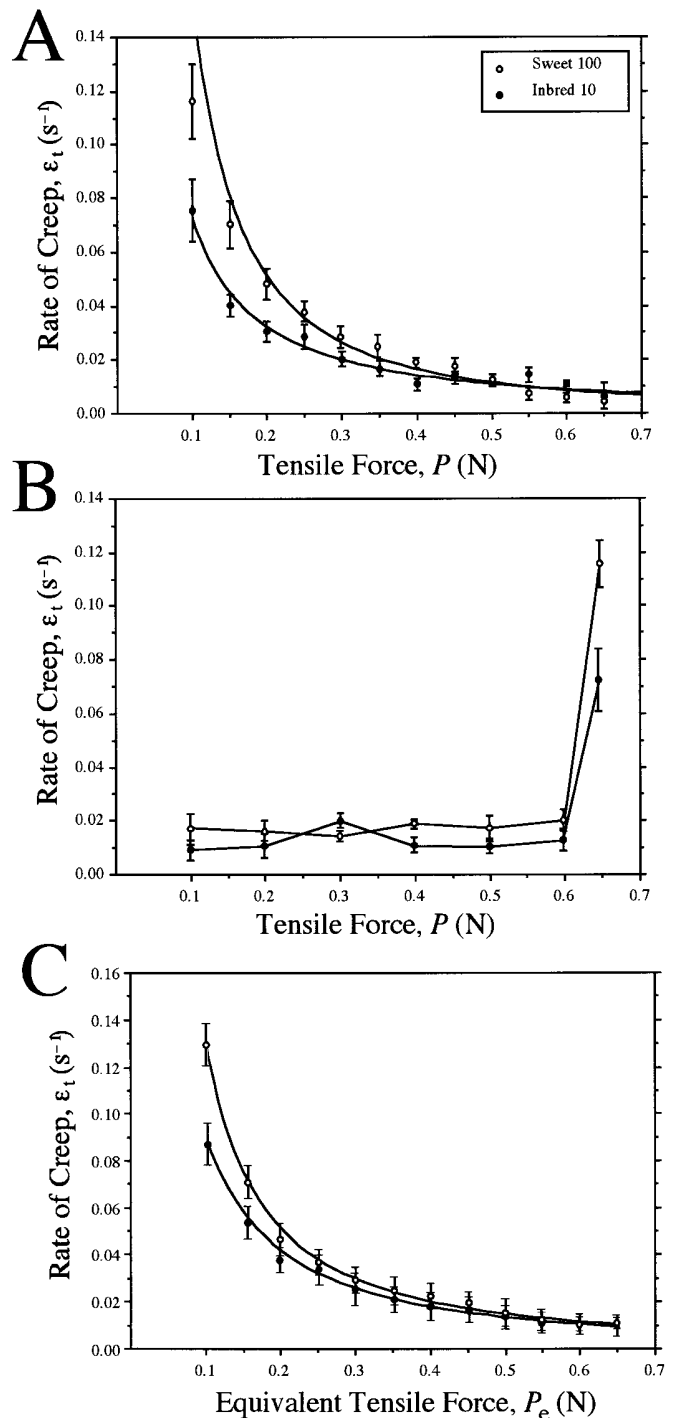


Fig. 4. Comparisons between the rates of creep ϵ_t of Sweet 100 and Inbred 10 peels and isolated cuticular membranes CM. (A) Rates of creep vs. ascending sequence of tensile forces (0.1–0.65 N, in 0.05 N increments). The rate of creep declines in a log-log linear manner as shown by the curvilinear regression curves ($r^2 = 0.947$ and 0.894 for Sweet 100 and Inbred 10, respectively). (B) Rates of creep vs. descending sequence of tensile forces (0.65–0.1 N, in 0.1 N increments between 0.1 and 0.6 N). No statistically significant differences exist for ϵ_t after a load of 0.65 N. (C) Rates of creep ϵ_t of Sweet 100 and Inbred 10 CM vs. equivalent tensile forces P_e .

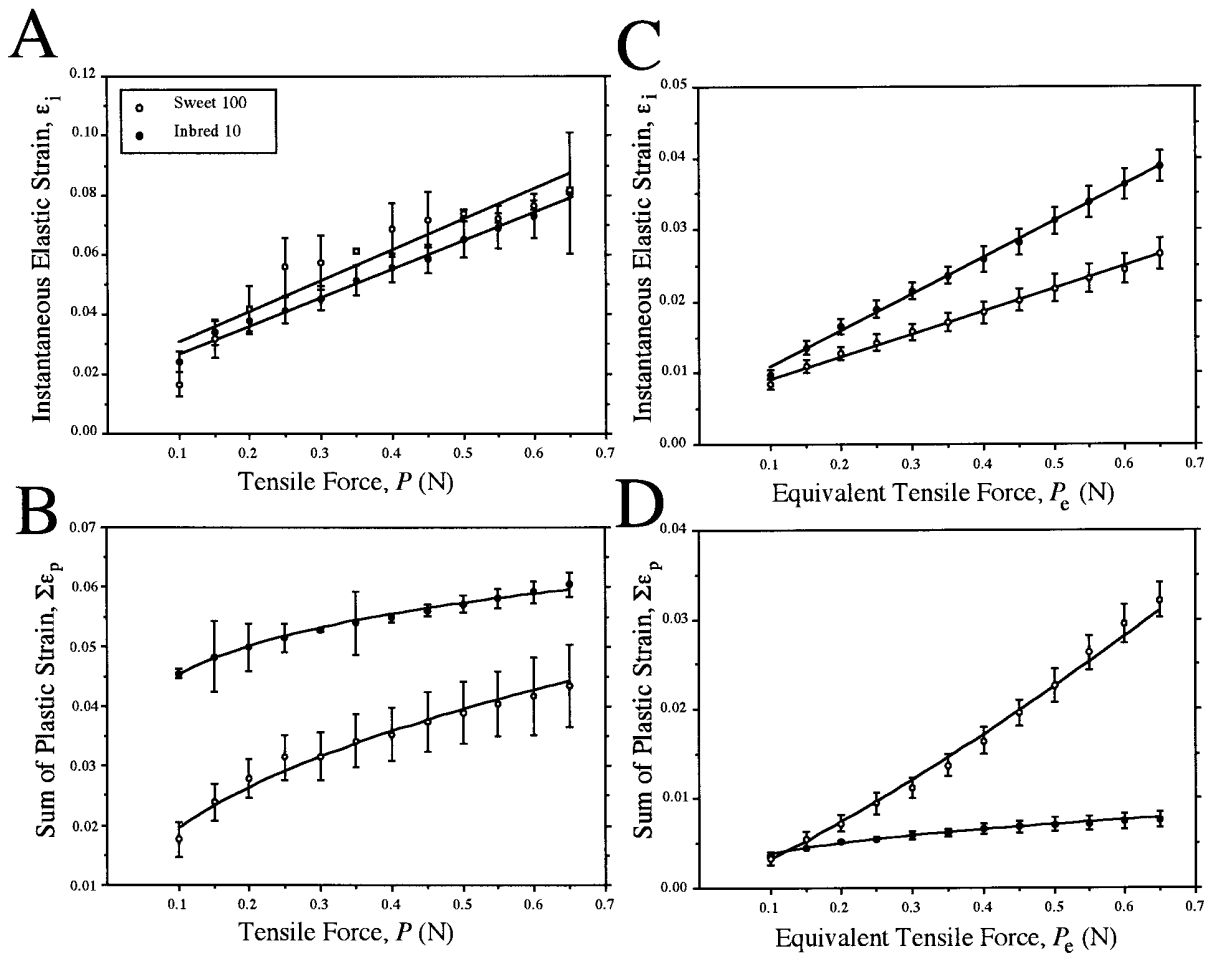


Fig. 5. Instantaneous elastic strains ϵ_i and the sum (accumulation) of plastic strains $\Sigma\epsilon_p$ for Sweet 100 and Inbred 10 peels (A–B) and isolated cuticular membranes CM (C–D) tested in creep with ascending tensile forces (0.1–0.65 N, in 0.05 N increments). (A) Instantaneous elastic strains of peels vs. tensile forces. Solid lines are linear regression curves for untransformed data; $r^2 = 0.995$ and 0.937 for Sweet 100 and Inbred 10, respectively. (B) Sum of plastic strains of peels vs. increasing tensile forces. Solid lines denote log-log regression curves; $r^2 = 0.995$ and 0.937 for Sweet 100 and Inbred 10, respectively. (C) Instantaneous elastic strains of CM vs. equivalent loads P_e . Solid lines denote linear regression curves for untransformed data; $r^2 = 0.989$ and 0.978 for Sweet 100 and Inbred 10, respectively. (D) Sum of plastic strains of CM vs. increasing equivalent loads P_e . Solid lines denote log-log regression curves; $r^2 = 0.988$ and 0.964 for Sweet 100 and Inbred 10, respectively.

CM. All pair-wise comparisons between the rates of creep observed for peels and their corresponding CM indicated no significant statistical differences. Creep tests using descending equivalent tensile forces indicated that the CM of both cultivars strain-hardened (data not shown), which was corroborated by sequential loading-unloading tests.

A strong linear relationship was observed between the magnitudes of instantaneous elastic strains and applied equivalent tensile forces; these strains increased more rapidly for Inbred 10 CM compared to Sweet 100 CM (Fig. 5C). Plastic strains accumulated less rapidly for Inbred 10 CM than for Sweet 100 (Fig. 5D), i.e., the total strains and the plastic (permanent) component of these strains observed for Sweet 100 CM exceeded those of Inbred 10.

Sequential loading-unloading tests indicated that the CM of both cultivars strain-hardens initially. The average E of Inbred 10 CM exceeded that of Sweet 100 CM for each loading-unloading cycle and the difference between the two increased with each successive cycle. Visual inspection and regression analyses of mean E vs. P_e indicated that the degree of strain-

softening was more pronounced for Sweet 100 CM compared to Inbred 10 CM (Fig. 6B).

Tensile tests to failure showed that Inbred 10 CM is stiffer and has a higher work of fracture (but an equivalent breaking stress) compared to Sweet 100 CM (Fig. 6D). Specifically, the E of Inbred 10 and Sweet 100 CM was 70.3 ± 2.95 MPa and 51.3 ± 4.83 MPa, respectively; the W of Inbred 10 and Sweet 100 CM was 95.4 ± 10.4 J/m² and 70.9 ± 7.09 J/m², respectively. Thus, the CM stiffens the fruit walls of both cultivars, subepidermal cells increase the work of fracture, and Inbred 10 CM is substantially stiffer and more energy “absorbent” than Sweet 100 CM.

Peel and CM anatomy—The peels of both Inbred 10 and Sweet 100 consisted of a cuticularized surface layer underlain by collenchyma. Figures 7 and 8 represent peels from the two cultivars at the same magnification, showing a marked difference between cultivars in peel thickness and in thickness of the cuticularized outer periclinal epidermal wall. In addition, the cuticularized anticlinal walls of the Sweet 100 epidermis

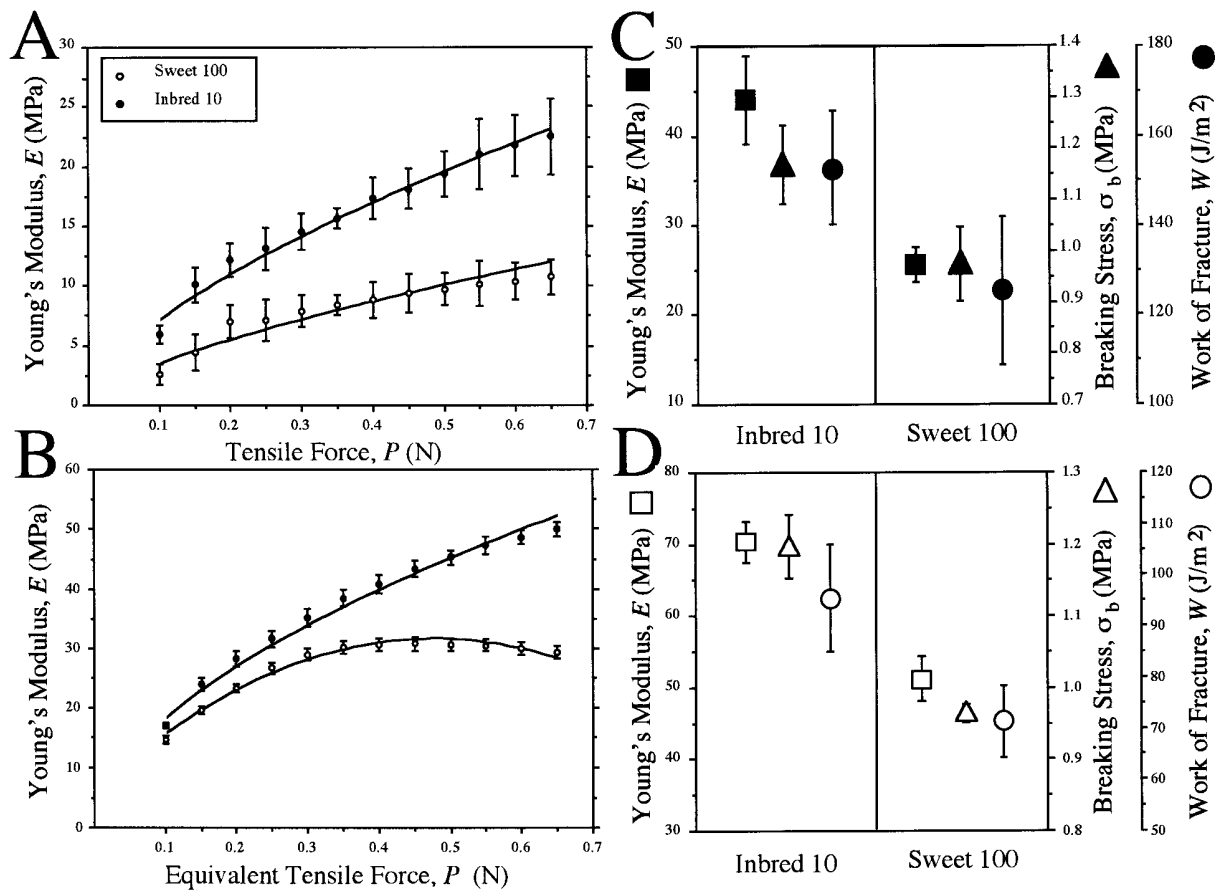


Fig. 6. Comparisons among the mechanical properties of Sweet 100 and Inbred 10 peels and cuticular membranes CM tested in successive loading-unloading cycles (A–B) and uniaxial tensile tests to determine their Young's modulus (stiffness) E , breaking stresses (strength) σ_b , and work of fracture W (C–D). (A) Young's modulus of peels vs. tensile force used in each cycle. Solid lines denote log-log linear regression curves ($r^2 = 0.929$ and 0.899 for Sweet 100 and Inbred 10, respectively). Strain-hardening indicated by the increase in E . (B) Young's modulus of CM vs. equivalent tensile forces P_e used in each cycle. Solid lines denote log-log linear regression curves ($r^2 = 0.929$ and 0.899 for Sweet 100 and Inbred 10 data, respectively). Strain-softening indicated by a decrease in E . (C) Comparisons of E , σ_b , and W of peels tested in uniaxial tension to failure. Differences in the values for E and σ_b for the two cultivars are statistically significantly different ($P < 0.001$); values for W are not statistically different. (D) Comparisons of E , σ_b , and W of CM tested in uniaxial tension to failure. Differences in the values for E and σ_b for the two cultivar CM are statistically significantly different ($P < 0.001$); values for W are not statistically different.

