



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**“BIOMECÁNICA DE LA EPIDERMIS Y LA CUTÍCULA
DEL FRUTO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) Y SU
RELACIÓN CON EL AGRIETADO”**

Gloria María López Casado

Málaga, Julio de 2006



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**“BIOMECÁNICA DE LA EPIDERMIS Y LA CUTÍCULA
DEL FRUTO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) Y SU
RELACIÓN CON EL AGRIETADO”**

Memoria presentada por la Licenciada
en Biología Gloria María López
Casado para optar al grado de Doctor,

Málaga, Julio de 2006



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
Y BIOQUÍMICA



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL "LA MAYORA"

ANTONIO HEREDIA BAYONA, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y JESÚS CUARTERO ZUECO, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en la Estación Experimental "La Mayora", directores del trabajo realizado por la Licenciada en Biología GLORIA MARÍA LÓPEZ CASADO

CERTIFICAN: que la Memoria titulada "BIOMECÁNICA DE LA EPIDERMIS Y LA CUTÍCULA DEL FRUTO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) Y SU RELACIÓN CON EL AGRIETADO" que presenta la Licenciada GLORIA MARÍA LÓPEZ CASADO 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 10 de julio de dos mil seis.



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: “BIOMECÁNICA DE LA EPIDERMIS Y LA CUTÍCULA DEL FRUTO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) Y SU RELACIÓN CON EL AGRIETADO” que presenta D. GLORIA MARÍA LÓPEZ CASADO para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores D. Antonio Heredia Bayona, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y D. Jesús Cuartero Zueco, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en la Estación Experimental “La Mayora”.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente en Málaga a 10 de julio de dos mil seis.

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el Contrato nº: 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”.

AGRADECIMIENTOS

Durante este período he tenido la suerte de conocer a mucha gente que ha contribuido a sacar este trabajo adelante. Todo este tiempo me ha ayudado a formarme y madurar en el plano personal. En este sentido quiero agradecer a mis directores de tesis el apostar por mí y darme esta oportunidad única. Al Dr. Antonio Heredia por sus consejos a tiempo y su paciencia y mostrar siempre su preocupación para que todo fuera bien. Al Dr. Jesús Cuartero por su sentido práctico, por confiar en mi trabajo y ayudarme a pensar. Gracias sinceramente.

A mis compañeros del laboratorio, empezando por Jose, buena persona y compañero de trabajo, a Chelo por su simpatía, a Ale por enseñarme a que hay que saber reírse incluso en los momentos de apuro, a Yasmina por la alegría transmitida en el tiempo que estuvo con nosotros, a Amador por hacerme ver la biomecánica desde otro punto de perspectiva, y a Antonio, por ser un referente en este trabajo, solventar los desastres informáticos de última hora, y como no, por su apoyo constante. Gracias también a Rafa Cameselle por sus consejos prácticos, a los compañeros que pertenecen y pertenecieron al vvlab por los momentos compartidos y a todo el personal del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica en el cual he realizado esta tesis.

Al personal de la Mayora, en especial a Miguel Ángel y Gonzalo por criar y cuidar de nuestros tomatitos, y echarme una buena mano en el invernadero. A Merce, Fali y Eva por su ayuda y consejos. A Tomas Soria por su tiempo dedicado a los sensores. A Antonio Reina, Tere, Carmen y Jero por esos desayunos en la Caleta y a Juanma por su incondicional ayuda en la búsqueda de artículos.

A Jerónimo en representación de Cajamar, por su contribución, disposición e interés mostrado en este proyecto.

Al personal del SCAI, lugar donde he pasado gran parte del tiempo. A Manolo y Salva en análisis de imagen, por su amabilidad y disposición para resolver cualquier duda. A Goyo y David en el servicio de microscopía por su interés mostrado para sacarle el mayor partido a cada muestra.

En el área de Fisiología Vegetal, me gustaría dar las gracias a Miguel Ángel Quesada por su disponibilidad y sus consejos, a Nieves por ayudarme y prestarme temporalmente su lado de la poyata, A Rafa Sesmero por compartir su herramienta de trabajo y a todos los del grupo por los momentos de fiesterilla.

A todos los compañeros y amigos con los que he compartido esos clásicos desayunos en el bar de la facultad y alguna que otra tarde de tetería. A Yoli y Sonia por ser buenas amigas y darme siempre ánimos, a Aure y Abel por sus momentos de charla, a Sonia Osorio por su naturalidad, a María José con quién siempre hay tiempo para intentar arreglar el mundo con un café por delante, a Pablo por entendernos en cierto modo, a los compañeros de quifi de a cuarta planta, Rosa, Silvia y Dani, y a Lore y Ricardo por cuidarme y ofrecerme su cariño.

A las niñas de mi promoción, con las que me reúno de tarde en tarde para comentar nuestros trabajos de tesis delante siempre de una buena cena.

A mis padres por dejarme elegir mi camino, cuidarme, respetarme y darme su apoyo incondicional en todo momento, y a mi hermana por acompañarme de un modo especial en esta última etapa del trabajo.

*Dedicado a mi familia
y a Antonio,
con todo mi cariño*

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Origen del cultivo del tomate</i>	2
<i>Descripción botánica de la especie</i>	3
<i>Taxonomía del tomate</i>	4
<i>Importancia económica del tomate</i>	6
<i>Agrietado del fruto</i>	7
Importancia económica del agrietado del tomate	8
Tipos de agrietado	8
Evaluación del agrietado	9
Factores que influyen en el agrietado	10
<i>Salinidad</i>	16
Problemática de la salinidad del agua y limitación de las áreas de cultivo.	16
Efecto de la salinidad en la fisiología de la planta	16
Efecto de la salinidad en la producción del fruto	17
Tolerancia a la salinidad	18
Calidad interna y externa del fruto	19
Salinidad y agrietado del fruto	20
<i>Maduración del fruto</i>	21
Cambios en el fruto	21
Cambios en la pared celular	21
Cambios en la cutícula	24
<i>Tejidos del fruto: su papel en el agrietado</i>	25
Pericarpo	25
Exocarpo	26
<i>La Cutícula</i>	29
Papel de la cutícula en la planta	30
Estructura y composición	31
Biosíntesis	33
Propiedades	34
Métodos de estudio en base a la composición y ultraestructura de la cutícula	38
OBJETIVOS	40

MATERIALES Y MÉTODOS	42
<i>Instalaciones</i>	43
<i>Material Vegetal</i>	44
<i>Labores culturales</i>	45
<i>Descripción de los estadios de maduración muestreados</i>	47
<i>Curvas de crecimiento</i>	48
<i>Evaluación del porcentaje de agrietado poscosecha y peso medio del fruto</i>	49
<i>Inducción de agrietado por inmersión</i>	50
<i>Estudio de las fluctuaciones diarias de crecimiento del fruto</i>	51
<i>Aislamiento de cutículas</i>	52
<i>Determinación del peso específico</i>	53
<i>Datos climatológicos</i>	53
<i>Estudio morfológico</i>	53
<i>Estudio de las propiedades mecánicas</i>	57
<i>Método de eliminación de polisacáridos presentes en las cutículas aisladas</i>	67
<i>Estudio de polisacáridos asociados a la cutícula</i>	67
CAPITULO - I	71
RESULTADOS - I	72
<i>Efecto de variables ambientales sobre el porcentaje de agrietado, las características morfológicas y propiedades mecánicas de la epidermis de frutos de tomate</i>	73
<i>Caracterización de los cultivares estudiados en condiciones testigo</i>	73
Evaluación de campo	73
Estudio morfológico de la piel del fruto en estadio verde maduro y rojo maduro	82
Estudio de las propiedades mecánicas de epidermis y cutícula de frutos de tomate en estadios verde maduro y rojo maduro	85
<i>Caracterización de los cultivares estudiados bajo condiciones salinas</i>	91
Evaluación de campo	91
Estudio morfológico de la piel del fruto en estadio rojo maduro bajo tratamiento salino	92
Estudio de las propiedades mecánicas de epidermis de frutos de tomate en estadio rojo maduro bajo tratamiento salino	94
<i>Influencia de la temperatura, humedad relativa y radiación sobre características de la cutícula</i>	97

DISCUSIÓN - I	99
<i>Caracterización de los cultivares estudiados en condiciones testigo</i>	100
Evaluación de campo	100
Estudio morfológico de la piel del fruto en estadio verde maduro y rojo maduro	104
Estudio de las propiedades mecánicas de epidermis y cutícula de frutos de tomate en estadios verde maduro y rojo maduro	106
<i>Caracterización de los cultivares estudiados bajo condiciones salinas</i>	108
Evaluación de campo	108
Estudio morfológico de la piel del fruto en estadio rojo maduro bajo tratamiento salino	110
Estudio de las propiedades mecánicas de epidermis de frutos de tomate en estadio rojo maduro bajo tratamiento salino	111
<i>Influencia de la temperatura, humedad relativa y radiación sobre características de la cutícula</i>	112
 CAPITULO - II	 113
 RESULTADOS - II	 114
<i>Papel de los componentes de la cutícula en sus propiedades mecánicas</i>	115
Fraccionamiento de cutícula. Separación de cutina y polisacáridos	115
Comparación entre las propiedades mecánicas de la cutícula y de la cutina de frutos rojo maduro	117
Comparación de las propiedades mecánicas de la cutícula y de la cutina de frutos verde maduros	126
Comparación de las propiedades mecánicas de cutícula y cutina procedentes de frutos VM y RM	131
Estudio de los polisacáridos presentes en la cutícula del fruto	133
 DISCUSIÓN - II	 140
<i>Propiedades mecánicas de la cutícula del fruto de tomate</i>	141
<i>Propiedades mecánicas de la cutina del fruto de tomate</i>	145
<i>Papel de los polisacáridos asociados a la cutícula</i>	147
<i>Integración de polisacáridos y cutina</i>	149
 CONCLUSIONES	 151
 BIBLIOGRAFÍA	 154

INTRODUCCIÓN

Origen del cultivo del tomate

El origen del tomate 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 *S. lycopersicum* 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.