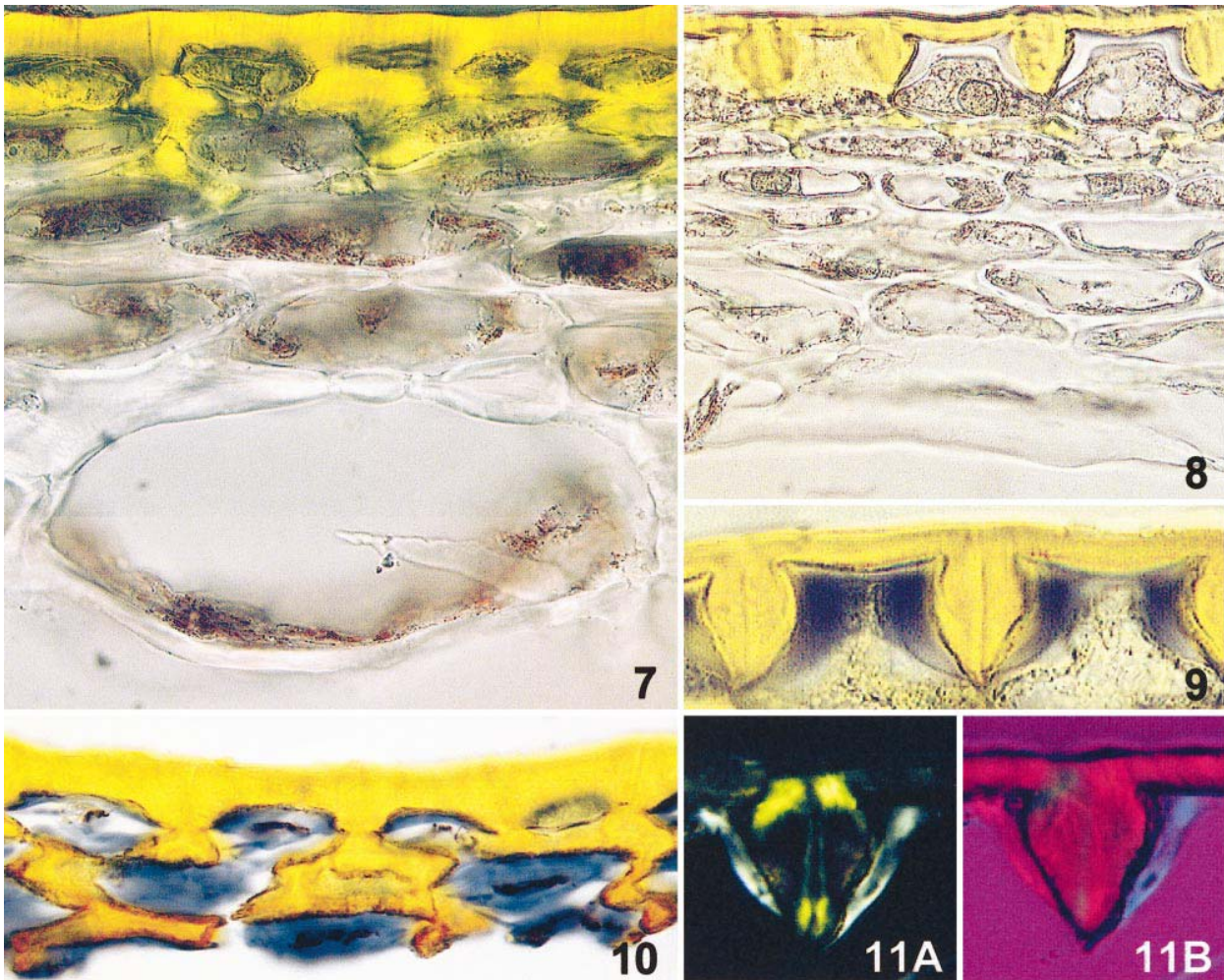
appeared in sectional view as “pegs” that were only tenuously attached to relatively thin, cuticularized inner periclinal epidermal walls (Fig. 8). In Inbred 10, the cuticle extended 2–3 cell layers into the interior (Fig. 7), thereby involving hypodermal cell walls. (A similar arrangement is illustrated by Petracek and Bukovac [1995] for tomato variety Pik Red, and for certain other tomato varieties by Chu and Thompson [1972].) The interior cuticularized periclinal walls of Inbred 10 cuticle were all thicker than the cuticularized inner periclinal epidermal walls found in Sweet 100. The cuticularized anticlinal walls of the epidermis in Inbred 10 had broad attachments to the inner cuticularized periclinal walls of the epidermis and even into the hypodermal cell layers (Fig. 7).

Cellulose walls occurred within the cuticularized region in both Inbred 10 and Sweet 100. Cellulose walls were difficult to detect in unstained sections without the use of crossed-polarizers, especially in Inbred 10 (Fig. 7). In Sweet 100, the cellulosic epidermal walls of the epidermis appeared as transparent to gray areas along the anticlinal and outer periclinal walls (Fig. 8). Cellulosic walls swelled when stained with chlor-zinc-iodine (Figs. 9, 10), persisted in the isolated cuticles

(Figs. 10, 11) from both varieties, and were more uniform in thickness in Inbred 10 than in the cuticle of Sweet 100. In the later cultivar, the thickness of cellulose walls confined by cuticularized walls was greatest along the anticlinal facets of the cells and least along the inner periclinal wall (Figs. 8, 9). Dichroism of stained walls and the use of the rose plate with unstained walls (Fig. 11A–B) indicated that the net orientation of wall microfibrils followed the contour of the walls, giving a preponderance of cellulose fibrils in the periclinal orientation in Inbred 10 (Fig. 10), but not in Sweet 100 (Figs. 9, 11). There was no qualitative difference in the staining of peels vs. isolated CM by chlor-zinc-iodine, but we did not evaluate our materials for possible quantitative differences.

DISCUSSION

Our enzyme-treated CM samples have cellulosic walls despite digestion with cellulase. From a rheological perspective these walls must contribute to the mechanical behavior of peels and isolated CM. Therefore, the presence of these walls during mechanical tests is biologically justified, especially



Figs. 7–11. Sections of peels and isolated cuticles of Inbred 10 and Sweet 100. **7.** Peel of Inbred 10. Cuticle extends 2–3 cell layers into the interior, interfacing with collenchyma. Unstained. 570 \times . **8.** Peel of Sweet 100. Cuticle extends into inner periclinal walls of the epidermis, to the interface with collenchyma. In the epidermal cell at the right, the cellulose wall is grey to transparent (white). In the second cell from the right, the protoplast is more withdrawn from the cellulose wall, making the surface of the latter easier to see. The next cell to the left shows the anticlinal wall of the cell in tangential view. Part of the protoplast appears in the image of this cell, confirming that the connections between the cuticularized anticlinal walls and the cuticularized inner periclinal epidermal walls are tenuous. Unstained. 570 \times . **9.** Peel of Sweet 100, stained with chlor-zinc-iodine. The cellulose walls are dark grey and swollen. 920 \times . **10.** Isolated cuticle from Inbred 10, stained with chlor-zinc-iodine. Cellulose walls are stained dark grey. 560 \times . **11. A, B.** Isolated cuticle from Sweet 100, unstained, as seen between crossed polarizers (A), and with the addition of a rose plate (B). The obliquely oriented cellulose walls show optical activity in A, and opposite color shifts in B, showing that the net orientation of wall fibrils follows the oblique orientations of the walls. 1150 \times .

since the cuticular membrane *CM sensu stricto* is an integral part of the cell wall infrastructure (Esau, 1977).

To the best of our knowledge, no prior study of the tomato fruit has examined the mechanical and anatomical relationships between the isolated *CM* and intact samples of the outer fruit wall, nor has any other study employed the spectrum of mechanical tests used here to quantify the mechanical behavior of these structures. Our tests indicate that the outer fruit wall and the *CM* of Inbred 10 and Sweet 100 cherry tomatoes are isotropic, viscoelastic, and, to different degrees, strain-hardening structures. The rheological behavior of the outer fruit walls of both cultivars mirrors that of their *CM*, which serves as a “tensile skin” whose mechanical properties and behavior are highly correlated with thickness.

The rheological behavior of the *CM* and the magnitudes of its mechanical properties we report are consistent with previ-

ous studies. For example, Wiedemann and Neinhuis (1998: table 1) show that the Young’s modulus and breaking stress of hydrated tomato *CM* are on the order of 60 MPa and ≥ 2 MPa, respectively. Likewise, the viscoelasticity of the *CM* has been observed previously, whereas inspection of the data graphed by Thompson (2001: e.g., fig. 3) from sequential loading-unloading cycle tests indicates that the *CM* rate of creep decreases with successive cycles, which is consistent with strain-hardening. Finally, Petracek and Bukovac (1995), who also show that the *CM* is viscoelastic, report as we do that elastic strains typically exceed plastic strains when the hydrated *CM* is modestly extended. Thus, a general mechanical phenomenology can be adduced for the tomato *CM*, although significant variation exists regarding the manifestation of this phenomenology and the absolute magnitudes of material properties (see Fig. 6).

That the mechanical properties of the CM mirror in large part those of the fruit wall peels is not surprising. The average CM work of fracture for both cultivars is comparable to that of polyesters and some epoxy resins (i.e., $W \sim 100 \text{ J/m}^2$; see Gordon, 1978). Because the peripheral cells of a hydrostatically inflated organ sustain the largest tensile stresses (see Kutschera, 1989; Niklas and Paolillo, 1997, 1998), the CM is ideally positioned to cope with mechanical stresses. However, our data indicate that the mechanical role of subepidermal tissues cannot be neglected, principally because a material's work of fracture is inversely proportional to its Young's modulus. Thus, if the fruit subepidermal cells have a lower E than the CM, they are capable of "absorbing" strain energy such that significantly more energy is required to propagate a crack through the fruit wall than through its isolated CM. The effect of the tomato fruit subepidermis is evident from comparisons of the W between the isolated CM and peels.

Unfortunately, the subepidermis E of tomato fruits can only be inferred, because we were unable to enzymatically isolate this tissue for mechanical tests. However, a Voigt-model (see Niklas, 1992b) indicates that this tissue has an E on the order of 24 MPa, which is significantly less than that of the CM of either cultivar. This model assumes that the Young's modulus of the outer fruit wall E_{OFW} equals the CM Young's modulus E_{CM} (times the decimal volume fraction f_{CM} of the CM) plus the Young's modulus of the subepidermis E_{SC} (times its decimal fraction f_{SC} contribution), i.e., $E_{\text{OFW}} = E_{\text{CM}}f_{\text{CM}} + E_{\text{SC}}f_{\text{SC}}$. For Sweet 100 peels, on average, $E_{\text{OFW}} = 27.1 \text{ MPa}$, $E_{\text{CM}} = 51.3 \text{ MPa}$, and $f_{\text{CM}} = 0.20$ such that $f_{\text{SC}} = 0.80$ for which the Voigt model gives $E_{\text{SC}} = 21.5 \text{ MPa}$. For Inbred 10, on average, $E_{\text{OFW}} = 43.5 \text{ MPa}$, $E_{\text{CM}} = 70.3 \text{ MPa}$, and $f_{\text{CM}} = 0.25$ such that $f_{\text{SC}} = 0.75$ and $E_{\text{SC}} = 25.9 \text{ MPa}$. The range of values predicted by this model (i.e., 21 MPa and 26 MPa) is numerically consistent with the E reported for collenchyma from *Apium graveolens* and *Levisticum officinale* leaves, i.e., 22 MPa (data from Esau [1936] and Ambronn [1881], respectively; see Niklas, 1992a).

The physical attachment of the CM to collenchyma suggests that strain incompatibility may occur when peels are extended beyond the CM breaking strain, i.e., the bilaminate structure of the outer fruit wall may debond. This phenomenon was observed during some of our tensile tests to failure. Microcracks developed on the CM surface and the collenchymatous subepidermis increasingly supported the applied mechanical loads. This strain incompatibility, which was far more pronounced for Sweet 100 than for Inbred 10 peels, is likely biologically important. If a fruit imbibes water and expands rapidly, its CM may experience tensile forces that exceed its capacity to extend elastically, producing micro-failures that expose underlying cells to dehydration.

This scenario may explain why the fruits of Sweet 100 crack when attached to plants, whereas those of Inbred 10 do not. Nevertheless, equally plausible (and nonexclusive) scenarios for cracking exist. For example, the CM of Sweet 100 ultimately strain-softens when extended and relaxed repeatedly (see Fig. 6C). Mechanical "fatigue" may cause a fruit wall to rupture during repeated diurnal cycles of fruit expansion-contraction. In contrast, the CM of Inbred 10 continues to strain-harden during equivalent loading-unloading cycles, thereby increasing its capacity to sustain larger tensile forces. Likewise, the large plastic strains exhibited by Sweet 100 CM may result in rapid dehydration of the underlying subepidermis due to the

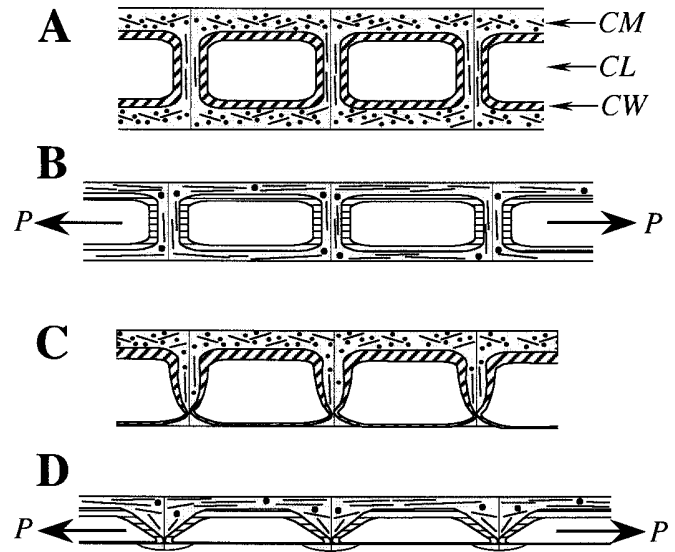


Fig. 12. Schematic of the strain-hardening behavior of the cuticular membrane CM (viewed on edge) of Inbred 10 (A–B) and Sweet 100 (C–D) in the native state (A and C) and extended by a force P (direction of application indicated by arrows in B and D). The CM has randomly oriented fibrillar components (depicted by dots and lines); the noncuticularized cell wall (CW) surrounding the cell lumen (CL) has oriented fibrillar components (uniformly spaced lines) for clarity of comparison with the CM. The application of the force P results in the alignment of fibrillar components parallel to the direction of the force application (B and D), which strain-hardens the CM and CW. Excessive extension by P will cause the CM matrix (shaded areas) to deform and fibrillar components to slip past one another, resulting in strain-softening (not shown). See Discussion for details.

thinning of the CM. If the inner fruit volume is conserved, the outer portions of the fruit will shrink and crack.

We believe that strain-hardening and strain-softening reflects the response of microfibrils in the CM to tensile forces. Prior work indicates that fibrillar components in cell walls can progressively align in the direction of applied tensile forces such that the effective Young's modulus increases (see Köhler and Spatz, 2002). However, when excessively extended, the fibrils may slip past one another (as their matrix deforms) and the Young's modulus decreases. Although speculative, this phenomenology suggests a simple rheological model for the behavior of the tomato CM—one that accounts for the relative abundance of CM fibrils as well as the anatomical differences between Inbred 10 and Sweet 100 fruit (Fig. 12).

According to this model, a tensile force causes cell wall fibrils to increasingly align parallel to the direction of the applied force, thereby increasing the CM Young's modulus (strain-hardening). When excessively extended, fibrils begin to slip past one another decreasing the CM Young's modulus (strain-softening). The magnitude of the "critical" force will depend on the original net orientation and abundance of CM fibrils, which will correlate to some degree with the thickness of the CM. Because the CM of Sweet 100 develops in subepidermal cell walls to a lesser degree than that of Inbred 10, this model predicts that the CM of Sweet 100 will experience strain-softening at smaller tensile forces than the CM of Inbred 10.

Importantly, the epidermis of a hydrostatically inflated spherical fruit wall experiences equivalent orthogonal biaxial tensile forces (see Henry and Allen, 1974; Haman and Bur-

gess, 1986) such that strain-hardening is unlikely to occur if fibrils are randomly oriented. However, basic engineering theory indicates that any departure from a spherical geometry or any bias in the net orientation of CM fibrillar components will produce some degree of strain-hardening. For example, an internally pressurized prolate geometry will experience circumferential tensile stresses that are larger than their corresponding longitudinal stresses (see Gordon, 1978; Niklas, 1992a). Even if the fibrils in its outer "tensile skin" are randomly oriented, such a geometry is predicted to rupture longitudinally when excessively pressurized from within. In this regard, Sweet 100 fruits are prolate and they invariably crack longitudinally.

In summary, our data indicate that a strong positive relationship exists between the anatomy of the tomato outer fruit wall (particularly CM thickness) and its mechanical properties (e.g., stiffness and work of fracture). But it is premature to suggest that any particular suite of anatomical features provides a reliably consistent qualitative diagnostic for the rheology of the tomato fruit wall because the fruit wall and its CM have a complex cellular and subcellular infrastructure (and chemistry) that cannot be canonically characterized across all species or even across the cultivars of a single species (see Hankinson and Rao, 1979; Jeffree, 1996; Kolattukudy, 1996; Wiedemann and Neinhuis, 1998). It is nevertheless clear that the mechanical behavior of the CM is intimately linked to anatomy and that the CM is a biologically important component of the primary plant body for mechanical as well as physiological reasons.

LITERATURE CITED

- AMBRONN, H. 1881. Über die Entwicklungsgeschichte und die mechanischen Gewebesysteme. *Jahrbuch der Wissenschaften Botanische* 12: 473–541.
- ANDERSON, T. L. 1995. Fracture mechanics—fundamentals and applications. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- BENNETT, H. S. 1950. The microscopical investigation of biological materials with polarized light. In M. R. McClung Jones [ed.], *McClung's handbook of microscopical technique*, 591–677. Paul B. Hoeber, New York, New York, USA.
- CHU, M. C.-Y., AND A. E. THOMPSON. 1972. Comparative anatomy of pericarps of four tomato mutants. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 97: 478–481.
- ELLER, B. M. 1985. Epidermis und spektrale Eigenschaften pflanzlicher Oberflächen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 98: 465–475.
- ESAU, K. 1936. Ontogeny and structure of collenchyma and of vascular tissues in celery petioles. *Hilgardia* 10: 431–476.
- ESAU, K. 1977. Anatomy of seed plants, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, New York, USA.
- GORDON, J. E. 1978. Structures. Plenum, New York, New York, USA.
- HAMAN, D. Z., AND G. J. BURGESS. 1986. Theoretical development for measuring the elastic properties of spherical cuticular membranes. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 29: 1470–1476.
- HANKINSON, B., AND V. N. M. RAO. 1979. Histological and physical behavior of tomato skins susceptible to cracking. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 104: 577–581.
- HENRY, Z. A., AND W. H. ALLEN. 1974. Use of hydrostatic pressure in development of stress strain information for tomato skins. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 99: 787–792.
- HOLLOWAY, P. J. 1982. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In D. F. Cutler, K. L. Alvin, and C. E. Price [eds.], *The plant cuticle*, 1–32. Academic Press, London, UK.
- JEFFREE, C. E. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. In G. Kerstiens [ed.], *Plant cuticles: an integrated functional approach*, 33–82. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- JUNIPER, B. E. 1991. The leaf from the inside and the outside: a microbe's perspective. In J. H. Andrews and S. S. Hirano [eds.], *Microbial ecology of leaves*, 22–42. Springer Verlag, New York, New York, USA.
- KÖHLER, L., AND H.-C. SPATZ. 2002. Micromechanics of plant tissues beyond the linear-elastic range. *Planta* 215: 33–40.
- KOLATTUKUDY, P. E. 1980. Cutin, suberin, and waxes. In P. K. Stumpf [ed.], *Lipids: structure and function*, 571–646. Academic Press, New York, New York, USA.
- KOLATTUKUDY, P. E. 1996. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In G. Kerstiens [ed.], *Plant cuticles: an integrated functional approach*, 83–108. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- KRAEMER, G. P., AND D. J. CHAPMAN. 1991. Biomechanics and alginic acid composition during hydrodynamic adaptation by *Egregia menziesii* (Phaeophyta) juveniles. *Journal of Phycology* 27: 47–53.
- KUTSCHERA, U. 1989. Tissue stresses in growing plant organs. *Physiologia Plantarum* 77: 157–163.
- NIKLAS, K. J. 1992a. Plant biomechanics. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- NIKLAS, K. J. 1992b. Voigt and Reuss models for predicting changes in Young's modulus of dehydrating plant organs. *Annals of Botany* 70: 347–355.
- NIKLAS, K. J., AND D. J. PAOLILLO, JR. 1997. The role of the epidermis as a stiffening agent in *Tulipa* (Liliaceae) stems. *American Journal of Botany* 84: 735–744.
- NIKLAS, K. J., AND D. J. PAOLILLO, JR. 1998. Preferential states of longitudinal tension in the outer tissues of *Taraxacum officinale* (Asteraceae) peduncles. *American Journal of Botany* 85: 1068–1081.
- ORGELL, W. H. 1955. The isolation of plant cuticle with pectic enzymes. *Plant Physiology* 30: 78–80.
- PEACOCK, H. A. 1966. Elementary microtechnique. E. Arnold, London, UK.
- PETRAČEK, P. D., AND M. J. BUKOVAC. 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiology* 109: 675–679.
- RIEDERER, M. 1990. Estimating partitioning and transport of organic chemicals in the foliage/atmosphere system: discussion of a fugacity-based model. *Environmental Science and Technology* 24: 829–837.
- RIEDERER, M., AND L. SCHREIBER. 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* 52: 2023–2032.
- ROELOFSEN, P. A. 1959. The plant cell wall. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Germany.
- THOMPSON, D. S. 2001. Extensometric determination of the rheological properties of the epidermis of growing tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 52: 1291–1301.
- SCHÖNHERR, J. 1982. Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin, suberin and associated lipids. In O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Ziegler [eds.], *Encyclopedia of plant physiology*, 153–179. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- SEKSE, L. 1995. Fruit cracking in sweet cherries (*Prunus avium* L.). Some physiological aspects—a mini review. *Scientia Horticulture* 63: 135–141.
- WATTENDORF, J., AND P. J. HOLLOWAY. 1980. Studies on the ultrastructure and histochemistry of plant cuticles: the cuticular membrane of *Agave americana* L. *in situ*. *Annals of Botany* 46: 13–28.
- WIEDEMANN, P., AND C. NEINHUIS. 1998. Biomechanics of isolated plant cuticles. *Botanica Acta* 111: 28–34.
- YAMADA, Y., S. H. WITTEWIT, AND M. J. BUKOVAC. 1964. Penetration of ions through isolated cuticles. *Plant Physiology* 39: 28–32.



Molecular characterization of the plant biopolyester cutin by AFM and spectroscopic techniques

José J. Benítez,^a Antonio J. Matas,^b and Antonio Heredia^{b,*}

^a Instituto de Ciencia de Materiales, CSIC-Universidad de Sevilla, E-41092 Sevilla, Spain

^b Grupo de Caracterización y Síntesis de Biopolímeros Vegetales, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, Spain

Received 18 December 2003, and in revised form 11 February 2004

Available online 13 April 2004

Abstract

Atomic force microscopy, FT-IR spectroscopy, and solid-state nuclear magnetic resonance have been used to improve our current knowledge on the molecular characteristics of the biopolyester cutin, the main component of the plant cuticle. After comparison of samples of cutin isolated from young and mature tomato fruit cuticles has been possible to establish different degrees of cross-linking in the biopolymer and that the polymer is mainly formed after esterification of secondary hydroxyl groups of the monomers that form this type of cutin. Atomic force microscopy gave useful structural information on the molecular topography of the outer surface of the isolated samples. The texture of these samples is a consequence of the cross-linking degree or chemical status of the polymer. Thus, the more dense and cross-linked cutin from ripe or mature tomato fruit is characterized by a flatter and more globular texture in addition to the development of elongated and orientated superstructures.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Biopolymer; Cutin; Molecular architecture; AFM topography

1. Introduction

Aerial parts of higher plants are covered by a continuous extra-cellular layer, the cuticle. The main function ascribed to the cuticle is to minimize water loss. Besides, it limits the loss of substances from plant internal tissues and also protects the plant against physical, chemical, and biological impacts (Holloway, 1982).

Cuticles of higher plants are chemically heterogeneous in nature, basically consisting of a wax fraction, soluble in common organic solvents, and an insoluble cuticular matrix, that forms the framework of the cuticle. This cuticular matrix is mainly formed by the biopolymer cutin, a high-molecular weight polyester composed of various inter-esterified C₁₆ and C₁₈ hydroxyalkanoic acids (Walton, 1990). The ester bonds in cutin can be cleaved by alkaline hydrolysis to yield the corresponding hydroxy fatty acids. Further composi-

tional analyses have established a few classes of monomers which are present in cutin. Depolymerization products of many plant cutins are composed almost exclusively of derivatives of the C₁₆ family of monomer acids, in which 10,16- and/or 9,16-dihydroxyhexadecanoic acids are the major compounds (Kolattukudy, 1996; Walton, 1990). Relatively few cutins contain significant amounts of C₁₈ monomers (Kolattukudy, 1996).

The understanding of the types of covalent linkages in plant cutins has been based on the chemical reactivity of the biopolymer. On the other hand, the intermolecular cross-linking between cutin monomers has been derived from analysis of the abundance of free primary and free secondary mid-chain hydroxyl functional groups, as well as unesterified carboxyl moieties. Studies involving these approaches demonstrated that, in most cases, about half the mid-chain hydroxyl groups in the biopolymer are involved in ester linkages (Deas and Holloway, 1977). Structural studies on cutin have been previously reported by our research group being mainly focused on Fourier-transform infrared (FT-IR)

* Corresponding author. Fax: +34-95-213-2000.

E-mail address: heredia@uma.es (A. Heredia).

spectroscopical analysis (Luque et al., 1995; Ramírez et al., 1992) and X-ray diffraction analysis (Luque et al., 1995). They suggested an amorphous structure with basal spacing around 0.45 nm as repeated unit in the macromolecular structure of cutin. Additionally, solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) studies of the polyester provided structural information of the intact biopolymer, in which distinct polymer domains have been identified (Fang et al., 2001; Zlotnik-Mazori and Stark, 1988). On the other hand, such studies have led to the identification and quantification of the principal chemical functionalities of the cutin polymer. Structural and motional characteristics of the major carbon types were also obtained. A more detailed explanation of the physical characteristics and properties of plant cutin can be found in a recent review (Heredia, 2003).

The rheology of the plant cuticle and cutin is of particular interest. It is known that the diffusion and sorption across polymers is influenced by the mechanical properties of the polymer itself. Some factors that affect these properties are the polymer density, the presence of fillers and plasticizers in the polymer matrix, and the humidity and temperature. There is only one previous study concerning the nanomechanical behavior of the plant cutin by atomic force microscopy (Round et al., 2000). This technique was used to evaluate the surface elastic modulus of tomato fruit cutin in response to changes in humidity.

In the present work, a study on the molecular architecture of plant cutin in relation to its chemical composition has been made. Tomato fruit cutin isolated from fruits at different growth stages have been used to investigate the influence of the cross-linking degree and the subsequent macromolecular arrangement in the cutin polyester. For this purpose, atomic force microscopy (AFM), in combination with IR and NMR spectroscopies, has been used. These data draw a more complete picture of the cutin ultrastructure and also gives a molecular basis to understand the physical properties of this unique biopolymer.

2. Materials and methods

2.1. Cuticle and cutin isolation and analysis

Cuticles were prepared from astomatous tomato fruits of greenhouse-grown *Lycopersicon esculentum* Mill. Fruits were collected at two different growth stages: 14 days after anthesis (young) and 65 days after anthesis (ripe). Discs, 1.5 cm in diameter, were punched from the fruits and the cuticles isolated using an aqueous mixture of 2% (w/v) pectinase and 0.2% (w/v) cellulase buffered at pH 3.6. After 5 days of incubation at 30 °C the cuticles were recovered, extensively washed in deionized water, air-dried, and stored for further use.

Cuticular waxes were removed by refluxing the isolated cuticles in chloroform:methanol (1:1) for 8 h.

Cutin samples were obtained after hydrolysis of de-waxed cuticles in a 6 M HCl solution for 12 h at 105 °C to remove polar hydrolyzable components and then depolymerized in a 3% (w/v) sodium methoxide solution for 18 h at 100 °C (Luque et al., 1995). This series of exhaustive treatments to remove waxes and hydrolyzable compounds present in the isolated cuticles does not alter the chemical structure of the biopolymer (Walton, 1990). After extraction of the monomers of tomato fruit cutin in an organic phase (diethyl ether), the solvent was evaporated to quantify and identify the cutin monomers by gas chromatography–mass spectrometry analysis after silylation with *N*-*O*-bistrimethylsilylacetylacetamide, using a Hewlett–Packard 5890 GC-MS combination with a cross-linked methyl silicane capillary column.

2.2. FT-IR spectroscopy

KBr pellets were prepared using about 1.5 mg of cutin sample. Infrared spectra were recorded in a Perkin–Elmer 1760 Fourier-transform infrared spectrometer.

2.3. Solid-state ^{13}C NMR spectroscopy

^{13}C cross polarization/magic angle spinning nuclear magnetic resonance (CP/MAS NMR) spectra were recorded on a Bruker Chemagnetic 300 MHz NMR operating at 75.5 MHz using an air-bearing probe. Experiments were conducted on about 30–40 mg samples of powdered tomato fruit cutin obtained using liquid nitrogen in a 5 mm MAS probe at room temperature.

2.4. Atomic force microscopy

AFM images were obtained with a Topometrix TMX2000 microscope operating either in contact constant force mode or in non-contact mode with both amplitude and phase detection. A large scale scanner (maximum *X*–*Y* range of 130 μm \times 130 μm and 13 μm in *Z*) was used to analyze the overall texture and the homogeneity of the surface of cutin samples. When higher lateral and vertical resolution was needed another scanner with maximum *X*–*Y*–*Z* ranges of 2.3 μm \times 2.3 μm and 0.8 μm was used. In any case, the same Si_3N_4 lever (contact NanoProbe, Digital Instruments, Santa Clara CA) with 0.58 N m^{-1} nominal constant force was employed. In non-contact mode, a stiff Si_3N_4 lever (NT-MDT Ultrasharp NSCS12) oscillated at its resonance frequency (approx. 149 kHz) is used.

Calibration in the *X*–*Y*–*Z* directions was done with commercial calibration gratings provided by formerly NT-MDT, Moscow.

Samples were attached to a glass slide using a double side adhesive tape and analyzed at room atmosphere, typically 20–25 °C and 45–50% relative humidity.

3. Results and discussion

3.1. Chemical and spectroscopical characterization of isolated tomato fruit cutins

De-waxed cuticles from young and ripe tomato fruits after exhaustive acid hydrolysis yielded the polyester cutin; this fraction represented, in both cases, the 81% of the initial weight of the isolated cuticle. Moreover, for the two types of fruit cutins the major monomer found by GC–MS analysis was the 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid. The amount of this fatty acid, in addition to the positional isomers, was 83.6 and 81.9% of the total weight of monomeric acids of young and ripe tomato cutins, respectively. This result agrees with others reported using different tomato varieties (Baker et al., 1982; Luque et al., 1995).

FT-IR spectroscopy can characterize in situ the functional chemical groups of isolated cuticles and their interactions with exogenous chemicals at the cuticular level (Luque et al., 1995; Ramírez et al., 1992). Fig. 1 shows the FT-IR spectra of young and ripe isolated tomato fruit cutins. The two spectra are very similar except for the presence of some absorptions around 1630, 1530, and 900–800 cm^{-1} for ripe sample. Such absorptions were not present in the infrared spectrum of the young tomato fruit isolate. Such absorptions are mainly assigned to the functional groups or structural characteristics of phenolics and flavonoids present in the cuticle and cutin of ripe tomato fruits. Thus, absorption

around 1630 and 1550 cm^{-1} are assigned to the stretching of C=C bonds and the stretching of benzenoid rings, respectively. In addition, weak absorptions recorded between 900 and 800 cm^{-1} indicate the presence of di and tri substitutions in the aromatic rings. More details about these assignments can be found in some references (Luque et al., 1995; Ramírez et al., 1992; Villena et al., 2000). Nevertheless, in this case, it is interesting to evaluate the ratio between the two main infrared features that can be found in cutin material: the two strong bands located near 2900 cm^{-1} assigned to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of the methylene group, the most repeated structural unit in the cutin biopolyester, and the strong absorption band at 1730 cm^{-1} , assigned to the C–O stretching vibration of the carbonyl group of the ester bond, i.e., the link between the different hydroxy fatty acids to form the cutin cross-linking. The ratio was lower (0.72) for cutin isolated from ripe tomato fruits than for the cutin obtained from young fruits (0.92). This is an indication of a higher cross-linking in the cutin of ripe tomato fruit cuticles. The weight per area unit measured for the two cutin isolates confirms this fact: 994 and 1528 $\mu\text{g cm}^{-2}$, for young and ripe cutin, respectively.

Solid-state NMR of the isolated cutins can provide useful structural information on the type of links that takes place in this solid matrix. Fig. 2 shows the ^{13}C NMR spectra of the two cutin samples investigated here. Main resonances assignments were as follows (Zlotnik-Mazori and Stark, 1988): $(\text{CH}_2)_n$, 29 ppm; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOR}$, 64 ppm; CHOCOR and CHOH , 71.6 ppm; and CHO-COR , 173 ppm. The two NMR spectra were, again, very similar with the exception of the presence of additional resonances between 115 and 130 ppm in the NMR spectrum of ripe tomato cutin, a clear indication of the

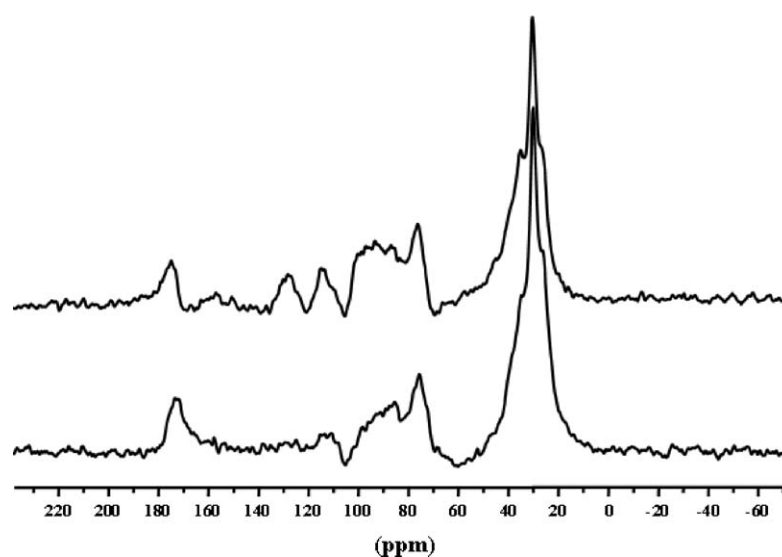


Fig. 1. ^{13}C CP/MAS NMR spectrum of the isolated ripe tomato fruit cutin (upper spectrum) and young tomato fruit cutin (lower spectrum). The main chemical-shift assignments are as follows: $(\text{CH}_2)_n$, 29 ppm; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOR}$, 64 ppm; CHOCOR and CHOH , 71.6 ppm; and carbonyl, 173 ppm. For more details, see text.

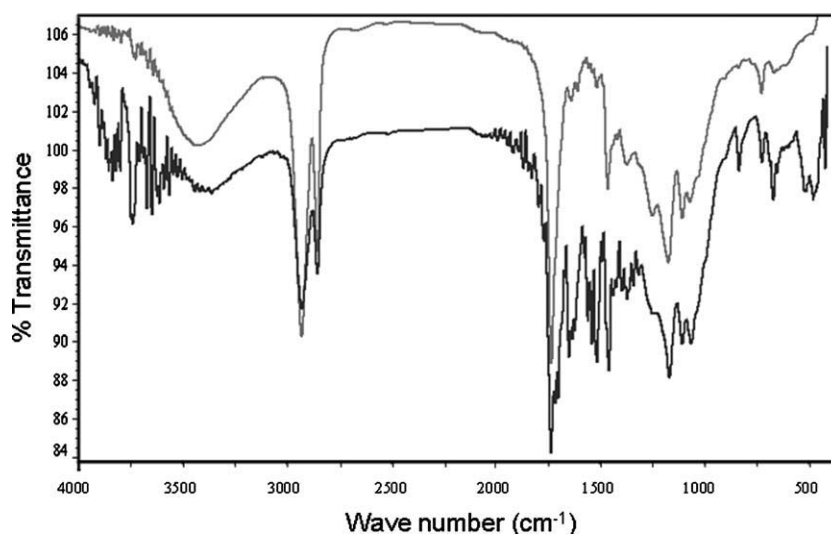


Fig. 2. Fourier-transform IR spectra for isolated ripe tomato fruit cutin (lower spectrum) and young tomato fruit cutin (upper spectrum).

existence of aromatic and unsaturated compounds. Another interesting molecular characteristic can be reached from ^{13}C NMR spectra: the above mentioned resonances indicate that the polyester of these isolates was mainly formed by esterification of secondary hydroxyl functional groups (173 ppm). However, this fact does not exclude the presence of ester links made from primary hydroxyl groups (chemical shift at 168 ppm; Zlotnik-Mazori and Stark, 1988), also present in the cutin network.