Descripción botánica de la especie

El tomate cultivado, *Solanum lycopersicum* L., 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 folíolos. 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 tomate.

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 *Solanum* L., el cual, en cuanto a número de especies, es relativamente 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 Solanoidae. El carácter más importante de la subfamilia Solanoidae, es que todos sus miembros poseen una gran uniformidad en el número cromosómico ($2n=24$). Dentro de la subfamilia Solanoidae se agrupan dos géneros que 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).

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*, denominando al tomate *Solanum lycopersicum*. Durante mucho tiempo se ha aceptado *Lycopersicon*, tal y como lo definió Miller en 1754, reconociéndose un total de nueve especies.

Recientemente, ha sido propuesto un cambio en la nomenclatura del género *Lycopersicon* por la cual *Lycopersicon esculentum* Mill. pasa a denominarse *Solanum lycopersium* L., (Peralta y col., 2005), tal y como se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Lista de especies de *Solanum* sección *Lycopersicon*, con los equivalentes en el género previamente reconocido *Lycopersicon*, que ahora forma parte del género monofilético *Solanum*.

Nombre en <i>Solanum</i>	Equivalente <i>Lycopersicon</i>	Distribución; hábitat
<i>S. arcanum</i> Peralta	Part of <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller	N Perú, costa y valles interiores de los Andes; lomas, valles secos y pendientes de roca secos; 100 a 2800 m.
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>L. cheesmaniae</i> L. Riley (incorrectly published as <i>cheesmanii</i>)	Endémica de las Islas Galápagos, Ecuador; gran variedad de hábitats; desde nivel del mar hasta los 500 m.
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> Dunal	S Perú (Tacna) hasta N Chile (Región II); en planicies rocosas muy áridas y costas desérticas; desde nivel del mar hasta los 3250 m.
<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>L. chmeilewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	S Perú (Apurímac) hasta N Bolivia (La Paz); valles andinos elevados y secos; 1600–3200 m.
<i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr.	Part of <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller; also known as <i>L. glandulosum</i> C.F. Mull.	Centro hasta S. Perú, pendientes de poniente en los Andes; desfiladeros y pendientes rocosas; (40)200–3300m.
<i>S. galapagense</i> S. Darwin & Peralta	Part of <i>L. cheesmaniae</i> L. Riley (previously known as forma or var. <i>minor</i>)	Endémica de las Islas Galápagos; mayoría en costas de lava volcánica hasta un metro del nivel de marea alta en zona de salpicaduras marinas, pero también ocasionalmente tierra adentro.; nivel del mar hasta 50 m.
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D.M. Spooner	<i>L. hirsutum</i> Dunal	Ecuador central hasta Perú central, pendientes de poniente en los Andes; en una variedad de bosques desde pre-montaña hasta bosques secos; (40)200–3300 m.
<i>S. huaylasense</i> Peralta	Part of <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller	N Perú (Ancash); pendientes rocosas del Callejón de Huaylas a lo largo del Río Santa y en la desembocadura adyacente del Río Fortaleza; (940)1700–3000 m.
<i>S. lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> Miller	Conocido tan solo como cultivo o asilvestrado; global en gran variedad de hábitats, muchos de los esmany asilvestrado presentan frutos pequeños (“ <i>cerasiforme</i> ”); nivel del mar hasta 4000 m.
<i>S. neorickii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>L. parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	S Ecuador (Azuay) hasta S Perú (Apurímac); valles secos interiores de los Andes, en ocasiones en pedregales y cunetas; (920)1950–2600 m.
<i>S. pennellii</i> Correll	<i>L. pennellii</i> (Correll) D’Arcy	N Peru (Piura) hasta N Chile (Tarapacá); zonas arenosas y rocosas secas de las colinas; nivel del mar hasta 2300 m.
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller	Ecuador central hasta Chile central; costas secas; 0–500 m, ocasionalmente hasta los 1400 m.

Importancia económica del fruto

En la actualidad el tomate es un producto básico de la horticultura española y tiene gran importancia a escala mundial. En 2005 se cultivaron 4550 miles de hectáreas en todo el mundo, con una producción total de 125015 miles de toneladas (FAO, 2006). 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, dedicando una superficie de cultivo de 70.400 hectáreas y obteniendo una producción total de 4473 miles de toneladas. El principal destino del producto exportado es el resto de países europeos, tanto como producto de consumo en fresco como tomate procesado.

Actualmente se cultivan varios cientos de cultivares e híbridos de tomate que se han ido desarrollando como respuesta a la diversidad de la demanda que presenta el mercado (Leonardi y col., 1996). Así, los cultivares de tomate para consumo en fresco que se cultivan actualmente, presentan grandes diferencias de tamaño (desde unos pocos hasta cientos de gramos), forma (achatado, redondeado, alargado, en forma de pera) y color (desde el amarillo hasta el rojo oscuro). 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 a su calidad las que representan un mayor problema para 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.

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. En la Fig. 1.1 puede observarse un fruto de tomate que presenta agrietado radial después de ser recolectado.



Figura 1.1: Imagen de un fruto de tomate tipo cereza del cultivar susceptible al agrietado Gardeners Delight que presentan agrietado radial.

• **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 cobró 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 %.

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. 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 presencia tarrinas con frutos agrietados y, además de no comprarlas, percibe una falta de calidad en la marca comercializadora.

• **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. 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.

● 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 este tipo de tomate debido a su carácter de ser producto demandado por su calidad, el perjuicio económico sería mayor. Finalmente, el agrietado se produce en pericarpo 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 y col., 1981) como a factores ambientales (Young, 1947; Emmons y Scott, 1997) y que cultivares con diferente susceptibilidad al agrietado muestran 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 Richarson, 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 indican 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 describen 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 produzca 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, 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 y col., 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. Dado que en este trabajo se estudia el efecto de soluciones salinas o con alta conductividad eléctrica en la incidencia de agrietado de los cultivares caracterizados, se describe más adelante en qué modo puede afectar la salinidad al desarrollo de la planta y del fruto.

No solo el empleo de NaCl en la solución de riego tiene un efecto de disminución en el agrietado del fruto de tomate. La adición de un suplemento de calcio (Ca) podría prevenir el agrietado radial del fruto de tomate (Simon, 1978) o reducir el agrietado cuticular (Dorais y col., 2001; Ehret y Ho, 1986). 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 hecho de 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). Por otro lado, la aplicación foliar o en el sustrato de boro (B) reduce el agrietado radial y concéntrico del fruto de tomate (Davis y col., 2003). La combinación de Calcio y Boro aplicada como spray foliar reduce la incidencia (20%) y severidad (50%) del agrietado de la cutícula del fruto de tomate (Dorais y col., 2001). El boro parece jugar un papel en la prevención del agrietado cherry a través de su influencia en la elasticidad de la pared celular de la piel del fruto (Powers y Bollen, 1947). El calcio aplicado a la superficie del fruto puede penetrar solo cuando la humedad está presente la superficie del fruto (Huang y col., 2004). La nutrición de calcio ha sido asociada en algunos casos con una reducción en la formación de macrogrietas en el fruto de tomate, pero no es siempre efectiva (Dickinson y MaCollum, 1964).

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, dado que 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 consensuado 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 o epidermis, pues es esta compleja estructura la que en último término sufre la formación de la fractura, siendo muchos los autores que han sugerido su importancia (Peet, 1992; Ohta y col., 1997; Aloni y col., 1998).