An indirect measure of the chemical mobility of the polymer chains that form the cutin could be given by the determination of the spin relaxation time, $T_{1\rho}$, of the $^{13}\text{CH}_2$ of cutin samples. This information directly regards the dynamics and structure of the biopolyester. The estimated $T_{1\rho}$ for young and ripe cutin were 118 and 58 μs , respectively. These values suggest a moderately rigid environment, more restricted dynamically in the case of ripe cutin, than the same motional segments in the cutin isolated from young fruits.

3.2. Microscopic characterization of isolated fruit cutins

The surface structure of tomato fruits cuticles and cutins is usually checked by scanning electron microscopy (SEM). Nevertheless, fine resolution cannot be achieved due to the gold layer (usually between 20 and 50 nm) that must be deposited on the sample surface. However, it is known that AFM has been used with success to image the surface morphology and elucidate structure details of amorphous and crystalline polymers and phase separated macromolecular systems.

Some aspects should be considered when studying tomato cutin samples by AFM. Among the operating modes of an AFM, the so-called "contact mode" is usually preferred because of its higher resolution. Besides, working in contact allows the mechanical and tribological study of materials, a quite important issue in

cutins isolated from commercial fruits. However, when analyzing biological specimen, the relatively high forces applied in contact mode may cause some damage. However, no such damage has been reported in the literature (Round et al., 2000) when studying the mechanical characteristics of tomato fruit cutin in contact mode. Nevertheless, we have performed some wear tests by scanning small areas of cutin at high speed and under low and moderate loads and no erosion has been observed. Another option to prevent damage is to work in contact inside a liquid (typically water). This way, capillary forces are almost eliminated and scanning can be made under very low applied pressures. However, we have results showing a dramatic modification of mechanical properties of cutin when exposed to water. We suspect that such modification may be accompanied by an alteration of macromolecular arrangement of cutin structure. For this reason, working in liquid has been discarded in this work.

Another aspect to consider is the possibility of deforming the surface structure of cutin under contact. To address this point, we have analyzed the same cutin sample (and roughly the same spot) using both contact and non-contact modes. Results are shown in Fig. 3 and no texture modification can be appreciated. Moreover, the resolution of contact mode is significantly higher.

Cutin samples prior to de-waxing have also been analyzed and results are displayed in Fig. 4. Large range images are dominated by cross-linked rows approximately 0.5 μm wide. Some big agglomerates are also visible. A closer look reveals a background containing small patches of crystalline epicuticular waxes that prevents the direct observation of the cutin framework. Consequently, cutin samples had to be de-waxed.

AFM analysis of tomato fruit de-waxed cutin and free of hydrolyzable components revealed a well-defined surface texture that was not resolved by SEM (Fig. 5). Besides, AFM provides topographic data in the X , Y ,

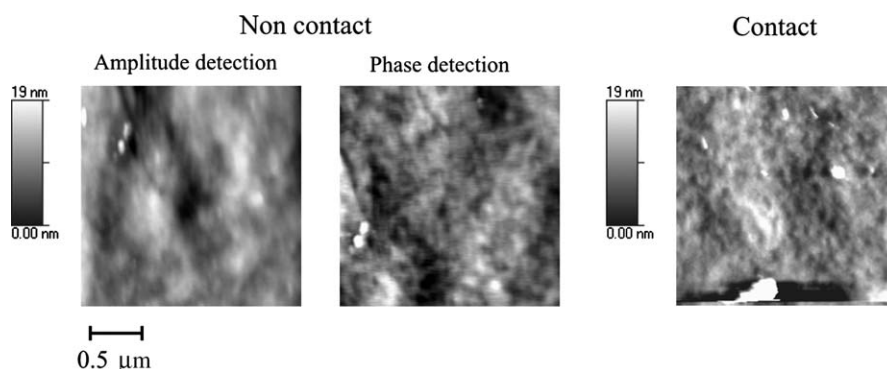


Fig. 3. Non-contact (both amplitude and phase detection) and contact high resolution AFM images obtained from the same ripe tomato cutin specimen. No damage or modification of surface but a better resolution is obtained if working in contact mode.

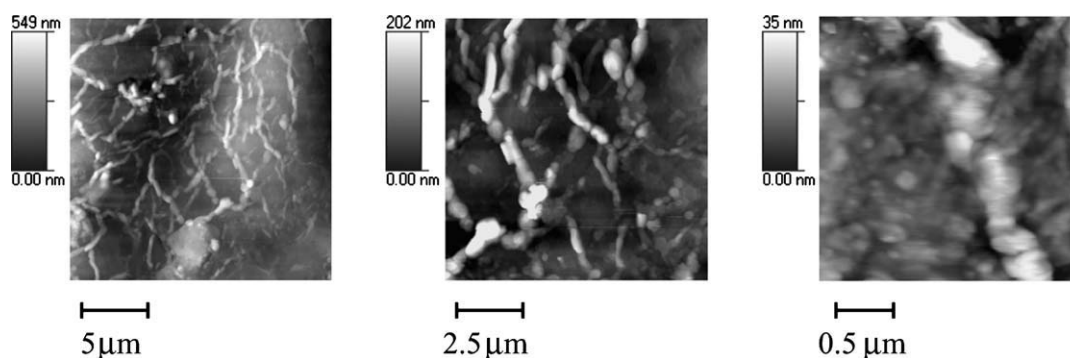


Fig. 4. Wide range AFM images showing the structure of waxes in tomato cutin prior to de-waxing. Characteristic interlaced rows about 0.5 μm thick as well as an amorphous background are observed.

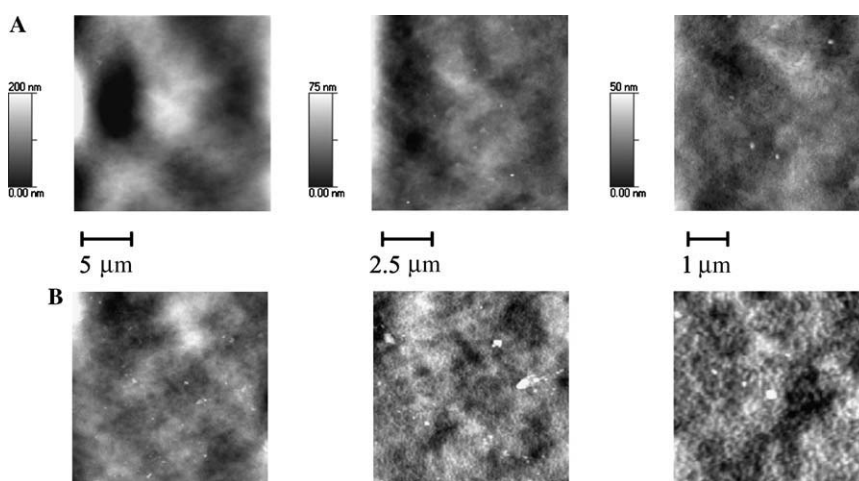


Fig. 5. AFM topographic images (contact mode) showing the morphology of the outer surface of isolated young (A) and ripe (B) tomato fruit cutin at different resolutions.

and Z directions (SEM only in X and Y). We would like to remark here some additional advantages of AFM compared with SEM in the analysis of biological tissues. First, no metallization of surface is necessary for AFM. In this sense, AFM is a non-destructive technique which is of great interest when unique, low yield or hard to prepare samples have to be studied. Thus, AFM provides the opportunity for nanometer scale, non-in-

trusive, three-dimensional imaging of cutin surface structure. Furthermore, the lack of surface metallization opens the possibility of analyzing surface texture changes induced by mechanical stress (as part of the study of the mechanical properties of biological tissues) and those produced upon exposure to controlled humidity. Also, thermal damage produced by a high energy electron beam and changes created by environment (drying,

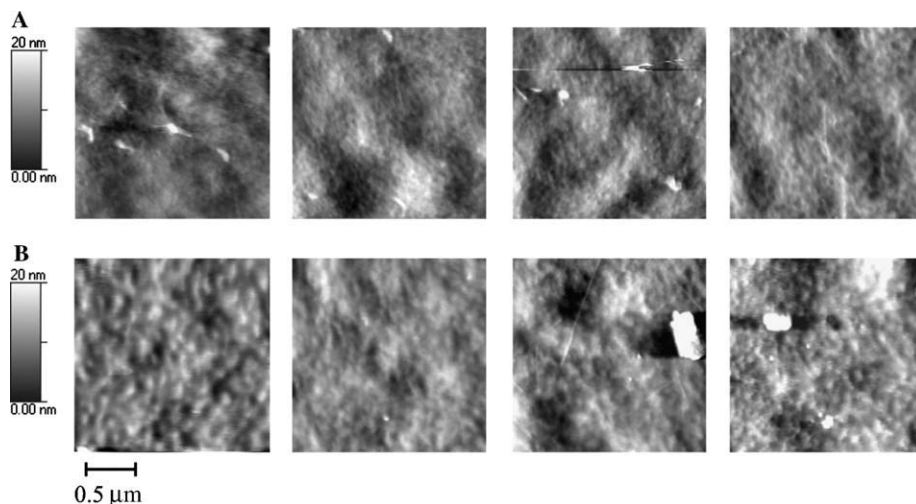


Fig. 6. High resolution AFM images of the outer surface of cutin isolated from (A) young and (B) ripe tomato fruits. Different spots in different samples are plotted to ensure reproducibility.

wrinkling, vesicle bursting, etc.) of a typical SEM preparation, are avoided.

Fig. 5 shows a series of wide range AFM images showing the homogeneity and typical textures of young and ripe tomato cutin. As observed, the topography of cutin from young fruits is modulated by soft and spaced wrinkles while cutin from ripened isolates appeared flatter.

Higher resolution images, Fig. 6, showed a characteristic short range texture that differentiates both type of cutin samples. Images corresponding to different spots in different samples have been displayed to show the reproducibility of our measurements. In the case of cutin isolated from ripened fruits, the surface can be described as an interlaced network of “worm-like” features spaced 200–300 nm. In some regions such features were randomly scattered but in others they appeared linked across a single direction giving rise to much more elongated structures. Also circular clusters were observed as the consequence of such a high interlacing. However, the cutin of young tomato presented a much less interlaced and more homogeneous texture. The size of the surface features in the X – Y plane is also two to three times smaller (about 70–100 nm).

The structural changes observed in the cutin surface of the samples investigated in the present work by AFM agree well to the cutin molecular characteristics and properties reached from spectroscopic tools and complete our current knowledge on this biopolymer. Thus, cutin isolated from tomato fruits appears as an amorphous polyester mainly formed by esterification of secondary hydroxyl groups of the dihydroxy fatty acids monomers with a different texture depending of the developmental stage of the fruit. This texture is a consequence of the actual status of the cross-linking degree of the polymer. The more dense and cross-linked cutin of ripe tomato is characterized by a flatter long range

texture and by the development of elongated and oriented superstructures.

References

- Baker, E.A., Bukovac, M.J., Hunt, G.M., 1982. Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. In: Cutler, D.F., Alvin, K.L., Price, C.E. (Eds.), *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, pp. 33–44.
- Deas, A.H.B., Holloway, P.J., 1977. The intermolecular structure of some plant cutins. In: Tevini, M., Litchenthaler, H.K. (Eds.), *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 293–299.
- Fang, X., Qiu, F., Yan, B., Wang, H., Mort, A.J., Stark, R.E., 2001. NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters. *Phytochemistry* 57, 1035–1042.
- Heredia, A., 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta* 1620, 1–7.
- Holloway, P.J., 1982. The chemical constitution of plant cutins. In: Cutler, D.F., Alvin, K.L., Price, C.E. (Eds.), *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, pp. 45–85.
- Kolattukudy, P.E., 1996. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In: Kerstiens, G. (Ed.), *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach*. BIOS Scientific Publishers, London, pp. 83–108.
- Luque, P., Bruque, S., Heredia, A., 1995. Water permeability of isolated cuticular membranes: a structural analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 417–422.
- Ramírez, F.J., Luque, P., Heredia, A., Bukovac, M.J., 1992. Fourier transform IR study of enzymatically isolated tomato fruit cuticular membrane. *Biopolymers* 32, 1425–1429.
- Round, A.N., Yan, B., Dang, S., Estephan, R., Stark, R.E., Batteas, J.D., 2000. The influence of water on the nanomechanical behavior of the plant biopolyester cutin as studied by AFM and solid-state NMR. *Biophys. J.* 79, 2761–2767.
- Villena, F.J., Domínguez, E., Heredia, A., 2000. Monitoring biopolymers present in plant cuticles by FT-IR spectroscopy. *J. Plant Physiol.* 156, 419–422.
- Walton, T.J., 1990. Waxes, cutin and suberin. *Methods Plant Biochem.* 4, 105–158.
- Zlotnik-Mazori, T., Stark, R.E., 1988. Nuclear magnetic resonance studies of cutin, an insoluble plant polyester. *Macromolecules* 21, 2412–2417.

Crack Resistance in Cherry Tomato Fruit Correlates with Cuticular Membrane Thickness

Antonio J. Matas¹

Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853

Eward D. Cobb

Department of Plant Breeding, Cornell University, Ithaca, NY 14853

Dominick J. Paolillo, Jr.

Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853

Karl J. Niklas²

Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853

Additional index words. biomechanics, collenchyma, cuticular membrane, fruit cracking, *Lycopersicon esculentum*, strain hardening

Abstract. The mechanical properties and anatomy of fruit wall peels and their enzyme-isolated cuticular membranes (CM) are reported for three cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars that are crack-resistant, crack-intermediate, and crack-prone (i.e., Inbred 10, Sweet 100, and Sausalito Cocktail, respectively). The resistant and intermediate fruit peels strain-hardened when extended progressively; those of the crack-prone cultivar did so only modestly. The CM of all cultivars strain-hardened when extended with small forces; the CM of the intermediate and crack-prone cultivars strain-softened under tensile forces that did not strain-soften the crack-resistant cultivar. The peels and CM of the resistant cultivar were stiffer, stronger, and required more energy to break than crack-prone peels. The CM of crack-resistant peels developed deeper within the subepidermis than in the crack-prone or crack-intermediate peels. The CM in the outer epidermal periclinal walls of the crack-resistant and crack-intermediate cultivars was thicker than that of crack-prone peels. These data indicate that CM thickness can be used to gauge crack susceptibility among cherry tomato fruit, which can be useful in breeding programs and would facilitate QTL mapping of the underlying genetic factors.

Tomato fruit cracking causes degradation of appearance and subsequent serious economic losses. The susceptibility of cracking has been correlated with a range of environmental and physiological factors as well as ultrastructural and anatomical features (Hankinson and Rao, 1979; Thompson, 2001; Wiedermann and Neinhuis, 1998). However, the factors responsible for fruit cracking remain problematic, although many authors emphasise the role of the cuticular membrane (CM; terminology of Holloway, 1982; Jeffrey, 1996) and the extent to which it develops in epidermal and subepidermal walls (e.g., Emmons and Scott, 1997, 1998; Voisey et al., 1970; Wattendorf and Holloway, 1980).

The objective of this study is to determine the extent to which the CM contributes to the ability of tomato fruit to resist tension, both mechanically and anatomically. Because the walls of the epidermis and adjoining subepidermal cells are placed in tension when primary organs are turgid (Kutschera 1989; Niklas and Paolillo, 1997, 1998), the CM likely

functions as a tensile skin whose mechanical properties can be influenced by temperature or external water (Cotner et al., 1969; Petracek and Bukovac, 1995; Round et al., 2000; see also Sekse, 1995).

Here, we report the mechanical properties (i.e., strength, stiffness, and work of fracture) and anatomy of fruit wall peels and their enzyme-isolated CM from three cherry tomato cultivars that differ in their susceptibility to cracking, i.e., Inbred 10 (crack-resistant), Sausalito Cocktail (crack-intermediate), and Sweet 100 (crack-prone). Comparisons between the mechanical behavior of fruit peels and their isolated CM are used to evaluate the role of the CM in intact fruit.

Our data indicate that the ability of fruit to resist cracking is highly correlated with the thickness of the CM in the outer periclinal epidermal walls and the extent to which the CM develops within subepidermal cell walls. Although differences in chemistry or ultrastructure must account for differences observed in the mechanical behaviour we report for isolated CM, we propose that CM thickness provides a convenient gauge to evaluate the cracking susceptibility of different cherry tomatoes.

Materials and Methods

Culture and sampling. Three cherry tomato cultivars differing in their susceptibility to fruit

cracking were selected for study, i.e., 'Inbred 10,' a crack-resistant Cornell line released as CT 95-946, 'Sausalito Cocktail,' a crack-intermediate Cornell line released by the Territorial Seed Company (Cottage Grove, Ore.), and 'Sweet 100,' a crack-susceptible cultivar commercially available from Agway.

Four cherry tomato plants per cultivar were grown in pots to maturity (using commercially available seeds and Cornell potting mix) under greenhouse conditions without supplemental lighting. Each plant was irrigated and fertilized on a regular schedule. Flowers were handled daily to facilitate pollination, and each inflorescence was labelled and monitored to evaluate fruit development and ripening. Between 30 and 50 fruit were selected from each cultivar when fully ripe in the sequence of their appearance, i.e., 1 or 2 d after reaching the breaker stage. Each sample was tested mechanically within 5 h of harvesting.

Sample preparation. Rectangular paradermal segments of the outer fruit wall (aligned either longitudinally or equatorially with respect to the pedicle-style fruit axis) were removed using two parallel razor blades bonded to a metal block to assure uniform segment width (5.25 mm) and depth of cut ($230 \pm 35 \mu\text{m}$). Segment-length varied due to differences in fruit size and shape.