Efecto de la epidermis del fruto

El papel de la epidermis 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 del fruto por el hinchamiento asociado al incremento en el diámetro ecuatorial o transversal, 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, le dan un papel más relevante porque 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 epidermis del fruto con la susceptibilidad al agrietado (Miles y col., 1969; Voisey y col., 1970).

Salinidad

• Problemática de la salinidad del agua y limitación de las áreas de cultivo

La salinidad del agua empleada para regadío es un problema presente en gran parte de las áreas de cultivo de todo el mundo; un gran esfuerzo ha sido desarrollado para entender los aspectos fisiológicos relacionados con la tolerancia a la salinidad en plantas, como base para la selección y desarrollo de genotipos tolerantes a la salinidad (Cuartero y col., 2006).

Actualmente se vienen aplicando técnicas culturales en el cultivo del tomate para paliar los efectos dañinos de la salinidad, tales como el tratamiento en los semilleros con sal o la reducción del agua para favorecer la posterior adaptación de las plantas adultas a la salinidad; la aplicación de nebulización sobre las plantas para mejorar el crecimiento vegetativo y la producción en condiciones salinas y la práctica de injertos (Cuartero y col., 2006).

• Efecto de la salinidad en la fisiología de la planta

La salinidad en el sustrato o en agua de riego restringe la disponibilidad de agua a las plantas de forma similar al estrés hídrico, causando una reducción en la tasa de crecimiento del fruto e incluso en la producción (Munns, 2002) y alterando las relaciones hídricas de la planta (Romero-Aranda y col., 2000). Niveles altos de salinidad disminuyen el potencial hídrico de la planta, la cual reduce el flujo de agua hacia el fruto y la tasa de expansión del mismo (Ehret y Ho, 1986; Johnson y col., 1992). Sin embargo, esta reducción en la toma de agua está contrarrestada por una reducción en la tasa de transpiración y ajuste del potencial osmótico (Krauss y col., 2006). La firmeza del fruto parece incrementar con la salinidad (Petersen y col., 1998; Auerswald y col., 1999), aunque esto depende también del cultivar.

El efecto de la sal puede verse agravado por las condiciones ambientales. La aplicación de agua salina durante el día o en cultivo de primavera o verano causa reducciones más serias en la producción que durante la noche o en cultivo de otoño (van Ieperen, 1996; Stanghellini, 1994; Li y col., 2001) dado que altos niveles de temperatura y radiación y bajos niveles de humedad relativa en época de verano disminuyen el

potencial hídrico de la planta induciendo una transpiración más rápida (Johnson y col., 1992). Por otro lado, el cultivo de las plantas a bajas temperaturas y alta humedad relativa implica un déficit de agua más bajo que en condiciones de verano y los efectos dañinos de la sal son moderados (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999).

El transporte de agua vía floema supone normalmente un 80% del total del transporte de agua, y en condiciones de estrés salino hasta el 90%. La concentración de compuestos orgánicos en floema incrementa un 40% en condiciones salinas. La tasa de iones transportados por el xilema incrementa con la salinidad de forma significativa, pero su contribución al ajuste osmótico del fruto es menor (Plaut y col., 2004).

La reducción de la toma de agua por la planta bajo condiciones salinas podría estar relacionada con una reducción en parámetros morfológicos y/o fisiológicos tales como el área foliar, la densidad estomática y el cierre estomático (Romero-Aranda y col., 2001). Por otro lado se sabe que el peso seco (Saranga y col., 1993; Cruz y col., 1990) y la producción de fruto (Bolarín y col., 1991) de tomate se reducen en proporción al incremento de salinidad en la solución de riego. Algunos autores apuntan por tanto que el peso seco de la parte vegetativa de la planta sería un buen indicador de la toma de agua por parte de la planta en condiciones salinas (Reina-Sánchez y col., 2005).

Sabiendo por tanto que la toma de agua por parte de las plantas de tomate disminuye según incrementa la concentración de sal en el agua de riego, un ajuste en la conductividad eléctrica de la solución nutritiva permitiría a los productores de tomate bajo invernadero modificar la disponibilidad de agua, abriendo la posibilidad de ahorrar agua y reducir la carga de sal en el sustrato (Soria y Cuartero, 1997).

• **Efecto de la salinidad en la producción del fruto**

En tomate, la reducción de la producción por efecto de la salinidad está principalmente causada por una disminución en el flujo de agua hacia el fruto (Ehret y Ho, 1986), combinado con un acortamiento del periodo de crecimiento el fruto (Mizrahi, 1982). El efecto de la salinidad en la producción de fruto de tomate es debido generalmente a una disminución en el tamaño del fruto más que en el número de frutos

(Ehret y Ho, 1986; Adams, 1991;; Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Chretien y col., 2000; Dorais y col., 2001; Plaut, 2004). No todas las variedades reducen su tamaño de fruto en la misma proporción bajo condiciones salinas. En general, cuanto más pequeño es el fruto, menos importante es la reducción en peso bajo condiciones de salinidad moderada (Cruz, 1990). A bajos niveles de conductividad eléctrica (CE) de la solución de riego, la reducción en la producción es causada principalmente por reducción en el peso medio del fruto. Así, algunos autores han constatado que una conductividad eléctrica entre 4.6-8 mScm⁻¹ reduce la producción mediante una reducción en el tamaño del fruto, mientras que una CE de 12 mScm⁻¹ reduce tanto el tamaño como el número de frutos (Gormley y Maher, 1990; Adams, 1991).

Dado que el agua representa más del 92% del peso del fruto, la disminución en tamaño puede principalmente estar adscrita a una disminución en la acumulación de agua en el mismo. El incremento en la concentración de soluto en frutos expuestos a salinidad puede ser meramente un resultado de la disminución del agua transportada (Ehret y Ho, 1986). Sin embargo, las células vegetales tienen la capacidad, conocida como ajuste osmótico, de mantener la presión de turgencia. Este ajuste implica la acumulación de solutos en la célula, principalmente solutos compatibles, azúcares o aminoácidos en el citoplasma, y solutos inorgánicos en la vacuola (Kramer y Boyer, 1995), lo cual explicaría el aumento de azúcares en el fruto y la mayor turgencia de las células.

• Tolerancia a la salinidad

La capacidad de acumulación de Na⁺ en las hojas y de extrusión en la raíz es uno de los factores que marca la diferencia en cuanto a la tolerancia a salinidad entre distintos cultivares (An y col., 2005). Tanto el agua como los nutrientes son esenciales para el crecimiento, mientras que la alta concentración de Na⁺ es tóxica. Algunos autores plantean que la tolerancia a la salinidad podría estar relacionada con la capacidad de absorber agua y nutrientes rechazando el Na⁺ (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999). Las plantas de tomate absorben solo una pequeña proporción de Na⁺ de la solución nutritiva, que parece ser independiente de la concentración en la que se encuentre en la solución. Las diferencias en cuanto a la tolerancia a la salinidad se manifiestan tanto a nivel de especies como entre distintos cultivares, dentro de una

misma especie (Cruz y col., 1990; Bolarín y col., 1991; Romero-Aranda y col., 2001; Reina-Sánchez y col., 2005). La tolerancia de la planta depende también del estadio de desarrollo de la planta, por lo que para caracterizar la tolerancia deberían ser fenotipadas a distintas concentraciones de salinidad y en el estadio más sensible (Cuartero y col., 2006).

Se han desarrollado plantas transgénicas tolerantes a salinidad que acumulan sal en la hoja fundamentalmente pero no en fruto (o se acumula en muy poca cantidad). Tales plantas son capaces de crecer en ambientes con 200 mM NaCl debido a una sobreexpresión de un antiporte Na^+/H^+ de vacuola, permitiendo el crecimiento, floración y producción de frutos con normalidad (Zhang y Blumwald, 2001).

Durante más de 12 años, se han venido desarrollando análisis mediante QTL con el objetivo de entender la genética de la tolerancia a la salinidad. Dado que la salinidad es variable tanto en espacio como en tiempo, el diseño experimental debe permitir un estudio de la interacción genotipo-ambiente. Algunos autores plantean la necesidad de una selección asistida por marcadores, dada la cantidad de genes implicados, para combinar la tolerancia a la salinidad con los caracteres que demanda el mercado (Cuartero y col., 2006).

La salinidad afecta a todas las dicotiledóneas. La planta de tomate se emplea como modelo de estudio para probar las posibilidades de selección asistida por marcadores y la introducción de genes para transformación, dado que su genética está mejor conocida que la de otros cultivos de dicotiledóneas y puede ser transformada por distintos métodos. Al mismo tiempo, la fisiología del tomate en condiciones salinas y no salinas ha sido ampliamente estudiada (Cuartero y col., 2006).