The outer fruit wall of each sample was then peeled off by hand and placed in a petri dish subepidermal side downward on filter paper hydrated with the liquid and soft pulp of the fruit from which it was removed. This protocol was used to reduce desiccation, maintain tissue osmolarity, and prevent direct wetting of the CM. A small portion of the outer fruit wall next to each segment was also removed and preserved in FAA for anatomical study. Measurements of peel and CM thickness on light micrographs were used to determine the cross sectional areas of samples tested mechanically to compute stresses (see below). Importantly, peel and CM thickness varied across the three cultivars because of the extent to which the CM extended below the outer periclinal walls of the epidermis (see Fig. 3).

Duplicate peels were also removed from each fruit to compare peels with their enzyme-isolated CM using the protocol of Orgell (1955) as modified by Yamada et al. (1964) (see Petracek and Bukovac, 1995). Excised samples were suspended in a mixture of cellulase and pectinase of fungal origin (0.2% and 2.0% w/v, respectively; Sigma catalogue numbers C-1184 and P-4716, respectively) in a sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.0) with 1.0 mM Na₃ (to prevent microbial growth). Suspensions were aspirated to facilitate enzyme penetration before incubation at 35 °C for 7 to 10 d during which suspensions were agitated by hand daily. Samples were then rinsed in citrate buffer and inspected microscopically to determine their cross section and appearance before mechanical testing.

Mechanical tests. Peels and their corresponding CM were mounted for mechanical tests using two small metal rods suspended by triangular stirrups between the cross heads of an Instron (model 4502) testing machine

Received for publication 7 Oct. 2003. Accepted for publication 25 Jan. 2004.

¹Current address Department of Plant Breeding, Estación Experimental La Mayora (CSIC), Algarrobo-Costa 29750, Malaga, Spain.

²To whom reprint requests and correspondence should be sent; e-mail kjn2@cornell.edu.

(Instron Company, Calif.). A small amount of fast-drying super glue was spread over the middle of each rod and the external surface of both ends of each sample. Each end of the sample was then folded over one of the two rods before aligning the two stirrups parallel to the Instron cross-head axis. During tests, samples were continuously hydrated (with the liquid extracted from their fruit) by means of a micropipette applied to the subepidermis. A small piece of hydrated tissue paper was placed on this surface to maximise uniform hydration and further reduce desiccation. In passing, we note that hydration of specimens with water (as opposed to fruit-fluid extracts) or dehydration during testing resulted in data differing substantially from those reported here.

To determine tensile strains, the length of each mounted sample was measured before extension with a hand held microcaliper. The length of the CM exposed between the two folds was also measured. To determine stresses, the tensile force exerted during each test was divided by the average cross sectional area of each sample.

Successive loading-unloading tests were used to determine the affects of repeated stretching-relaxation cycles on the Young's modulus (stiffness) of a sample. Uniaxial tension tests were used to determine breaking stress (strength) and the work of fracture (energy required to rip a sample). Because no sample could be tested both ways, the data from both tests were juxtaposed to determine the mechanical properties of peels and their isolated CM. Unless otherwise noted, a 2.0 mm·s⁻¹ deformation rate (i.e., cross head displacement rate) was used in all tests. The protocols for each of the two types of tests were as follows.

In successive loading-unloading (cyclical) tests, each peel was increasingly extended (using an increasing sequence of forces from 0.10 to 0.65 N in 0.05-N increments) and allowed to relax before reloading. Because the CM contributes only a percentage fraction of the total cross sectional area of a peel, equivalent tensile forces do not generate equivalent stresses in peels and their isolated CM. Therefore, the decimal fraction *F* of the total peel cross section occupied by the CM was determined and used to compute the tensile forces required to produce equivalent stresses in the CM using the formula $P_e = F P_p$, where P_e is the equivalent stress force and P_p is the force used to extend a peel. For convenience, data from loading-unloading tests of the CM are plotted as a function of P_e .

Uniaxial tensile tests were performed using the aforementioned protocol. However, each sample was tested to failure to determine the breaking stress and the breaking strain. Uniaxial tensile tests were also used to determine the work of fracture *W* (the energy per unit cross sectional area required to propagate a crack) by making a small cut of known length on one side of a sample before it was tested to failure. The Young's modulus *E* and the breaking stress $\hat{\sigma}_b$ of each sample were then used to compute *W* using the formula $W = \hat{\sigma}_b^2 / 2E$ (see Denny, 1988; Niklas, 1992).

Anatomical protocols. Materials to be examined histologically were washed in 50% ethanol, rehydrated, and sectioned at a thickness of 10 μm, frozen in water and using a cryostat. The sections were observed unstained or stained in zinc-chlor-iodine for detection of cellulosic walls (Peacock, 1966). Unstained sections were also observed between crossed polarizers, with and without the insertion of a rose plate, which develops a color image that allows for the determination of the net orientation of unstained cellulose wall microfibrils (Bennett, 1950). Stained sections were also examined using a single polarizing filter beneath the specimen and a rotating stage to detect dichroism, which allows the determination of the net orientation of stained cellulose wall fibrils (Roelofsen, 1959). Photographs were obtained using an image capture program under the control of a microcomputer.

Results

Mechanical tests indicated that the fruit walls and CM of each cultivar are isotropic, i.e., their mechanical responses were independent of the direction of applied tensile tests. Therefore, for convenience, the data presented here are from tests using longitudinally oriented peels and enzyme-isolated CM.

The peels of all three cultivars strain-hardened (increased in stiffness) when repeatedly extended with increasing loads and allowed to relax. The relationship between the Young's modulus (stiffness) and the tensile load for each cultivar was log-log linear (Fig. 1A). Among the three cultivars, the peels from the crack-resistant cultivar strain-hardened more rapidly than those from the crack-intermediate or crack-prone cultivars as gauged by the slopes of log-log regression curves. For comparatively small tensile loads (i.e., 0.1 N A P A 0.4 N),

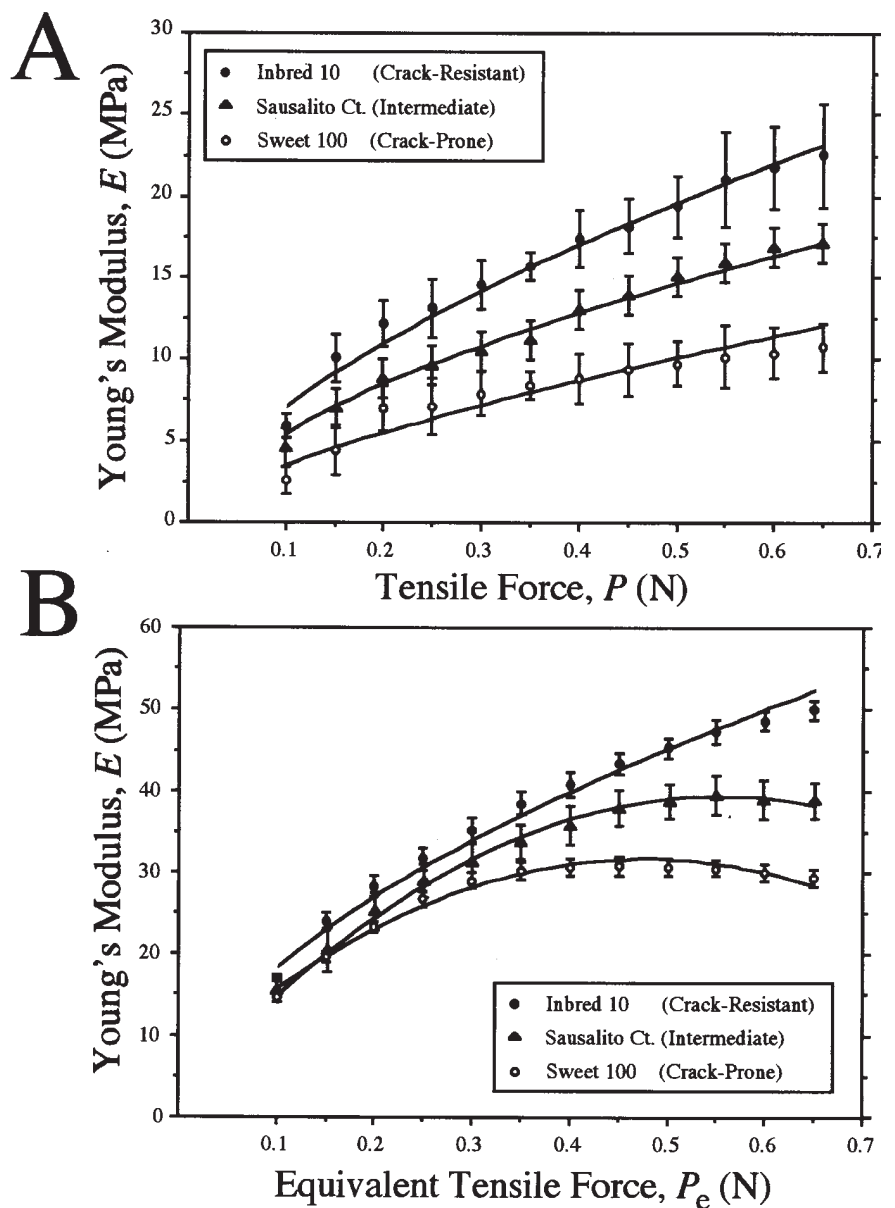


Fig. 1. Young's modulus (stiffness measured in tension) of fruit peels (A) and their isolated cuticular membranes (B) when repeatedly stretched and allowed to relax (successive loading-unloading cycles). Solid lines are regression curves (log-log linear in A; second-order polynomials in B). Across regression analyses, $0.92 A r^2 A 0.98$, $n = 12$ means based on 10 samples each).

the differences among the Young's moduli of peels were not statistically significant among the three cultivars. For larger loads (i.e., $P_e > 0.4$ N), however, the differences among the moduli between the crack-prone cultivar and either the crack-intermediate or crack-resistant cultivar were statistically significant ($p < 0.0001$) (Fig. 1A).

The behavior of the isolated CM from the crack-resistant cultivar differed from that of the other two cultivars, especially under large equivalent loads. Specifically, the crack-resistant cultivar CM did not strain-soften, whereas the CM from the other cultivars did for $P_e \geq 0.5$ N (Fig. 1B). The CM of the crack-prone cultivar strain-hardened the least and began to strain-soften more rapidly as gauged by the slopes of second order polynomial regression curves.

Tensile tests to mechanical failure indicated that the Young's modulus of peels from the crack-resistant cultivar and its isolated CM was statistically significantly greater than that of the crack-prone cultivar. Pair-wise comparisons of mean Young's moduli indicated that the stiffness of the peels and CM of the intermediate cultivar were indistinguishable from those of either the crack-resistant or crack-prone cultivars. But it is nevertheless clear that the data from peels and CM of Sausalito Cocktail are qualitatively intermediate between those from the crack-resistant and crack-prone cultivars (Fig. 2). The same trend was observed

for the breaking stress (strength) and work of fracture (energy required for breaking), i.e., the peels and CM of the crack-resistant cultivar were mechanically more robust than those of the crack-prone cultivar, whereas Sausalito Cocktail peels were intermediate.

Comparisons among the moduli, breaking stresses, and works of fracture of peels versus their isolated CM indicated that the CM is substantially stiffer than its corresponding outer fruit wall for each cultivar. For example, the average Young's modulus of the crack-resistant peels and their isolated CM are 44.2 and 71.2 MPa, respectively (Fig. 2). Although the breaking stresses of peels and their corresponding CM did not statistically differ significantly among the three cultivars, the work of fracture of isolated CM was significantly lower than that of their peels. This difference was attributed to the mechanical behavior of the fruit subepidermis, which is composed of collenchyma in all three cultivars.

Although the peels of all three cultivars consisted of a CM and underlying collenchyma (Fig. 3A–C), several anatomically significant differences among the cultivars were superimposed on this common groundplan. Specifically, the crack-resistant cultivar produced the thickest peels because of the greater combined depth of the CM and collenchyma (Fig. 3A–C). Cuticularization of cell walls extended two to three cell layers from the surface in the crack-resistant cultivar (Fig. 3A), to the inner

periclinal walls of the epidermis and to the anticlinal walls of the subepidermal layer in the intermediate cultivar (Fig. 3B), but only to the inner periclinal walls of the epidermis in the crack-prone cultivar (Fig. 3C). The collenchyma walls were thickest in the crack-resistant cultivar, thinnest in the crack-prone cultivar, and intermediate in thickness in the cultivar that occasionally cracks (Fig. 3A–C). The outer periclinal cuticularized wall was thickest in the crack-resistant cultivar, thinnest in crack-prone cultivar, and intermediate in thickness for the cultivar that occasionally cracks (Fig. 3A–C). The anticlinal cuticularized walls of the epidermis were robustly thickened in the crack-resistant and intermediate cultivar and relatively uninterrupted by the pitting between epidermal cells (Fig. 3A, B, and D). In contrast, the anticlinal cuticularized walls of the epidermis in the crack-prone cultivar were tenuous to undetectable in the areas of pitting between epidermal cells (Fig. 3C).

In all three cultivars, the cuticularized walls of the CM were lined by cellulosic walls that resembled the walls of collenchyma in their optical properties. In the crack-resistant cultivar, these walls were virtually undetectable in unstained preparations with ordinary unpolarized illumination. They were revealed by staining to be nearly uniform in thickness within the epidermal and subepidermal cells, alike. In both of the other two cultivars, the cellulose wall layers were detected in unstained preparations (Fig. 3B–D) and in stained sections (Fig. 3E), and were asymmetrically deposited within the epidermal cells. Examination of stained and unstained preparations with polarized light revealed that the net orientation of wall microfibrils in the cellulosic wall layers was parallel to the wall surfaces.

Discussion

The mechanical behavior and anatomy reported here for the fruit peels and their isolated CM are consistent with materials consisting of a viscoelastic matrix containing fibrillar components capable of passive realignment when placed in tension (Gordon, 1978; Köhler and Spatz, 2002; Niklas, 1992). Prior work indicates that tomato walls and their CM are viscoelastic (Matas et al., in press; Thompson, 2001), whereas the presence of fibrillar components in these biomaterials is substantiated by birefringent optical properties and strain-hardening behavior. We believe strain-hardening results from the alignment of fibrillar components in the direction of applied uniaxial tensile loads, whereas strain-softening is attributable to shearing failures at the interface of fibrils and their surrounding matrix, i.e., once aligned parallel to the direction of applied tensile loads, fibrils are expected to slip past one another as tensile loads exceed the breaking shear stress of the matrix in which fibrils are embedded.

However, the mechanical role of the fruit wall CM cannot be divorced from that of its underlying collenchyma, because this tissue is capable of substantial elastic deformation before breaking (Esau, 1936, 1977; Niklas,

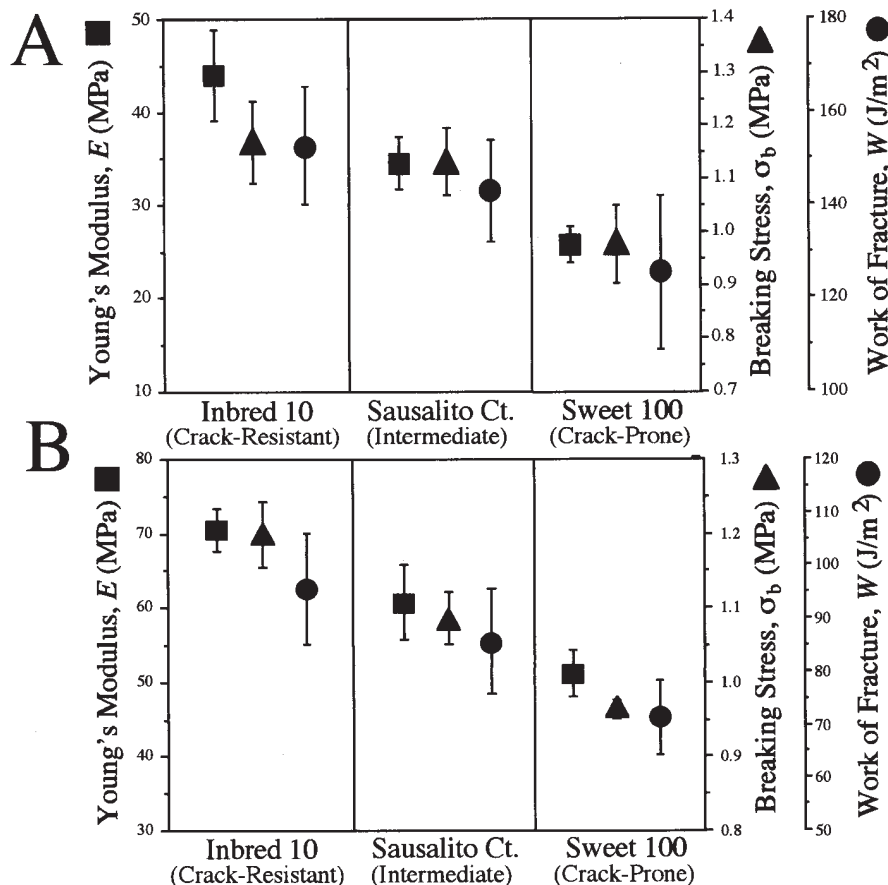


Fig. 2. Young's modulus (stiffness measured in tension), breaking stress (strength measured in tension), and work of fracture (energy required for breaking) of fruit peels (A) and isolated cuticular membranes (B). Means and se based on $n = 10$.

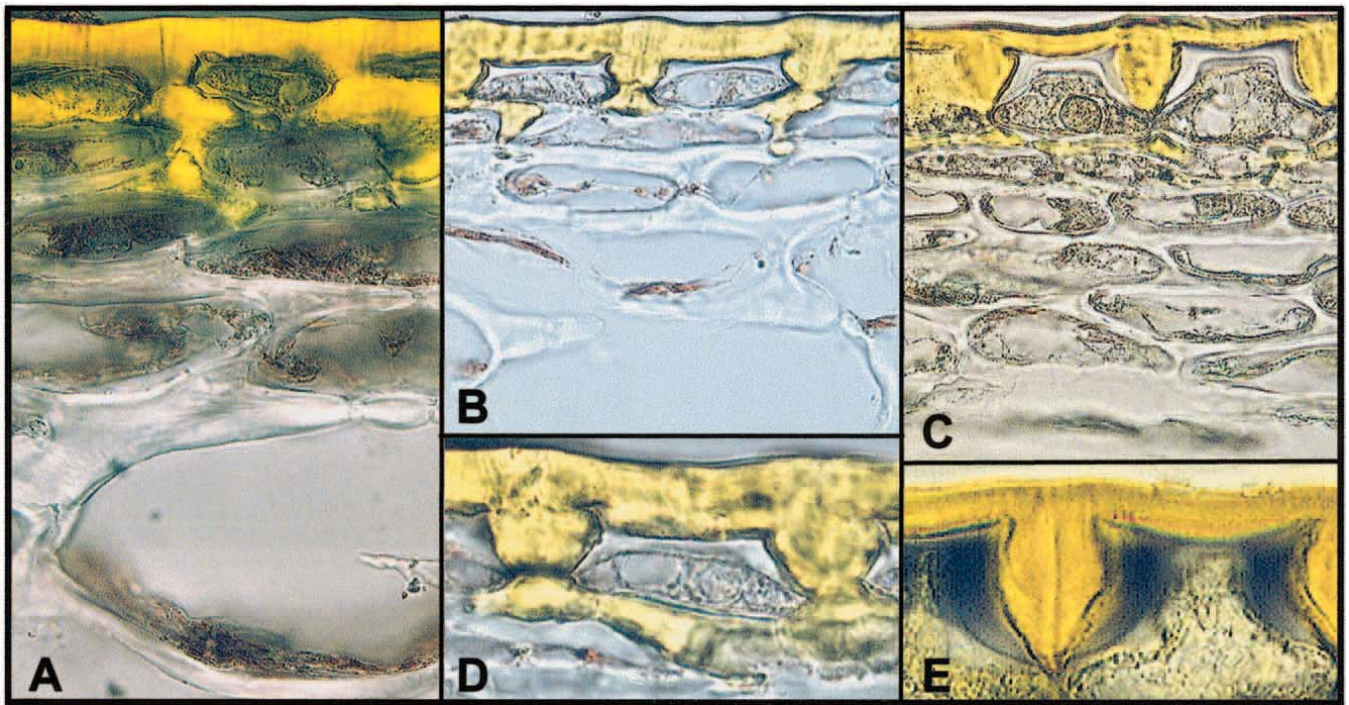


Fig. 3. Sections of outer fruit wall peels. (A) Unstained peel of Inbred 10 (crack-resistant); 570x. (B) Unstained peel of Sausalito Cocktail (crack-intermediate). 570x. (C) Unstained peel of Sweet 100 (crack-prone); 570x. Cuticularized walls have a yellow to orange color; collenchymatous walls appear grey to white in color. (D) Detail of epidermal cell of unstained Sausalito Cocktail peel. Note the inner periclinal wall is cuticularized in this example, as alternative to a collenchymatous wall. This feature is variable (see B for comparison). The thinnest part of the anticlinal walls is the location where pitting occurs between cells; 1040x (E) Peel of Sweet 100 stained with chlor-zinc-iodine. The cellulosic (collenchymatous) walls are stained dark grey and swollen due to contact with the staining reagent; 1700x.

1992). The subepidermis thus undoubtedly serves as an energy sink that absorbs strain energy as it deforms and releases this energy when it elastically restores to its original dimensions. The presence of this sink is evident from comparisons between the works of fracture of fruit peels and their isolated CM. For each cultivar examined, the fruit wall's work of fracture is substantially greater than its corresponding CM, which indicates that the subepidermis absorbs energy and extends considerably before breaking.

These results shed light on the phenomenology of tomato cracking. The CM of Inbred 10 (the crack-resistant cultivar) is thicker, stiffer, and stronger than that of Sweet 100 (the crack-prone cultivar). It also has a higher work of fracture than the CM of either of the two other cultivars. Likewise, the CM of Sausalito Cocktail (the intermediate cultivar) has mechanical and anatomical properties that are more robust than those of the crack-prone cultivar. In this regard, it must be noted that no correlation is expected between the thickness of the CM and either its Young's modulus or breaking stress, because each of these two material properties is computed by normalizing the magnitudes of applied forces with respect to the cross sectional area of the CM. Therefore, the statistically significant differences observed among the Young's moduli and breaking stresses of the CM of the crack-resistant and crack-prone cultivars indicate that the CM of their fruit differs either in its material properties *sensu stricto* or in some microstructural aspect (e.g., the contiguity of the CM throughout subepidermal periclinal cell walls; see Fig. 3).

However, a strong correlation is expected between the thickness of the CM and the ability of the outer fruit wall to resist cracking, because the stiffness and strength of the pericarp are dependent on the quantity as well as the material properties of the CM (which has an average work of fracture comparable to that of polyesters; see Gordon, 1978). Therefore, even if the material properties of the CM are equivalent among cultivars, fruit with a thicker CM are expected to be more crack resistant than those with thinner CM. That the CM of the crack-resistant cultivar is thicker as well as stiffer and stronger than that of the crack-prone cultivar is thus expected.

The mechanism of cracking, however, remains problematic. The material properties of the CM or fruit wall provide only a measure of the ability of these structures to resist deformation when mechanically stressed. In contrast, the mechanism of cracking involves the modes of CM (and collenchyma) deformation and the genesis of stress. In this regard, we note that engineering theory predicts that the magnitudes of tensile stresses induced within the CM by turgor pressure will be equivalent in all directions provided that the fruit is perfectly spherical (Gordon, 1978). However, circumferential stresses will exceed longitudinal stresses for even slightly prolate fruit shapes, whereas longitudinal stresses will exceed circumferential stresses for even slightly oblate fruit shapes (Henry and Allen, 1974; Haman and Burgess, 1986). Thus, when the internal pressure within a fruit exceeds the yield stress of an isotropic CM, the CM is expected to rupture longitudinally or circum-

ferentially in the case of prolate or oblate fruit, respectively. In this regard the fruit of all three cherry tomato cultivars are prolate and the fruit of the crack-prone and intermediate cultivars crack longitudinally without exception.

Because the yield stress of a CM can be lowered by pre- or post-harvest enzymatic processes, the external application of water, or an increase in relative humidity, the mechanisms responsible for fruit cracking are multifarious and likely to vary according to cultivar. Nevertheless, our data indicate that the thickness of the CM may provide a convenient and fairly reliable gauge of the propensity of fruit to crack, particularly in the absence of detailed biomechanical analyses. Such a quantitative character would be useful for QTL mapping of the genetic basis for resistance to cracking, although a complete understanding of cracking requires a QTL analysis of anatomical and mechanical factors over and above the thickness of the CM.

Literature Cited

- Bennett, H.S. 1950. The microscopical investigation of biological materials with polarized light, p. 591-677. In: M.R. McClung Jones (ed.). McClung's handbook of microscopical technique. Paul B. Hoeber, Inc., New York.
- Cotner, S.D., E.E. Burns, and P.W. Leeper. 1969. Pericarp anatomy of crack-resistant and susceptible tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 94:136-137.
- Denny, M. W. 1988. *Biology and the mechanics of the wave-swept environment*. Princeton Univ. Press, Princeton, N.J.
- Emmons, C.L.W. and J.W. Scott. 1997. Environmental and physiological effects on cuticle

- cracking in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122:797–801.
- Emmons, C.L.W. and J.W. Scott. 1998. Ultrastructural and anatomical factors associated with resistance to cuticle cracking in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Intl. J. Plt. Sci.* 159:14–22.
- Esau, K. 1936. Ontogeny and structure of collenchyma and of vascular tissues in celery petioles. *Hilgardia* 10:431–476.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York.
- Gordon, J.E. 1978. *Structures*. Plenum Publ. Co., New York.
- Haman, D.Z. and G.J. Burgess. 1986. Theoretical development for measuring the elastic properties of spherical cuticular membranes. *Trans. Amer. Soc. Agr. Eng.* 29:1470–1476.
- Hankinson, B. and V.N.M. Rao. 1979. Histological and physical behaviour of tomato skins susceptible to cracking. *Trans. Amer. Soc. Agr. Eng.* 104:577–581.
- Henry, Z.A. and W.H. Allen. 1974. Use of hydrostatic pressure in development of stress strain information for tomato skins. *Trans. Amer. Soc. Agr. Eng.* 99:787–792.
- Holloway, P.J. 1982. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: An overview, p. 1–32. In: D.F. Cutler, K.L. Alvin, and C.E. Price (eds.). *The plant cuticle*. Academic Press, London.
- Jeffrey, C. E. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles, p. 33–82. In: G. Kerstiens (ed.). *Plant cuticles: An integrated functional approach*. Bios Scientific Publ. Ltd., Oxford, U.K.
- Köhler, L. and H.-C. Spatz. 2002. Micromechanics of plant tissues beyond the linear-elastic range. *Planta* 215:33–40.
- Kutschera, U. 1989. Tissue stresses in growing plant organs. *Physiol. Plantarum* 77:157–163.
- Matas, A.J., E.D. Cobb, J.A. Bartsch, D.J. Paolillo, Jr., and K.J. Niklas. 2004. Biomechanics and anatomy of *Lycopersicon esculentum* L. outer fruit walls and enzyme-treated samples. *Amer. J. Bot.* 91:352–360.
- Niklas, K.J. 1992. *Plant biomechanics*. Univ. Chicago Press, Chicago, Ill.
- Niklas, K.J. and D.J. Paolillo, Jr. 1997. The role of the epidermis as a stiffening agent in *Tulipa* (Liliaceae) stems. *Amer. J. Bot.* 84:735–744.
- Niklas, K.J. and D.J. Paolillo, Jr. 1998. Preferential states of longitudinal tension in the outer tissues of *Taraxacum officinale* (Asteraceae) peduncles. *Amer. J. Bot.* 85:1068–1081.
- Orgell, W.H. 1955. The isolation of plant cuticle with pectic enzymes. *Plant Physiol.* 30:78–80.
- Peacock, H.D. 1966. *Elementary microtechnique*. E. Arnold, U.K.
- Petracek, P.D. and M.J. Bukovac. 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiology* 109:675–679.
- Roelofsens, P.A. 1959. *The plant cell wall*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Round, A.N., B. Yan, S. Dang, R. Estephan, R.E. Stark, and J.D. Batteas. 2000. The influence of water on the nanomechanical behavior of the plant biopolyester cutin as studied by AFM and solid-state NMR. *Biophysical J.* 79:2761–2767.
- Sekse, L. 1995. Fruit cracking in sweet cherries (*Prunus avium* L.). Some physiological aspects—A mini review. *Scientia Hort.* 63:135–141.
- Thompson, D.S. 2001. Extensiometric determination of the rheological properties of the epidermis of growing tomato fruit. *J. Expt. Bot.* 52:1291–1301.
- Voisey, P.W., L.H. Lyall, and M. Kloek. 1970. Tomato skin strength—Its measurement and relation to cracking. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95:485–488.
- Wattendorf, J. and P.J. Holloway. 1980. Studies on the ultrastructure and histochemistry of plant cuticles: the cuticular membrane of *Agave americana* L. *in situ*. *Ann. Bot.* 46:13–28.
- Wiedermann, P. and C. Neinhuis. 1998. Biomechanics of isolated plant cuticles. *Botanica Acta* 111:28–34.
- Yamada, Y., S.H. Wittwer, and M.J. Bukovac. 1964. Penetration of ions through isolated cuticles. *Plant Physiol.* 39:28–32.

RELATIVE HUMIDITY AND TEMPERATURE MODIFY THE MECHANICAL PROPERTIES OF ISOLATED TOMATO FRUIT CUTICLES¹

ANTONIO J. MATAS,² GLORIA LÓPEZ-CASADO,³ JESÚS CUARTERO,² AND
ANTONIO HEREDIA^{3,4}

²Estación Experimental La Mayora (CSIC) Algarrobo-Costa, E-29750 Málaga, Spain; and ³Grupo de Caracterización y Síntesis de Biopolímeros Vegetales, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, Spain

The mechanical properties of enzymatically isolated cuticular membrane (CM) from ripe tomato fruits were investigated at 10 to 45°C and relative humidity (RH) of 40 to wet. CM samples were stressed by uniaxial tension loads to determine their tensile modulus, E , breaking stress (strength), σ_{\max} , and maximum elongation, ϵ_{\max} . The CM stress-strain curves revealed a biphasic behavior when tested at RH values below wet conditions. In the first phase, CM responded to the loads by instantaneous extension with no further extension recorded until a further load was added: defined as pure elastic strain (E_e). In the second phase, CM responded by instantaneous extension and by some additional time-dependent extension, defined as viscoelastic strain (E_v). When CMs were submerged in aqueous solution (wet), the stress-strain curves were monophasic, with both elastic and viscoelastic strain. E_e depended on RH and was higher than E_v , which was independent of RH. Temperature decreased E_e and σ_{\max} of tomato fruit CM. Temperature response was not linear but consisted of two temperature-independent phases separated by a transition temperature. This transition zone has been related previously to the presence of a secondary phase transition in the cutin matrix of the tomato fruit CM.

Key words: biphasic behavior; cuticular membrane; fruit cracking; *Lycopersicon esculentum*; plant biomechanics; tomato fruit.

Most epidermal cells of the aerial parts of higher plants (such as leaves, fruits, and nonwoody stems), as well as some bryophytes, are covered by a continuous extracellular membrane of soluble and polymerized lipids called the cuticle or cuticular membrane (CM). The structure and composition of the CM varies among plants, organs, and growth stages (Kerstiens, 1996), but it is basically composed of a cutin matrix with waxes embedded in (intracuticular) and deposited on the surface (epicuticular) of the matrix. Cuticular wax is a general term used to describe complex mixtures of homologous series of long chain aliphatics such as alkanes, alcohols, aldehydes, fatty acids, and esters, with the addition of variable proportions of cyclic compounds such as triterpenoids and hydroxycinnamic acid derivatives. The cutin consists largely of esterified fatty acids, with chain lengths mostly of 16 and 18 atoms of carbon, hydroxylated and epoxy-hydroxylated (Kolattukudy, 2001; Heredia, 2003).

A suite of physical, chemical, mechanical, and morphological properties gives the plant CM the characteristics of a unique and complex biopolymer. Since vascular plants managed to establish themselves on dry land around 400 million years ago, they have been protected by this complex biopolymer. From a physiological point of view, the main function ascribed to the CM is to minimize water loss (Riederer and Schreiber, 2001). However, from a more general point of view, this role in the regulation of plant water loss is accompanied by other important functions: the CM limits the loss of substances from plant internal tissues, protects the plant against physical, chemical, and biological attacks and protects the

fruits against the external environment both while the fruit is on the plant and after harvest. The CM enlarges as plant organs grow and, especially in fruits such as tomato that are without stomata, the main function of the CM is to maintain the integrity of the fruit (Wiedemann and Neinhuis, 1998). The cuticular membrane in association with the epidermis and subepidermis (the skin) is the morphological structure that confers the main mechanical strength to ripe tomato fruit; the skin is where failure (cracks) in the fruit are initiated because the skin surrounds a mass of more deformable material (Desmet, 2003; Matas, 2004a). Cuticular cracking is a persistent and widespread problem in some greenhouse-grown fruits such as tomatoes and peppers. Cracking appears mainly in ripe fruits, degrading fruit appearance and, subsequently, causing serious economic losses (Young, 1947; Aloni, 1998). Hence, the biomechanics of the skin and the CM are of great commercial importance.

The biomechanics of CM isolated from leaves of some species and from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit were studied in some detail by Wiedemann and Neinhuis (1998), who demonstrated that mechanical characteristics of isolated CM vary greatly between species and, importantly for the tomato fruit, that the CM provides structural support for those fruits without hard internal tissue.

A number of tests have been performed to assess the mechanical properties of the skin in relation to fruit growth and cracking. Most tests used (puncture, bursting, and flat-plate compression) have many limitations because they generate a combination of compression, shear, and tensile stresses (Miles et al., 1969; Voisey et al., 1970). A few tensile tests have been performed in order to characterize the tensile properties of fruit skins of some species: tomato (Batal, 1970; Murase and Merva, 1977; Thompson, 2001), onion (*Allium cepa* L.) (Hole, 2000), and olive (*Olea europaea* L.) (Georget, 2001). According to Hershko (1994), the tensile properties of ripe tomato skin can be described by a few values, namely strength (break-

¹ Manuscript received 29 June 2004; revision accepted 13 December 2004.

This work was partially supported by CAJAMAR in collaboration with CSIC and Universidad de Málaga. Antonio J. Matas was funded by a grant from Ministerio de Educación y Ciencia. The authors thank Drs. Karl J. Niklas and Anthony R. Yeo for helpful discussion and comments.

⁴ Author for correspondence (E-mail: heredia@uma.es) Phone: 34-952-131940, fax: 34-952-132000.

ing strength), strain at failure, and stiffness, all of which can be determined by tensile tests. Tensile stress is usually plotted against the resulting strains to produce a graph called a stress–strain diagram. The slope of the initial linear region on the stress–strain diagram is called the elastic modulus, E , and provides an estimation of the stiffness. Strength can be defined as the maximum stress required to cause a material to break (Niklas, 1992).