• **Calidad interna y externa del fruto**

Son varios los estudios que han mostrado que un incremento en la conductividad eléctrica de la solución nutritiva en las plantas de tomate mejora la calidad interna y externa del fruto (Stevens, 1979; Mizrahi, 1982; Hobson, 1988; Mizrahi y col., 1988; Mitchell y col., 1991; Cornisa, 1992). Bajo tales condiciones, los frutos de tomate generalmente presentan mejores condiciones organolépticas y propiedades

nutricionales, una cutícula más gruesa y resistente, una presión de turgencia menor (Verveke y Schols, 1992) y, como consecuencia, una reducción en la firmeza (Verveke y col., 1991) y una baja susceptibilidad al agrietado del fruto (Sonnevelend y Van der Burg, 1991).

La salinidad potencia por tanto el sabor del fruto de tomate incrementando el contenido en azúcares y ácidos, mientras que caracteres como la vida media del fruto y la firmeza varían ligeramente. Algunas características como contenido en sólidos solubles, azúcares, acidez y pH son importantes parámetros de calidad para el mercado en fresco y procesado de tomate; otras características tales como sabor y el tiempo máximo para el almacenado son más importantes solo para el caso del mercado de fruto entero (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999).

Algunos autores proponen la salinidad como método alternativo para mejorar la calidad del fruto, debido a cambios en la demanda del mercado y del consumidor (Krauss y col., 2006). Sin embargo esta mejora en la calidad del fruto debería compensar no sólo la reducción en la producción sino también las pérdidas debido al desarrollo de patologías tales como “Blossom End Root” (BER); la incidencia de BER incrementa con la salinidad aunque el patrón de incremento depende del cultivar (Reina-Sánchez y col., 2005). En cualquier caso, la producción final bajo condiciones salinas debe ser suficiente para cubrir las expectativas del cultivo y rendir beneficios para el productor (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999).

• **Salinidad y agrietado del fruto**

La reducción en la disponibilidad de agua bajo condiciones salinas es aprovechada por algunos autores para disminuir la incidencia de agrietado en los frutos. El agrietado está asociado con una disminución en la elasticidad de la epidermis en estadio verde maduro o pintón (Bakker, 1988) que causa la ruptura bajo una presión originada por un incremento en el flujo de agua hacia el fruto. De hecho, existen trabajos publicados en los que tras un periodo de regadío con alta salinidad en la solución, disminuyen la conductividad eléctrica y provocan un aumento en el número de frutos agrietados (Peet, 1992; Li y col., 2002). En este trabajo se estudia el efecto que ejerce la solución de riego salina o con alta conductividad eléctrica en la incidencia de

agrietado de dos cultivares con distinta susceptibilidad al agrietado, abordando también los cambios a nivel morfológico y en la respuesta mecánica de la cutícula y la epidermis.

Maduración del fruto

Durante el desarrollo del fruto pueden distinguirse dos etapas: una primera etapa donde el fruto crece y se expande manteniendo activo el proceso de división celular y una segunda fase en la que el fruto cesa el crecimiento y comienza a madurar, siendo el cambio de coloración de verde a rojo y la pérdida de turgencia algunos de los caracteres visuales más intuitivos en esta etapa. Este proceso de maduración afecta a todo el fruto en su conjunto, pudiendo producirse cambios en la textura y las propiedades organolépticas entre otras, determinados por el metabolismo que tiene lugar en cada tejido, y los cambios en la que se dan en la pared celular y en la cutícula del fruto.

• Cambios en el fruto

La maduración de frutos carnosos implica determinados procesos fisiológicos que favorecen la atracción de animales y promueven la dispersión de semillas, como son la producción de compuestos aromáticos y nutrientes, cambios en la coloración y reblandecimiento del fruto adquiriendo una textura más comestible (Giovannoni, 2001). El valor nutricional del fruto de tomate radica en la naturaleza de sus componentes entre los que se encuentran el folato, la vitamina C, el potasio y los carotenoides, en particular el licopeno (Beecher, 1998). Por otro lado, el tomate es un fruto climatérico dado que presenta un incremento en la tasa de respiración y en la biosíntesis de etileno durante la maduración. El etileno es necesario en este tipo de frutos para que tenga lugar la manifestación de cambios asociados a la maduración (Tucker y Brady, 1987; Yang, 1985).

• Cambios en la pared celular

Durante las últimas décadas, se han venido estudiando los mecanismos de reblandecimiento del fruto tomando el fruto de tomate como modelo de estudio del proceso de maduración de frutos climatéricos, debido en parte a su importancia como

especie cultivada (Giovannoni, 2001). Se sabe que la disminución de la firmeza del fruto coincide con la disolución de la lámina media, resultando en una reducción de la adhesión intercelular, despolimerización y solubilización de los polisacáridos pécticos y hemicelulósicos de la pared celular, y en algunos casos, hinchamiento de la pared. Estos eventos están acompañados por un incremento en la expresión de una serie de enzimas líticas de pared, incluyendo hidrolasas de polisacáridos, transglicolasas, liasas y proteínas como las expansinas (Rose y col., 2003).

Son varios los autores que recogen los distintos modelos propuestos en la literatura acerca de la estructura, expansión y degradación de la pared celular (Passioura, 1994, Rose y Bennett, 1999; Cosgrove, 2001). Así en 1973, Keegstra y colaboradores propusieron que la matriz de polímeros consistente en xiloglucanos (principales hemicelulosas presentes en frutos), polisacáridos pécticos y proteínas estructurales estarían covalentemente unidas formando una gran red macromolecular. En este modelo, la celulosa estaría unida a la matriz mediante puentes de hidrógeno con los xiloglucanos. Mas tarde, Fry en 1989 propuso que las microfibrillas de celulosa estarían unidas directamente a lo largo de las cadenas de xiloglucanos; de este modo, las hemicelulosas juegan un papel importante como organizadores de la arquitectura de la pared celular. Talbott y Ray (1922) propusieron un modelo alternativo en el que cada microfibrilla estaría revestida por una serie de capas de polisacáridos, y que la unión entre microfibrillas estaría hecha de forma indirecta mediante asociaciones laterales no covalentes entre las distintas capas de polisacáridos. Jarvis y colaboradores (1997) propusieron un modelo de pared más estratificado en el que las capas de pectinas servirían como espaciadores entre la lamela celulosa-hemicelulosa, controlando el grosor de pared y permitiendo el deslizamiento entre las capas de celulosa y hemicelulosa, las cuales podrían estar implicadas en el control de expansión de la pared.

Todos estos modelos estructurales pueden dar lugar a controversia en algunos aspectos, pero coinciden en entender la estructura de la pared celular como un núcleo de microfibrillas de celulosa embebidas en dos redes coextensivas de pectinas y hemicelulosas (Carpita y Gibeaut, 1993), donde la red celulosa-xiloglucano es diana de distintas actividades enzimáticas implicadas en la expansión celular y maduración del fruto (Rose y Bennett, 1999). La despolimerización de xiloglucanos estrechamente

unidos a la superficie de celulosa, es una de las primeras evidencias del desensamblamiento asociado a la pared celular durante la maduración.

Durante el periodo de maduración del fruto, tienen lugar la expresión de una serie de enzimas encargadas de los procesos de degradación de la pared celular. Enzimas como la pectinmetilesterasa, poligalacturonasa, celulasa (Seymour y col., 1990; Seymour y col., 1987) son responsables de la degradación parcial de polisacáridos como pectinas, hemicelulosas y celulosa, los cuales son constituyentes principales de la pared celular de fruto de tomate (Reinders y Thier, 1999). La actividad xiloglucano-endotransglicolasa muestra también una correlación con la tasa de crecimiento del fruto (Thompson y col., 1998) y las enzimas denominadas expansinas están también involucradas en el proceso de degradación de la pared (Moqueen-Mason, y col., 1992) y con efecto importante en el fruto de tomate (Rose y col., 2003).

Por otro lado, la maduración está asociada con cambios en las propiedades mecánicas de la pared celular, como consecuencia de las actividades de determinadas enzimas hidrolíticas que modifican su estructura (Hobson, 1965; Rose y col., 2003; Huang y col., 2005), confiriéndole un aumento en la rigidez de la misma. La actividad de las enzimas peroxidasa y poligalacturonasa ha sido correlacionada con este cambio en el comportamiento mecánico de las paredes celulares durante la maduración del fruto. Ambas aportan rigidez a la piel del fruto. Por un lado, ensayos de compresión realizados con muestras de frutos de tomates de seis variedades diferentes mostraron que existía una correlación positiva entre la actividad poligalacturonasa y la firmeza del fruto (Hobson, 1965). Por otro lado, con respecto a la peroxidasa se le han atribuido funciones tales como la lignificación y suberización (Espelie y col., 1986; Roberts y col., 1988; Müsel y col., 1997; Quiroga y col., 2000), deposición de cutina en las capas de epidermis exteriores (Ferrer y col., 1991), defensa contra el ataque a patógenos (Lagrimini y col., 1993) y el posible entrecruzamiento de los componentes de la pared celular (Fry, 1986; Hatfield y col., 1999). Se han realizado estudios aplicando peroxidasa exógena al material en los que se demuestra el papel de esta enzima en el incremento de la rigidez de las paredes celulares durante la maduración del fruto de tomate. Mientras que la máxima extensibilidad del tejido no fue muy afectada por la aplicación de peroxidasa, la rigidez y la carga requerida para causar la deformación del tejido fue incrementada según la aplicación de peroxidasa. La peroxidasa, y en concreto

3 isoenzimas localizadas en la epidermis del fruto (Andrews y col., 2002a), media por tanto el incremento de la rigidez del tejido de exocarpo según el curso del crecimiento del fruto, restringiendo la expansión en frutos maduros y controlando el crecimiento (Andrews y col., 2002b).