From stress–strain studies, the CM was described as a viscoelastic polymer network; isolated tomato fruit CM expands and becomes more elastic and susceptible to fracture after hydration, suggesting that water plasticizes the CM (Petracek and Bukovac, 1995; Wiedemann and Neihuis, 1998). This hypothesis was demonstrated by Round et al. (2000) who, using atomic force microscopy and solid-state nuclear magnetic resonance, showed that water absorbed by the tomato fruit cutin acts as a plasticizer, promoting molecular flexibility and softening the polymer network. Those results agree well with the correlation between the occurrence of fruit cracking and the presence of high humidity or large application of water for several species such as tomatoes, sweet cherries and bell pepper (Peet, 1992; Seske, 1995; Aloni, 1998). However, CM cannot be viewed as a polymer with only two states, hydrated and dry. Fruits grow in a wide range of relative humidity and, presumably, the mechanical properties of the CM change according to, though not necessarily in direct proportion to, relative humidity. Fruits also grow in a wide range of temperatures. Peet (1992) demonstrated a relationship between temperature and the occurrence of fruit cracking, but did not study the mechanical properties of the CM.

In the present work, we describe how the mechanical properties of tomato CM change with relative humidity and temperature, and we introduce relevant new information on the interaction of relative humidity and temperature on the mechanical properties of tomato CM. Ripe tomato fruit CM was employed as a model because the CM of tomato has probably been studied the most extensively. During the last two decades, information on its composition, ultrastructure, and biophysical properties has accumulated (Heredia, 2003). Data described herein concerning the mechanical properties increase substantially our knowledge about the cuticular membrane at temperatures and relative humidities in the natural environments of crops.

MATERIALS AND METHODS

Culture and sampling—Tomato cv. Cascade was grown in a commercial polyethylene greenhouse in Málaga, Spain (36°40' N, 4°29' W) from mid-February to mid-June 2001, without supplemental heating or lighting. Seeds were sown in vermiculite on 12 January and, when seedlings had developed five true leaves (14 February), 40 plants were transplanted one each into 40 pots of 20-L capacity filled with sand (3 mm diameter). Pots were arranged in rows with 1 m between rows and 2 pots/m within rows. Standard nutrient solution (10 mM N, 7 mM K, 0.9 mM P, 5 mM Ca, 2 mM Mg, and microelements) was supplied to the plants from transplanting to maturity by an automatic trickle irrigation system, with one trickler per plant that dispensed 2.0 L/h. Plants were grown as single stems by removing side shoots at weekly intervals. Flowers were vibrated daily to facilitate pollination. Flowers were labeled at the time of blooming and monitored subsequently to evaluate fruit development and ripening. Fifty fruits were selected when fully ripe for CM isolation and further quality studies. CM were isolated from each fruit within five hours from fruit harvesting.

Cuticle isolation—Fruit CM was enzymatically isolated from ripe tomato fruits following the protocol of Orgell (1955) as modified by Yamada et al.

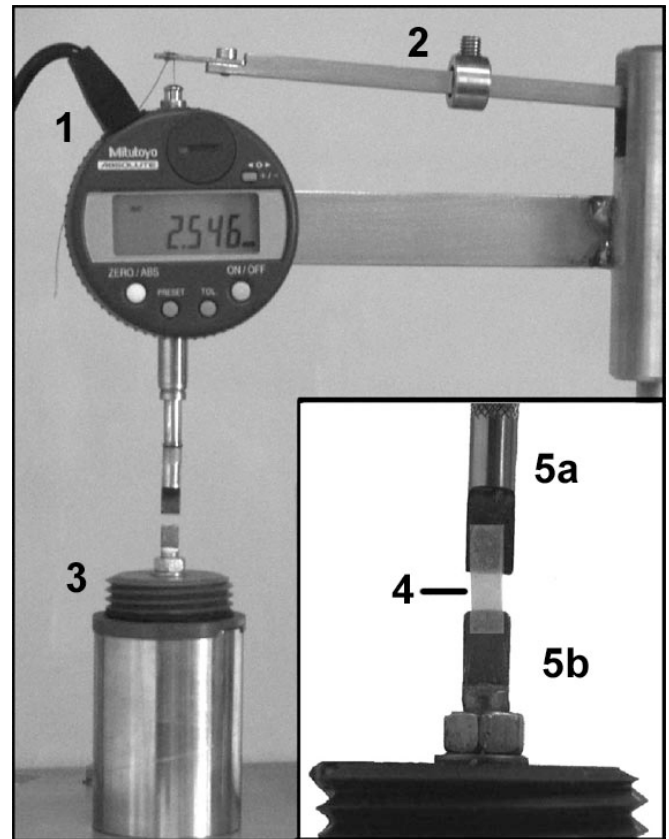


Fig. 1. Detail of the extensometer showing the linear displacement transducer (1), the balancing arm (2), and the rubber piston where the reservoir is attached (3). Inset: isolated CM sample (4) fixed between the ends of two hollow stainless-steel needles (5a and 5b).

(1964; see Petracek and Bukovac, 1995) using an aqueous solution of a mixture of fungal cellulase (0.2% w/v, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) and pectinase (2.0% w/v, Sigma), and 1 mM NaN_3 to prevent microbial growth, all in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.0). Suspensions were aspirated to facilitate enzyme penetration, then they were incubated with continuous agitation at 30°C for 7 to 10 d. The CM was then separated from the epidermis, rinsed in distilled water, and stored in dry conditions.

Mechanical tests—The mechanical properties were measured using an extensometer equipped with a linear displacement transducer (Mitutoyo, Kawasaki, Japan) specifically made to work with CM (resolution of $\pm 1 \mu\text{m}$). The equipment is very similar to that designed and reported by Kutschera and Schopfer (1986). Rectangular uniform segments (3 mm \times 9 mm) of isolated CM were removed using a metal block and inspected microscopically to check for absence of small cracks, before mechanical testing. The dry CM segments were fixed between the ends of two hollow stainless-steel needles, by a small amount of fast-drying super-glue, such that the CM formed a plane surface (Fig. 1). A container was attached to the extensometer so the samples could be equilibrated in a buffer solution of 20 mM sodium citrate (pH 3.2) with 1 mM NaN_3 in order to inhibit bacterial and fungal growth (Kutschera and Schopfer, 1986; Petracek and Bukovac, 1995). The system was enclosed in an environment controlled chamber that allowed control of temperature and relative humidity (RH). Every CM sample was maintained inside the extensometer chamber at least 30 min to equilibrate their temperature and humidity with the medium before beginning the extension test.

The cross-sectional area of the samples was measured by optical microscopy and image analysis software (Visilog v5.2, Noesis, France). The length

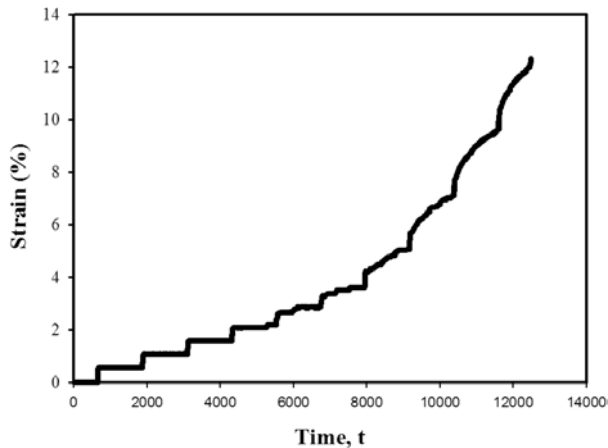


Fig. 2. Time-course of successive loading tensile test (creep) of tomato fruit CM at 40% RH and 23°C. Data were recorded every 3 s. Successive increases of extension for tensile forces rise from 0.098 N until breakage with increments of 0.098 N every 1200 s.

of the exposed surface of the sample between the two supports was measured before mechanical extension tests.

The mechanical tests were performed as a transient creep test to determine the changes in length of a CM segment by maintaining samples in uniaxial tension, under a constant load, for 1200 s, during which the longitudinal extension of each sample was recorded by a computer system every 3 s. Each sample was tested repeatedly using an ascending sequence of sustained tensile forces (from 0.098 N to breaking-point by 0.098 N load increments) without recovery time (Fig. 2). To determine stresses, the tensile force exerted along the sample was divided by the representative cross-sectional area of the sample. To obtain the corresponding stress-strain curve, the applied stress was plotted against the total change in length after 20 min. Breaking stress (σ_{\max}) and maximum strain (ϵ_{\max}) were also determined for each sample.

Stress-strain curves were calculated for a set of 3–7 samples of CM equilibrated at each combination of temperature (10, 23, 30, 35, and 45°C) and RH (40, 80 and wet). Temperature and RH ranges were chosen to cover environmental conditions in which the tomato crop is grown.

Statistics—Simple and multiple regression analyses and all pairwise comparisons of the E , σ_{\max} , and ϵ_{\max} means were used to determine whether the measured characteristics of the CM samples varied significantly and predictably as a function of humidity and/or temperature. All analyses were performed using the software package JMP (SAS Institute, Inc.) on a Power Macintosh 8100/80. Data are presented as means and SD with a level of significance of 5% ($P = 0.05$).

RESULTS

Mechanical behavior of isolated tomato fruit CM—The time-course of creep of isolated tomato fruit CM showed two clear phases when loaded in tension by load increases of 0.098 N at intervals of 1200 s at 23°C and 40% RH (Fig. 2). (1) There was a first phase that lasted from 0 to 0.49 N of load (five load increases) in which CM responded to each load by instantaneous extension (about 0.5% strain in every load) but with no further extension recorded until the next load was added; the strain in this phase was purely elastic. (2) There was a second phase, at loads greater than 0.49 N, in which CM responded by instantaneous extension (elastic strain) and by some additional extension (viscoelastic strain) during the time that the same load was maintained. The transition from elastic to viscoelastic was gradual, with elastic strain predom-

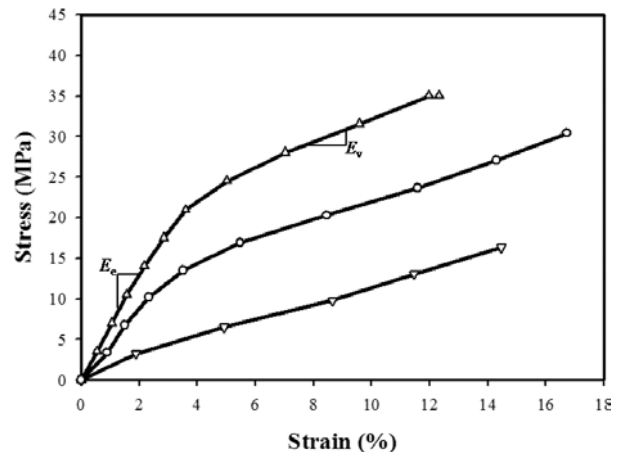


Fig. 3. Mechanical response of tomato fruit CM under tension at 40% (●), 80% (○), and 100% RH (△). Temperature was constant at 23°C.

inating over viscoelastic strain from 0.49 to 0.784 N (five–eight loads) and viscoelastic being predominant at loads greater than 0.784 N.

Biphasic behavior can also be observed in the stress-strain curve at 23°C and 40% RH where the relationship can be defined by two phases with different slopes (Fig. 3). The stress-strain curves allow the calculation of tensile modulus, E , from the slope of the linear elastic phase of the curve, E_e , and from the linear viscoelastic phase, E_v . The average thickness of the cuticle between the epidermal cell wall and the outer surface was $7.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$. This value was used to estimate the cross-sectional area of the samples. See Fig. 3 for details.

Mechanical parameters of the CM depend on relative humidity and temperature—Stress-strain curves obtained at 40% and 80% RH always consisted of two linear phases throughout the range of temperature tested (10–45°C). The curves at 23°C are shown in Fig. 3 as an example. The main difference between the stress-strain curves at 40% and at 80% RH was the reduction of E_e ($E_{e40\%} = 693 \pm 56 \text{ MPa}$ and $E_{e80\%} = 371 \pm 17 \text{ MPa}$).

When CMs were submerged in aqueous solution (wet), the stress-strain curves were monophasic corresponding to viscoelastic strain, and tensile modulus ($E_{\text{vwet}} = 172 \pm 83 \text{ MPa}$) was even smaller than E_e at 80% RH (Fig. 3). Tensile modulus at wet experimental conditions was similar to that obtained from the slope of the second linear phase at 40 and 80% RH ($E_{v40\%} = 201 \pm 25 \text{ MPa}$; $E_{v80\%} = 182 \pm 34 \text{ MPa}$). Tensile modulus in the viscoelastic phase of the stress-strain curve seems to be independent of RH and of temperature (data not shown).

The combined effects of temperature and RH are shown in Fig. 4. Tensile modulus decreased when temperature increased from 10 to 45°C at 40% RH. This decrease was nonlinear but can be described as two temperature-independent stages, at 10–30°C (E_e values about 705 MPa) and at 35–45°C (E_e values about 435 MPa), and with a transition between them at a temperature of 30–35°C. At 80% RH, E_e was smaller than at 40% RH at all temperatures, and although there was still a significant difference between the value of E_e at the lower and higher range of temperatures, the transition between stages was more

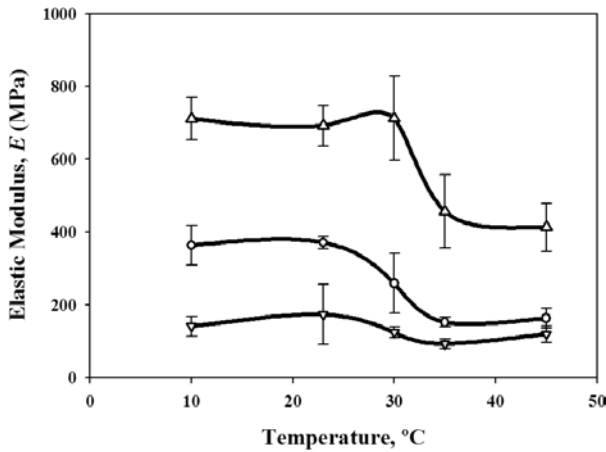


Fig. 4. Temperature dependence of stiffness of tomato fruit CM at 40% RH (Δ), 80% RH (\circ) and 100% RH (\square). Data are means \pm SD.

gradual, extending between 23 and 35°C. At wet conditions, E_v did not differ significantly ($P = 0.05$) over the range of temperature; however, there were still significant differences at $P = 0.07$ between the mean E_v at 10 and 23°C and the mean E_v at 35 and 45°C.

The transition ended at 35°C for 40 and 80% RH, the two RH at which a transition temperature was demonstrated clearly; however, the beginning of the transition depended on RH because it was initiated at 30°C or higher temperature at 40% RH and between 23 and 30°C at 80% RH (Fig. 4).

Considering that E was independent of temperature below or upon transition temperature (values of E without significant differences, Table 1), mean values of E were calculated below or above the transition temperature, for 40, 80, and wet. Tensile modulus decreased with increasing RH for temperatures both below and above the transition temperature. In absolute terms, the decrease of E was greater below transition temperature (707–163 MPa) than above (437–99 MPa); however, in relative terms the decrease was similar, 77% in both cases.

Stress at breaking point (σ_{max}) could also be described as two stages, below 30 and above 35°C, again with a transition temperature between 30 and 35°C (Fig. 5). Differences of σ_{max} between high and low temperatures were significant at wet and 80% RH. The low-temperature plateau at 40% RH was unclear because of the large value of σ_{max} observed at 10°C. Stress at breaking point below and above the transition temperature decreased with increasing RH, although, in this case, the decrease was similar below (32–21 MPa) than above (26–14 MPa) the transition temperature (Table 1).

RH, and to a lesser extent temperature, explain a high proportion of the variability in stiffness and in strength—Multiple regression showed that the combined effects of relative humidity and temperature explained 89.8% of the variance observed for E ($R^2 = 0.898$, $P < 0.001$). When relating E with RH and temperature in separate simple linear regressions, R^2 was 0.780 for RH and 0.146 for temperature. Therefore, both RH and temperature affected the stiffness of the CM and in the same direction (negative regression coefficients); the higher RH and the higher the temperature, the lower the value of E , although RH accounted for much more of the variance than did temperature (78% and 15% respectively).

Relative humidity and temperature together explained 63%

TABLE 1. Stiffness (E , MPa) and strength (σ_{max} , MPa) of tomato fruit CM at three relative humidities (RH, %) and five temperatures (T, °C), with averages of E and σ_{max} , below and above of temperature transition zone. Means followed by different letter for every RH, differ significantly at $P < 0.05$.

RH	T	E	Plateau		Strength	Plateau	
			°C	E		°C	σ_{max}
40	10	711 a	10–30°	707 a	46 a	23–30°	32 a
	23	693 a					
	30	712 a					
	35	456 b	35–45°	437 b	26 b		
	45	413 b					
80	10	363 a	10–23°	367 a	30 a	10–30°	29 a
	23	371 a					
	30	259 b					
	35	152 c	35–45°	156 b	23 a		
	45	163 c					
100	10	141 a	10–23°	163 a	24 a	10–30°	21 a
	23	173 a					
	30	124 a					
	35	92 a	35–45°	99 a	13 a		
	45	119 a					

of the variance observed for σ_{max} ($R^2 = 0.630$, $P < 0.001$). Similarly to the case of E , RH explained more of the variability in σ_{max} ($R^2 = 0.383$) than did temperature ($R^2 = 0.247$), although RH and temperature made a similar contribution to the variance of σ_{max} (38% and 25%, respectively) than of E . Thus, the strength of the CM was affected by both RH and temperature.

Stiffness and strength are related through RH and temperature—The set of 77 CM samples for which both stiffness and strength were measured were used to investigate the relationship between these two parameters. In general, E and σ_{max} varied in the same direction: the higher or the lower E , the higher or the lower σ_{max} (Fig. 6). The relation between the two variables could be described by a linear regression ($R^2 = 0.55$, $P > 0.99$), and no better fit could be achieved using polynomial, logarithmic, exponential equations.

Because both E and σ_{max} were affected by both RH and

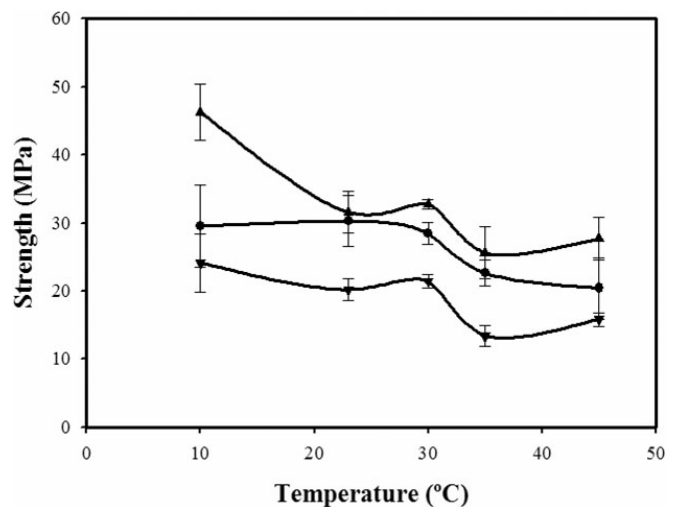


Fig. 5. Temperature dependence of strength of tomato fruit CM at 40% RH (Δ), 80% RH (\bullet) and 100% RH (\square). Data are means \pm SD.

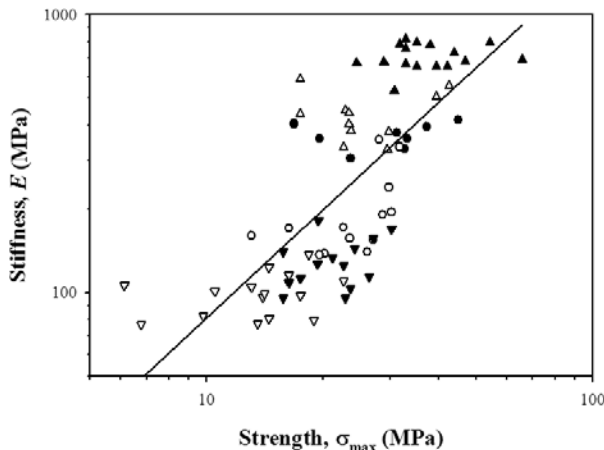


Fig. 6. Regression line between stiffness and strength of tomato fruit CM samples at 40% RH and temperature below () and above () transition temperature, at 80% RH and temperature below (●) and above (○) transition, and at 100% RH and temperature below (□) and above (■) transition temperature.

temperature, we have investigated the relationship between stiffness and strength using sets of CM samples at the same RH and at the same temperature. At RH of 40% or 80%, the change in σ_{\max} produced by changes in temperature between 10 to 45°C only explained 28% of the variance in E ; E would increase at a rate of about 7 MPa per MPa increase of σ_{\max} . At wet conditions, E and σ_{\max} were independent (Table 2). At constant temperature of 10, 23, 35, and 45°C, the change in σ_{\max} produced by changes in RH between 40 and wet, explained almost half (44–49%) of the variance in E ; E would increase at a rate of about 15 MPa per MPa increase of σ_{\max} . At 30°C, changes in σ_{\max} produced by changes in RH explained a much higher (up to 70%) proportion of the variance in E than at 10, 23, 35, or 45°C. This could be because 30°C was close or in the transition temperature where large changes in E and σ_{\max} were recorded with small changes in temperature.

Maximum elongation is independent of RH and temperature—Maximum elongation (ϵ_{\max}) of CM samples was $13.8 \pm 0.5\%$. No significant differences for ϵ_{\max} due to temperature or RH were detected. Maximum elongation and stiffness were independent when all (77) data set was considered or when the subsets of the data with the same RH or same temperature were considered. Maximum elongation and maximum strength appeared as independent variables when the whole (77) data

set was considered; however, when data were divided according to the same RH, a significant positive relationship was found at 40 and 80% RH (Table 2). This relation between ϵ_{\max} and σ_{\max} was not found at constant temperature.

DISCUSSION

The stress–strain curves of tomato fruit CM revealed a biphasic behavior when tested at RH below 100%. At loads smaller than 0.49 N, the CM was instantly deformed characteristic of elastic behavior. In contrast, at loads greater than 0.59 N, deformation demonstrated a creep process. This biphasic behavior has not been described in previous research on the biomechanics of CM from tomato fruit (Petracek and Bukovac, 1995; Wiedemann and Neinhuis, 1998), nor from other fruits. Nevertheless, the biphasic behavior has been reported in other plant tissues as fibers from *Agave americana* or *Cocos nucifera*, wood from *Juniperus virginiana*, strengthening tissues from *Fontinalis antipyretica* and *Equisetum hyemale*, and from stems of *Aristolochia* species (Köhler, 2000 and references therein) and from leaf cuticles of *Nerium oleander* and *Hedera helix* (Wiedemann and Neinhuis, 1998). Köhler (2000) indicates that, in the case of cell walls of *Aristolochia* stems, the cellulose microfibrils are responsible for the elastic behavior, whereas the rest of the cell wall matrix accounts for the plastic mechanical alterations. Plant CM can be also considered as a composite biopolymer mainly formed by an amorphous polyester (cutin) and small amounts of waxes, and hydrolyzable polysaccharides, mainly cellulose. The macromolecular arrangement of these biopolymers may provide the molecular basis to explain both elastic and viscoelastic behavior of the tomato CM. This information has been difficult to obtain until now (Heredia, 2003), but it will be an important area of research to improve our understanding of mechanical properties of plant CM.

Tensile modulus, a direct measure of the sample stiffness, has been used to characterize plant material (Niklas, 1992; Hershko, 1994) and to quantify the responses of a material to variables such as temperature and RH (Murase and Merva, 1977; Hole, 2000). Our values of E for isolated tomato fruit CM are not far from those reported by Matas et al. (2004a) and Wiedemann and Neinhuis (1998) for a wide number of isolated CM from fruits and leaves.

Data presented in this paper indicates that mechanical properties of the isolated tomato fruit CM depend on relative humidity and temperature, as do other biological polymers as cellulose. Tensile modulus and maximum strength of the CM samples varied in the same direction with RH and temperature: the higher the RH and temperature, the lower both stiffness

TABLE 2. Linear relationships between stiffness (y) and strength (x) and between ϵ_{\max} (y') and strength (x') for tomato fruit cuticular membrane at 40, 80 and 100% RH and at 10, 23, 30, 35 and 45°C.

Environmental variable set	Number of samples	Linear equation	R^2	Linear equation	R^2
40% RH	25	$y = 7.46x + 347$	0.28	$y' = 0.30x' + 2.21$	0.41
80% RH	21	$y = 7.19x + 71$	0.27	$y' = 0.37x' + 4.8$	0.63
100% RH	31	$y = 3.32x + 66$	0.14	$y' = 0.37x' + 8.1$	0.29
10°C	14	$y = 12.34x + 36$	0.49	$y' = 0.17x' + 9.4$	0.25
23°C	15	$y = 19.82x + 149$	0.44	$y' = 0.06x' + 12.1$	0.01
30°C	16	$y = 40.72x - 757$	0.70	$y' = -0.38x' + 23.9$	0.28
35°C	21	$y = 11.68x - 34$	0.45	$y' = 0.30x' + 8.5$	0.25
45°C	11	$y = 15.80x - 92$	0.47	$y' = 0.14x' - 8.5$	0.10
General	77	$y = 16.19x - 95$	0.55	$y' = 0.15x' - 10.0$	0.11

and strength. The dependence of E on RH and temperature has been demonstrated only in the elastic phase of the strain–stress curve; tensile modulus calculated in the viscoelastic phase, E_v , was independent of both environmental variables, indicating that RH and temperature affected the structural component responsible of stiffness only in the elastic phase of the curve. Additionally, stiffness and strength can be related through RH and temperature.

Although earlier research on the biomechanics of CM isolated from tomato fruit described a reduction on E after hydration or removal of waxes (Petracek and Bukovac, 1995; Wiedemann and Neinhuis, 1998), none of these authors reported the effects that relative humidity and temperature could have over the mechanical properties of the fruit CM.

The presence of water in the CM samples is a primary determinant of their mechanical properties. We have found that the stiffness of the CM was reduced after immersion of the CM in water, confirming the results obtained by Petracek and Bukovac (1995) and Wiedemann and Neinhuis (1998). In addition, we have characterized the mechanical properties of submerged CM samples, demonstrating that they presented viscoelastic behavior that followed a linear, monophasic stress–strain curve, showing the smallest tensile modulus and stress at maximum load. Below 100% RH, the stress–strain curve was biphasic, and a negative relationship between E and RH was found. However, to develop a complete and plausible explanation of the effect of RH on the mechanical properties of the CM, temperature must be also considered. Moreover, as our results revealed, the effects of both temperature and RH on stiffness and stress were closely related.

Temperature decreased E_c and stress of isolated tomato fruit CM. This relationship, a typical feature observed also for technical semicrystalline polymer like polyethylene, was not linear but showed two temperature-independent stages separated by a transition temperature between 23 and 35°C, depending on the RH at which measurements were made. These characteristics of the temperature response of E and of stress can be related to the presence of a temperature transition in the cutin matrix of the isolated tomato fruit CM. The existence of a second order (glass) transition temperature in the cutin matrix of isolated tomato CM has been reported recently by members of our laboratory after differential scanning calorimetric analysis of the specific heat of isolated tomato fruit CM and the corresponding isolated cutins (Matas et al., 2004b). Cutin samples presented a clear second-order transition (named glass transition) temperature in the range of 18–30°C. The transition temperatures of isolated cutin and tomato CM are similar though not identical, perhaps because the CM contains waxes and polysaccharides (mainly cellulose) in addition to cutin. The presence of a transition temperature in the CM and in the cutin matrix of the same samples, suggests the coexistence, over a physiological range of temperature, of two physical states with different structural characteristics. Below the transition temperature, the polyester that forms the cutin would remain with restricted rotational and vibrational freedom in addition to an effective loss of translational motion. Above the transition temperature, the molecular arrangement of the polymer would be more relaxed and dynamic, permitting translational motion between the long hydrocarbon chains present in the cutin network. This could provide a macromolecular explanation for the biomechanical behavior of fruit CM observed and described here: greater stiffness associated with a glass state below the transition temperature and plastic characteris-

tics, being associated with a more viscous state, above the transition temperature.

Water plays a crucial role in this complex scenario. For tomato fruit CM, the phase transition is, from the energetic point of view, attenuated, and that transition shifted to lower temperature, when water is sorbed by CM. This would indicate plasticization of the main component of the CM samples, the cutin matrix (Matas et al., 2004b). Accordingly, the transition temperature was lowered when humidity increased, and a transition was hardly apparent when isolated CM samples were totally submerged (seen in Fig. 5 for E as function of temperature and RH). In addition, isolated tomato fruit CM can sorb variable amounts of water as a function of the water activity or relative humidity (Luque et al., 1995). The plasticizing effect in polymer science can be described in terms of lowering the fracture strength, elastic modulus, and viscosity of the biopolymer–water mixtures with an increase in plasticizer content. The plasticizing effect of water may be due to the weakening of hydrogen bonds and other intermolecular interactions within the matrix by the shielding of these (mainly attractive) forces by water molecules. In other words, the results presented here suggest that hydration of CM would be an essential source of CM plasticity. This interpretation agrees well with the description by Round et al. (2000) of the nanomechanics of isolated cutin of tomato fruits using atomic force microscopy.

In summary, hydration and temperature have important effects on the stiffness and strength of tomato CM. Furthermore, although there is no a priori theoretical relationship between E and σ_{max} , our results show that stiffness and strength are linearly related. Considering that stiffness and strength in a composite biomaterial, like tomato fruit CM, depend on the biomaterial components (mainly cutin and polysaccharides in tomato fruit CM) and on the structural relation between those components, the empirical correlation observed here between stiffness and strength would indicate the effect of water and temperature on the structural relation of CM components. Further studies are necessary to elucidate which are the structural bases of the mechanical behavior of the CM and how the structural arrangement between those components are modified or changed by the effect of water content and temperature.

Maximum elongation before breaking was constant at the wide range of temperature and RH tested. In this case, the energy absorbed by the material before breaking was proportional to the stress applied to break the sample. Considering the case of a tomato fruit, the relaxation of internal pressure due to CM elongation would be similar in different environmental conditions, so that the breaking of the fruit CM will depend only on the stiffness of the material and on internal pressure.

The results of the research described here can be related to experimental observations of two of the main environmental factors associated with cracking of tomato fruit: the presence of water in the form of rain (high RH) or water condensed on the skin of the fruit, and high fruit temperature, either because of elevated air temperature or because of direct exposure of the fruit to sunlight (Emmons and Scott, 1997). Thus, data presented in this paper helps us to understand the economically important and complex physiological phenomenon of fruit cracking. From a more biophysical point of view, the elastic and viscoelastic properties of isolated CM remain to be elucidated at the molecular level. Nevertheless, as our work demonstrates, the combined effect of hydration and temperature

seems critical in explaining the biomechanics of tomato fruit CM, providing the bases of a possible model to explain fruit CM cracking.

LITERATURE CITED

- ALONI, B., L. KARNI, I. RYLSKI, Y. COHEN, Y. LEE, M. FUCHS, S. MORESHET, AND C. YAO. 1998. Cuticular cracking in pepper fruit. I. Effects of night temperature and humidity. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73: 743–749.
- ANDREWS, J., S. R. ADAMS, K. S. BURTON, AND R. N. EDMONDSON. 2002. Partial purification of tomato fruit peroxidase and its effect on the mechanical properties of tomato fruit skin. *Journal of Experimental Botany* 53: 2393–2399.
- BATAL, K. M., J. L. WEIGLE, AND D. C. FOLEY. 1970. Relation of stress-strain properties of tomato skin to cracking of tomato fruit. *Hortscience* 5: 223–224.
- DESMET, M., J. LAMMERTYN, N. SCHEERLINCK, B. E. VERLINDEN, AND B. M. NICOLAI. 2003. Determination of puncture injury susceptibility of tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 27: 293–303.
- EMMONS, C. L. W., AND J. W. SCOTT. 1997. Environmental and physiological effects on cuticle cracking in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 797–801.
- GEORGET, D. M. R., A. C. SMITH, AND K. W. WALDRON. 2001. Effect of ripening on the mechanical properties of Portuguese and Spanish varieties of olive (*Olea europaea* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 448–454.
- HEREDIA, A. 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1620: 1–7.
- HERSHKO, V., H. D. RABINOWITZ, AND A. NUSSINOVITZ. 1994. Tensile characteristics of ripe tomato skin. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 27: 386–389.
- HOLE, C. C., R. L. K. DREW, AND D. GRAY. 2000. Humidity and mechanical properties of onion skins. *Postharvest Biology and Technology* 19: 229–237.
- KERSTIENS, G. 1996. Plant cuticles: an integrated functional approach. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.
- KÖHLER, L. 2000. Biphasic mechanical behaviour of plant tissues. *Materials Science and Engineering C* 11: 51–56.
- KUTSCHERA, U., AND P. SCHOPFER. 1986. Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleoptiles. *Planta* 167: 527–535.
- KOLATTUKUDY, P. E. 2001. Polyesters in higher plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 71: 1–49.
- LUQUE, P., R. GAVARA, AND A. HEREDIA. 1995. A study of the hydration process of isolated cuticular membranes. *New Phytologist* 129: 283–288.
- MATAS, A. J., E. D. COBB, J. A. BARTSCH, D. J. PAOLILLO JR., AND K. J. NIKLAS. 2004a. Biomechanics and anatomy of *Lycopersicon esculentum* Mill. fruit peels and enzyme-treated samples. *American Journal of Botany* 91: 352–360.
- MATAS, A. J., J. CUARTERO, AND A. HEREDIA. 2004b. Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticles. *Thermochimica Acta* 409: 165–168.
- MILES, J. A., R. B. FRIDLEY, AND C. LORENZEN. 1969. Strength characteristic of tomatoes subjected to quasistatic loading. *Transactions of the ASAE* 12: 627–630.
- MURASE, H., AND G. E. MERVA. 1977. Static elastic modulus of tomato epidermis as affected by water potential. *Transactions of the ASAE* 20: 594–597.
- NIKLAS, K. J. 1992. Plant biomechanics. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- PEET, M. M. 1992. Fruit cracking in tomato. *HortTechnology* 2: 216–223.
- PETRAČEK, P. D., AND M. J. BUKOVAC. 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiology* 109: 675–679.
- RIEDERER, M., AND L. SCHREIBER. 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* 52: 2023–2032.
- ROUND, A. N., B. YAN, S. DANG, R. ESTEPHAN, R. E. STARK, AND J. D. BATTEAS. 2000. The influence of water on the nanomechanical behavior of the plant biopolyester cutin as studied by AFM and solid-state NMR. *Biophysical Journal* 79: 2761–2767.
- SESKE, L. 1995. Fruit cracking in sweet cherries (*Prunus-Avium* L.): some physiological aspects—a mini review. *Scientia Horticulturae* 63: 135–141.
- THOMPSON, D. S. 2001. Extensimetric determination of the rheological properties of the epidermis of growing tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 52: 1291–1301.
- VOISEY, P. W., L. H. LYALL, AND M. KLOEK. 1970. Tomato skin strength—its measurement and relation to cracking. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 95: 485–488.
- WIEDEMANN, P., AND C. NEINHUIS. 1998. Biomechanics of isolated plant cuticles. *Botanica Acta* 111: 28–34.
- YOUNG, P. A. 1947. Cuticle cracks in tomato fruits. *Phytopathology* 37: 143–145.



"...it is impossible for anyone to study plants without an elevation of thought, a refinement of taste, and an increased love of nature."

B. S. Williams, 1868.