• Cambios en la cutícula

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. 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 denominados compuestos hidrolizables sólo constituyen algo más de un 9% de la misma. Además, las ceras cuticulares también disminuían drásticamente su contenido pasando a ser menos del 5% del total. El incremento de los niveles de ácido *p*-cumárico y flavonoides totales como naringerina y calconaringerina en la cutícula del fruto de tomate durante la maduración han sido descritos por varios autores (Hunt y Baker, 1980; Baker y col., 1982; Luque y col., 1995a; Laguna y col., 1999). La estructura molecular del poliéster de la matriz de cutina cambia durante el proceso de maduración del fruto. Así, las cutículas aisladas de frutos de los estadios verde inmaduro y verde maduro presentan un grado de entrecruzamiento menor que en el estadio rojo maduro (Matas y col., 2004a). Algunos trabajos coinciden en que el contenido en fibras de celulosa asociadas a la cutícula incrementa durante el desarrollo del fruto, y que en el fruto de tomate la cantidad que constituye la pared celular es mayor en estadio rojo maduro con respecto al estado inmaduro (Baker y col., 1982; Jeffrey, 1996). Se ha documentado que, adicionalmente, el grosor de cutícula varía, aumentando durante la etapa de crecimiento

y disminuyendo durante el proceso de maduración. Además, parece ser que la cutícula del fruto adquiere rigidez también durante el proceso de maduración del fruto, mostrando más resistencia a la deformación (Bargel y Neinhuis, 2005).

En este sentido, es necesario conocer los tejidos que componen el fruto y cual es el papel que juegan cada uno de ellos en el agrietado. Para comprender el papel de la epidermis 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 realizados con pimiento, Aloni y colaboradores (1998) observaron que aquellos cultivares que presentaban con grosor de pericarpo mayor eran 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 producían sobre las células epidérmicas, la zona de menor espesor de cutícula, y no sobre las intercepciones de células adyacentes. Sus observaciones indicaron 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 fruto de tomate, 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, células epidérmicas 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 una capa de células epidérmicas situada en la parte más 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. 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).

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 (Pagaldy 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 poligalacturonasa (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 la cutícula del fruto, situada en la parte más externa del exocarpo, 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). Es por tanto necesario profundizar en el estudio de la cutícula del fruto para poder entender la problemática del agrietado

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.

• **Papel de la cutícula en la planta**

Durante los últimos veinte años el conocimiento acerca de las funciones y propiedades de la cutícula vegetal ha progresado notablemente (Heredia y col., 1998). Debido a sus características y propiedades físicas, químicas, mecánicas y morfológicas, este complejo y singular biopolímero lleva a cabo a lo largo del desarrollo de la planta una serie de funciones de gran importancia. Desde que las plantas colonizaran el medio terrestre hace unos 400 millones de años, éstas han estado protegidas por esta barrera cumpliendo importantes funciones fisiológicas. Quizá la más conocida sea la relacionada con la pérdida de agua, esto es, el fenómeno de transpiración cuticular. En este sentido, la cutícula vegetal actúa como una eficaz barrera hidrofóbica protectora, minimizando al máximo la pérdida de agua por evapo-transpiración, y dejando que sean los estomas los encargados de regular firmemente este proceso (Kerstiens, 1996; Riederer y Schreiber, 2001). Debido también a su carácter impermeable al agua, la cutícula vegetal actúa como barrera frente a la pérdida de sustancias desde el interior celular. Como barrera física actúa además, impidiendo la penetración de patógenos y reflejando, especialmente debido a las ceras epicuticulares cristalinas, gran parte de la radiación solar ultravioleta tan dañina para los tejidos vivos (Kerstiens, 1996a, Kerstiens, 1996b). Más recientemente, ha sido descrita una nueva e importante función para la cutícula como es su función de manera indirecta en la correcta formación de los órganos en las primeras fases de desarrollo de la planta, ya que actúa impidiendo la adhesión indiferenciada de las células epidérmicas de los órganos en formación (Lolle y Pruitt, 1999). Asimismo la cutícula, junto a la pared celular de las células epidérmicas puede regular respuestas del desarrollo acumulando moléculas bioactivas importantes que actúan como señales del desarrollo vegetal (Osman et al., 1995; Mariano y Wolters, 2000; Kolattukudy, 2001).

• 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).

La cutina es el componente mayoritario (entre un 40 y un 80% en peso) de la cutícula vegetal aislada. Es 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). En la Figura 1.2 puede verse un esquema de la cutícula vegetal donde se indican sus distintos componentes.

La cutina es un material totalmente insoluble en disolventes orgánicos aunque tras despolimerizarse mediante una hidrólisis alcalina, transesterificaciones u otros métodos análogos, se obtiene una mezcla de monómeros y/o derivados, los cuales sí son solubles en dichos disolventes (Walton, 1990). 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-hidroxiocetadecanoico y 9,10,18-trihidroxiocetadecanoico son los más abundantes, aunque algunos derivados insaturados pueden estar presentes como componentes minoritarios de algunas cutinas (Heredia, 2003).

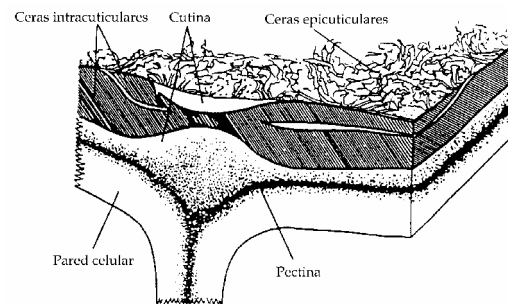


Figura 1.2: Esquema de un corte transversal de una cutícula vegetal mostrando los principales componentes que la constituyen tomado de Bukovac y col., (1981).

Hay que destacar que en la cutícula de algunas especies vegetales, tras la extracción de las ceras y la hidrólisis de la cutina, queda un material residual remanente denominado cután (Jeffre, 1996). Estudios llevados a cabo con cután aislado a partir de cutículas de hojas de *Agave americana* y *Clivia miniata*, (Villena y col., 1996; Villena y col., 1999) concluyen que el núcleo de este material insoluble y resistente a la despolimerización alcalina, está formado por una red tridimensional amorfa de cadenas polimetilénicas unidas mediante enlaces éter, con presencia de enlaces dobles y grupos ácido carboxílico libres. El cután parece estar ausente por completo en la cutícula de algunas especies, y en otras aparece en distinta proporción dependiendo del estadio de desarrollo de la planta o incluso de la zona de la misma (Tegelaar y col., 1991).

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 variados.

Como se decía anteriormente, las membranas cuticulares aisladas presentan 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).

• **Biosíntesis**

La biosíntesis de monómeros de cutina desde las células y el ensamblamiento extracelular para formar el biopolímero de cutina ha sido objeto de estudio durante mucho tiempo (Stark y Tian, 2006). Los precursores de la síntesis de cutina son sintetizados en las células epidérmicas y del parénquima (Mazliak y Pommier-Miard, 1963). Uno de los principales puntos de discusión sobre la biosíntesis de la cutina está referido al transporte de monómeros desde su lugar de síntesis hasta el lugar donde serían incorporados a la cutina en crecimiento. Los ácidos grasos se sintetizan en el cloroplasto, desde aquí se trasladan al retículo endoplasmático donde son modificados químicamente tras hidroxilación y/o epoxidación, después son transferidos hasta la membrana plasmática y desde aquí a la pared celular y la cutícula. En este sentido se han barajado durante años diversas hipótesis aunque los mecanismos moleculares del fenómeno siguen siendo desconocidos. Durante la década de los 70 quedó demostrada que la biosíntesis de cutina está mediada por enzimas localizadas en las células epidérmicas o en la cara externa de las paredes celulares epidérmicas (Kolattukudy y col., 1981), y que tales enzimas requerían ATP y CoA (Kolattukudy, 1984), pero la putativa hidroxiacil-CoA-cutina transacilasa que lleva a cabo dicha polimerización o condensación es aún desconocida (Stark y Tian, 2006).

Un enfoque y aproximación diferentes a nuestro conocimiento sobre cutina ha sido llevado a cabo por vez primera en nuestro laboratorio y que consiste en la síntesis química de un poliéster alifático idéntico a la cutina natural (Benítez y col., 2004). Los

autores enfatizan la necesidad de investigar la coexistencia de una ruta de biosíntesis enzimática de cutina que pudiese tener lugar por medios puramente químicos.

• **Propiedades**

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, las cuales determinan la capacidad de la superficie para mojarse (Bukovac y col., 1981).

En relación al agrietado de los frutos, Aloni y col. (1998) observaron diferencias en cuanto a las tasas de transpiración cuticular entre los cultivares susceptibles y los resistentes al agrietado del fruto en distintas 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 dado influyendo directamente sobre su módulo elástico. No se conocen trabajos que hayan estudiado 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.

Lenzian 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) estudiaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), las transiciones de fase que caracterizaban 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.

En cuanto a las propiedades térmicas de la cutina, puede afirmarse que a pesar de la pequeña fracción que la cutina supone frente al total del peso de la hoja o el fruto, ésta ejerce un papel fundamental como termorregulador. Investigaciones llevadas a cabo con cutículas y cutinas aisladas de diversa procedencia han puesto de manifiesto que éstas poseen una alta capacidad calorífica (Luque y Heredia, 1997; Casado y Heredia, 2001a; Casado y Heredia, 2001b). El calor específico de la cutina es del orden de 2-2.5 $\text{JK}^{-1}\text{g}^{-1}$, mientras que, como dato comparativo, el de la celulosa, componente mayoritario de las paredes celulares, es sólo del orden de 1.5 $\text{JK}^{-1}\text{g}^{-1}$. Puede afirmarse, que a pesar de que el material cuticular aparece únicamente como un componente minoritario en el total de la masa de las hojas y los frutos, éste juega un importante papel como termorregulador en las interacciones de las plantas con el medio ambiente.

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 tigonásticos de los filamentos estaminales de las flores de *Cirsium horridulum* Michx. (Marga y col., 2001).

Las propiedades mecánicas de un tejido dependen, 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).

Son varios los métodos que ofrecen una visión complementaria de las propiedades mecánicas de las cutículas vegetales en su conjunto (Stark y Tian, 2006). La técnica conocida como microscopía de fuerzas atómicas (AFM) provee la

oportunidad de la caracterizar *in situ* la superficie, considerando tanto la topología como la respuesta mecánica del material. La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) también se emplea par el estudio de estas propiedades, revelando información de la composición molecular del material y su estructura (Stark y Tian, 2006). Estas técnicas pueden complementar la información que aportan las clásicas curvas de esfuerzo-deformación o curvas de tracción, en las que se aplica una carga o tensión a una lámina del material y se estima 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 al que esté expuesto (Luque y col., 1995a).

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 la característica de ser una membrana heterogénea desde un 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 extensibilidad menor que la que presenta la superficie externa cubierta de ceras epicuticulares (Wilson y Sterling, 1976).

• **Métodos de estudio en base a la composición y ultraestructura de la cutícula**

Recientemente se han empleado una serie de técnicas de análisis no destructivas para el estudio de la estructura de la cutina, lo que ha posibilitado la obtención de una gran cantidad de datos complementarios a los estudios clásicos con técnicas que requerían de la despolimerización y posterior análisis de los monómeros solubilizados. En este sentido, en nuestro laboratorio se han llevado a cabo estudios mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier mediante la cual se ha podido determinar el grado de pureza de la cutícula aislada y las características químicas de la misma tras despolimerizaciones selectivas y parciales (Luque y col., 1995a; Villena y col., 2000). También se han llevado a cabo investigaciones mediante difracción de rayos X de cutinas purificadas de diversos frutos. Estos análisis han dado como resultado la definición de un modelo de cutina con una estructura fundamentalmente amorfa que actúa como un denso tamiz con dos espacios o distancias interplanares principales alrededor de 1.0 y 0.45 nm (Luque y col., 1995a).

La mayoría de los estudios realizados mediante resonancia magnética nuclear en estado sólido (RMN), otra técnica empleada en el estudio de la cutícula vegetal, describen la cutina como una red fundamentalmente amorfa y moderadamente flexible entre cadenas, con movimientos restringidos en determinados sitios de entrecruzamiento (Zlotnik-Mazori y Stark, 1998). Más recientemente, la espectroscopia de RMN en dos dimensiones, se ha usado para investigar los cambios producidos tras una despolimerización parcial de la cutina de frutos de tomate (Fang y col., 2001). Estos trabajos han confirmado los llevados a cabo mediante las investigaciones químicas más clásicas: la cutina se mantiene unida principalmente mediante enlaces éster de los alcoholes primarios y alrededor de la mitad de los alcoholes secundarios actúan entrecruzando las cadenas.

Recientemente se ha descrito en la literatura un ejemplo de estudio teórico sobre la estructura molecular de la cutina. Mediante cálculos de dinámica molecular se ha podido modelizar gráficamente una estructura inicial de lo que podría ser un fragmento oligomérico de cutina. Estos estudios sugieren que la cutina es una red moderadamente flexible con fuertes restricciones, principalmente en los sitios de entrecruzamiento de los grupos funcionales éster (Matas y Heredia, 1999). De este estudio teórico se pueden extraer dos conclusiones importantes: la existencia de un espaciado molecular de 0.4-0.5 nm entre las abundantes cadenas metilénicas del polímero y, a nivel dinámico, la continua formación de cavidades y huecos en la estructura de la cutina. Este tipo de investigación ha servido también para analizar teóricamente el comportamiento del agua dentro de la matriz de cutina. En este sentido, el análisis teórico ha mostrado que las moléculas de agua oscilan durante largos periodos de tiempo alrededor de ciertas posiciones discretas y realizan rápidos saltos de posición entre ellas. Los coeficientes de difusión calculados mediante esta simulación teórica son muy parecidos a los obtenidos experimentalmente (Matas y Heredia, 1999).

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

- Evaluar la incidencia de agrietado en campo de dos cultivares de tomate tipo cherry con distinta susceptibilidad al agrietado, y ver cómo influye la aplicación de solución salina en el agua de riego en el porcentaje total de agrietado.
- Estudiar las fluctuaciones diarias de crecimiento de frutos en estado maduro y correlacionarlo temporalmente con el agrietado del fruto.
- Estudiar los caracteres morfológicos y las propiedades mecánicas de la epidermis y la cutícula del fruto en dos estadios de desarrollo de frutos de tomate bajo tratamiento salino.
- Analizar bajo diferentes condiciones de humedad relativa y temperatura las propiedades mecánicas de la cutícula aislada y de la cutina de frutos de estadio rojo maduro y verde maduro de dos cultivares con distinta susceptibilidad al agrietado.
- Diseñar un método de obtención selectiva de los polisacáridos asociados a la cutícula y caracterizar los polisacáridos obtenidos a partir de cutícula aislada estudiando su disposición, orientación y composición.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los trabajos recogidos en la presente Memoria se realizaron en la Estación Experimental “La Mayora” principalmente a partir de dos campañas; un cultivo de primavera-verano en 2004 y otro de primavera-verano en 2005. Los detalles de cada cultivo así como y los ensayos aplicados a las muestras recogidas y los genotipos estudiados se recogen a continuación.

Instalaciones

Los ensayos de campo así como los distintos muestreos fueron realizados en las instalaciones de la Estación Experimental “La Mayora”, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, situada en el término municipal de Algarrobo (Málaga), con coordenadas 36° 40’ Norte, 4° 29’ Oeste. Se llevaron a cabo en un invernadero multitúnel, lo cual permitió 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. Tales ensayos fueron realizados en dos campañas de primavera-verano: cultivo 2004, donde se emplearon 2 soluciones de riego con distinta concentración salina (0 mM NaCl como testigo y 50 mM NaCl) y cultivo 2005, donde se probaron 2 soluciones de riego con distinta conductividad eléctrica (baja y 6.5dSm⁻¹ de Conductividad eléctrica-CE).

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 el 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 m³, estaba dotado de una bomba que impulsaba la solución por la correspondiente tubería portarramal y de ella salían las tuberías portagotos. Los portarramales y los portagotos eran tuberías de polietileno de 50 y 10 mm de diámetro respectivamente. Los gotos 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 m³ que contenían la solución nutritiva de riego.

El sustrato utilizado en cada ensayo fue arena colocada en macetas de 20 L. Cabe comentar que este sustrato presenta 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 cual se eligió este sustrato experimental.

Material Vegetal

Se eligieron dos genotipos de tomate tipo cereza que respondiesen con sensibilidad alta 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, y Gardeners Delight, como variedad extremadamente sensible.

Cascada F1 (Zeraim Ibérica), es un 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 y 34 mm y el peso medio entre 20 y 25 g. 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.

Gardeners Delight, es una variedad antigua de fruto tipo cereza, empleada 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 arrellanado 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.

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 dió 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 20 macetas regadas por un ramal. Se transplantó una planta por maceta de las variedades Cascada y Gardeners Delight. En la Figura 2.1 puede verse el aspecto de las plantas pocas semanas después del trasplante.

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 podaron a un tallo, tal como es práctica habitual en el cultivo comercial de tomate bajo invernadero en cultivares de hábito de crecimiento indeterminado. 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 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).



Figura 2.1: Disposición de las plantas en el invernadero multitúnel, semanas después del trasplante.

- **Cuajado de frutos**

En estos cultivos 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. Las formulaciones de las soluciones empleadas en cada tratamiento figuran a continuación en las tablas 1 y 2.

Tabla 2.1: Composición de las soluciones de riego empleadas para preparar 1000 l de solución nutritiva en cada caso concentrada 200 veces. El resto hasta completar los 1000 l es de agua de riego.

	Testigo	50 mM NaCl
Nitrato amónico	10 kg	10 kg
Epsomita	453.5 kg	453.5 kg
Ácido fosfórico	147 kg	147 kg
Ácido nítrico	94.5 kg	94.5 kg
Nitrato potásico	769.5 kg	769.5 kg
Cloruro cálcico	548.5 kg	548.5 kg
Sal común	-	2939.2 kg
Ácido clorhídrico	70 l	70 l

Tabla 2.2: Composición de las soluciones de riego empleadas para preparar 1000 l de solución nutritiva en cada caso. El resto hasta completar los 1000 l es de agua de riego.

	Testigo	6.5 dSm⁻¹
Nitrato cálcico	1 l	1 l
Ácido fosfórico	125 ml	125 ml
Ácido nítrico	125 ml	125 ml
Nitrato potásico	1 l	1 l
Sulfato potásico	9.75 l	9.75 l
Microelementos	200 mg	200 mg
Sulfato de magnesio	1 l	14 l
Cloruro cálcico	-	4.37 l
Sulfato sódico	-	27.94 l

El aporte de la solución nutritiva estuvo controlado por un programador de riego con riegos de una duración de 2 min. Al principio de cada cultivo se dieron 20 riegos diarios repartidos entre las 9:00 y las 18:00 h, que posteriormente se adaptaron suministrando un riego cada hora en punto, y manteniendo los riegos correspondientes a las horas centrales del día cada media hora.

Descripción de los estadios de maduración muestreados

Para el desarrollo de este trabajo se tomaron frutos recolectados en estadio verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) de los cultivares Cascada (Ca) y Gardeners Delight (GD) de tratamientos salinos (50 mM NaCl y 6.5 dSm⁻¹ de Conductividad Eléctrica) y sus correspondientes testigos.

Parte de los frutos fueron procesados para la obtención de cutícula aislada, empleada posteriormente para la determinación del peso específico, ensayos mecánicos, determinación del grosor (necesario para normalizar los datos de los ensayos mecánicos de fluencia realizados con cutícula aislada) y obtención de polisacáridos.

Por otro lado, se emplearon frutos enteros para la obtención de muestras de pericarpo, a modo de segmentos con forma rectangular, necesarias para realizar el estudio morfológico de las células epidérmicas del fruto y el grado de invaginación de la cutícula en éstas, así como para los ensayos mecánicos de fractura y carga-descarga secuencial realizados con epidermis.

Los ensayos de campo (curvas de crecimiento, evaluación de agrietado poscosecha, inducción de agrietado, estudio de las fluctuaciones de crecimiento), así como los ensayos mecánicos de carga-descarga secuencial y obtención de polisacáridos fueron llevados a cabo con frutos regados con solución de alta conductividad eléctrica (6.5 dSm^{-1}) y sus respectivos testigos. El pericarpo de frutos correspondientes al grupo de tratamiento salino 50 mM NaCl así como los testigos correspondientes fueron empleados para los estudios morfológicos realizados, así como para los ensayos mecánicos de fractura.

Curvas de crecimiento

A los 60 días del trasplante se etiquetaron 25 flores en el mismo estadio fenológico en cada una de las variedades y tratamientos para su posterior medición mediante un pie de rey digital. La evolución del diámetro transversal de los frutos comenzó una semana después del etiquetado de las flores (Fig. 2.2) y se continuó midiendo una vez cada 7 días hasta los 32 días después de antésis (dda) y posteriormente cada 3 días hasta el final del seguimiento, para caracterizar con detalle el periodo de maduración. La evolución del diámetro transversal se siguió hasta los 67 dda en ambos cultivares y tratamientos, momento en que el fruto culminó su proceso de madurez excepto en el caso de los frutos de Gardeners Delight del tratamiento testigo que se mantuvo hasta los 62 dda, ya que muchos de los frutos empezaron a agrietarse o simplemente a perder turgencia y por tanto disminuir el tamaño.



Figura 22: Detalle del etiquetado de flores en la planta para la curva de crecimiento de los frutos.

Evaluación del porcentaje de agrietado poscosecha y peso medio del fruto

Se dedicó una primera semana a recoger todos los frutos que habían madurado desde el principio del cultivo; asegurándonos de esta forma que el recuento de frutos agrietados correspondía al periodo en que se estaba evaluando. Dos semanas después se dedicó un día a recoger y desechar todos los frutos agrietados que se encontraban en cada planta. Una semana más tarde se procedió a la primera evaluación de la tasa de agrietado natural poscosecha, recogiendo todos los frutos maduros y distribuyéndolos en bolsas independientes para cada cultivar y tratamiento. Se registró el peso de cada bolsa con una balanza electrónica digital de alta sensibilidad y se hizo recuento de los frutos agrietados y enteros por bolsa. El peso medio del fruto se determinó dividiendo el peso de cada bolsa entre el número total de frutos que contenía. Los frutos agrietados se desecharon una vez contados, mientras que los frutos enteros o no agrietados se reservaron para ensayos posteriores (Inducción de agrietado por inmersión, extracción de cutículas y toma de muestras para estudio morfológico). Dos semanas después se recogieron todos los frutos agrietados, y una tercera se procedió a la segunda evaluación de agrietado natural poscosecha. Esta secuencia se repitió tres veces más a lo largo del

periodo de cultivo, completando así las cinco recogidas para la evaluación de agrietado poscosecha presentadas posteriormente en el apartado de Resultados.

Inducción de agrietado por inmersión

El método de evaluación de la susceptibilidad mediante la inducción del agrietado se basó en los protocolos descritos previamente por (Litcher y col., 2002).

Una vez terminado cada ensayo de evaluación de agrietado poscosecha, se tomaron 200 frutos enteros en estadio rojo maduro (RM) de cada cultivar y tratamiento. El día previo a la realización de cada ensayo de inducción, se introdujo la cantidad de agua destilada necesaria para realizar el ensayo en una cámara refrigerada a 10° C–12° C para equilibrar la temperatura del agua con la de la cámara. Para evitar la entrada de agua o la desecación por los tejidos de la cicatriz pedicular se colocaron los frutos en una superficie estable con el punto de inserción del pedicelo hacia arriba y se aplicó una gota de pegamento universal a cada fruto para que cubriera bien toda la zona sin invadir la superficie de cutícula, dejándolos secar durante 5-10 minutos.

Una vez preparados los frutos, se distribuyeron 25 frutos por tarrina (tarrinas de aluminio), a razón de 8 tarrinas por tratamiento y cultivar, de las cuales 4 se llenaron con el agua destilada refrigerada en la cámara hasta cubrir todos los frutos y otras 4 permanecieron sin agua (control del experimento). No fue necesario cerrar las tarrinas ya que dada la temperatura de la cámara, no tuvo lugar la evaporación del agua contenida. El recuento de frutos se realizó al día siguiente (a las 20 horas aproximadamente), registrando el número de frutos enteros y agrietados por tarrina. Los ensayos de inducción de agrietado por inmersión se llevaron a cabo en las mismas fechas que la evaluación de la tasa de agrietado poscosecha y registro del peso medio del fruto.

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.

Estudio de las fluctuaciones diarias de crecimiento del fruto

Para el estudio de las fluctuaciones diarias de crecimiento se empleó un sistema de sensores de crecimiento de la casa comercial Phyttech, programados para registrar el valor del diámetro transversal del fruto cada 15 minutos durante todo el día y la noche con una resolución de 0.01 mm. Tales sensores están adaptados para frutos que presenten un calibre de entre 15 y 70 mm. El empleo de sensores de humedad relativa y temperatura del aire permitió conocer las condiciones del entorno cercano a los frutos que estaban siendo estudiados. Los sensores de crecimiento fueron colocados en frutos verdes maduros (VM) en fase final de crecimiento y se mantuvieron hasta finalizar el proceso de maduración de cada fruto.

Posteriormente, el análisis de los datos permitió conocer el transcurso de un ciclo completo del crecimiento diario de un fruto (Fig. 2.3) en las distintas fases de crecimiento del mismo, mediante el estudio de los siguientes parámetros:

- Inicio de crecimiento (A)
- Máximo de crecimiento (B)
- Mínimo de crecimiento (C)
- Variación intradía (C-B): Variación del diámetro de un fruto dentro de un mismo ciclo. Se calcula como la diferencia entre el momento de mínimo crecimiento del fruto al final de un ciclo diario y el momento de máximo crecimiento dentro de ese mismo ciclo.
- Variación interdía ((A+1)-A): Variación del diámetro transversal de un fruto de un día a otro. Se calcula como la diferencia entre el punto de inicio de crecimiento de un día con respecto al punto de inicio de crecimiento del día anterior

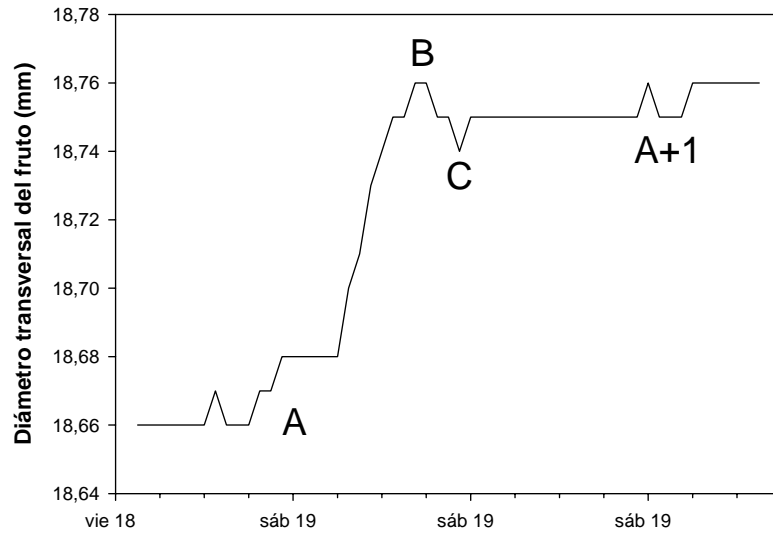


Figura 2.3: Esquema de del registro de las variaciones diarias del diámetro transversal de un fruto de tomate en un día de la fase de crecimiento. A: inicio de crecimiento de un ciclo; B: Diámetro máximo; C: Diámetro mínimo al fina del ciclo.

Aislamiento de cutículas

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 fueron divididos en 4 secciones y 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. A la solución de extracción se le añadió 1mM NaN_3 (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 36° C en un baño termostatzado 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. Posteriormente, las membranas cuticulares se lavaron exhaustivamente en agua destilada durante 2 días para eliminar restos de la solución enzimática. Tras esto, se

pasaron unos segundos por etanol 100% y se dejaron secar en una cámara con gel de sílice durante 7 días, conservándolas así posteriormente para su estudio.

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. Las muestras se dispusieron de forma extendida entre dos portaobjetos, agrupando 10 trozos por réplica y 3 réplicas por cada muestra con el fin de calcular la superficie total mediante un programa de captura (cámara LCC-RCA) y análisis de imagen (programa Visilog v 6.3 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.

Datos climatológicos

Los valores diarios de humedad y temperatura de cada hora durante la época de cultivo dentro del invernadero fueron registrados en La Mayora. Los datos referentes a los niveles de radiación en el exterior del invernadero fueron proporcionados por la estación meteorológica del instituto nacional de meteorología situada en Málaga. Los valores empleados en este trabajo pertenecen a las medias diarias de un periodo correspondiente a un mes previo a la recogida del fruto para el posterior análisis de la cutícula.

Estudio morfológico

• Inclusión de muestras en resina

El protocolo de inclusión de las muestras en resina (Kit Leica HistoResin) para su posterior estudio morfológico conllevó los siguientes pasos:

- Fijación: La fijación del tejido previa a la inclusión se realizó en FAA (1 parte formaldehído, 1 parte de acetona, 18 partes de etanol) durante un mínimo de 24 horas, pudiendo conservarse durante varios meses a 4° C hasta el momento de la inclusión.

- Deshidratación: La deshidratación del tejido se realizó en diluciones seriadas de etanol al 70% (2 pases de 30 minutos), 80% (2 pases de 30 minutos) y 95% (2 pases de 1 hora). No fue necesaria la total deshidratación del tejido en etanol 100% dado que el paso de preinfiltración contenía etanol al 95%.

- Preinfiltración: Previa a la infiltración, tuvo lugar un paso de preinfiltración donde se incluyó la muestra en una mezcla de la solución de infiltración y etanol 95% (1:1) durante 1 hora para favorecer el contacto entre la muestra y la resina. Posteriormente, se sometió a vacío durante unos minutos para facilitar la infiltración de la resina.

- Infiltración: Se incluyó la muestra durante 2 horas en la solución de infiltración (50ml resina básica + 0.5g activador) y se sometió de nuevo a vacío.

- Inclusión: La inclusión final de la muestra en resina (15ml de solución de infiltración + 1 ml de compuesto endurecedor) se completó en 40-120 minutos a temperatura ambiente

Los cortes se realizaron con un microtomo de rotación Leica modelo RM2125, con un grosor de 4 micras y se depositaron sobre gotas de agua en portas gelatinizados, dejándolos secar en una estufa P Selecta a 37° C durante 24 horas.

- **Preparación de portaobjetos gelatinizados**

Los cortes procedentes de cada muestra fueron depositados en portas gelatinizados para favorecer la adhesión del corte al portaobjeto, especialmente durante el proceso de tinción y lavado de la muestra. Para gelatinizar los portaobjetos fue necesario mantenerlos en una solución desengrasante (etanol 100% y éter dietílico en proporción 1:1) durante un mínimo de 24 horas y lavarlos posteriormente con etanol. La solución de gelatina fue preparada calentando en una placa calefactora a 60° C 200 ml de agua destilada y disolviendo 1 g de gelatina oro (Panreac) y 0.1 g de sulfato de potasio y cromo (III) dodecahidrato (Merck). Una vez preparada la solución de gelatina, los portaobjetos fueron colocados en una canastilla y sumergidos durante 10 segundos en la mezcla; tras este tiempo, se mantuvieron al aire durante 5 minutos y se volvieron a sumergir en la mezcla de gelatina otros 10 segundos. Finalmente, se dejaron secar en una estufa a 37° C durante 2 días.

- **Determinación del grosor de cutícula aislada**

El grosor de las muestras de cutícula aislada necesario para el estudio de las propiedades mecánicas se determinó mediante su inclusión en resina según el protocolo expuesto anteriormente, y posterior análisis del corte obtenido mediante un programa de captura de análisis de imagen (Visilog-Noesis v 6.3).

- **Tinciones histológicas**

Todos los colorantes preparados fueron filtrados a través de una membrana de 0.2µm de diámetro de poro (Filtropur S 0.2) antes de ser utilizados. Durante el proceso de tinción y lavado, se tuvo la precaución de cubrir los portaobjetos para evitar la degradación del colorante, especialmente en aquellos compuestos que emitían fluorescencia.

Tinción con azul de toluidina

La solución colorante de azul de toluidina se preparó a una concentración 0.5% en agua destilada. (Considine y Knox, 1979). Los portaobjetos dispuestos en una placa calefactora a 60° C se cubrieron durante 30 segundos con el colorante y se aclararon posteriormente con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. Las preparaciones teñidas con este colorante fueron observadas con microscopio óptico convencional.

Tinción con calcoflúor

La solución colorante de calcoflúor (Calcofluor White M2R, Sigma) se preparó a una concentración 0.1% en agua destilada. Los portaobjetos dispuestos sobre un agitador orbital (Heidolph Polymax 2040) se cubrieron con calcoflúor manteniendo la agitación durante 5 minutos. Posteriormente se procedió al lavado con agua destilada durante 5 minutos en agitación y finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente. Para observar esta preparación se empleó un microscopio de fluorescencia marca Nikon y modelo Eclipse E800, excitando con luz ultravioleta. Este compuesto se empleó para el estudio morfológico de las células epidérmicas, ya que al ser un compuesto que se une de forma específica a las fibras de celulosa, pone de manifiesto las paredes celulares emitiendo fluorescencia en tono blanco-celeste cuando se excita con luz ultravioleta (Luza y col., 1992).

Tinción con auramina O

La solución de auramina O se preparó a una concentración 0.01% en tampón fosfato 0.05M a pH 7.8 (Considine y Knox, 1979). Los portaobjetos dispuestos sobre un agitador orbital (Heidolph Polymax 2040) se cubrieron con auramina O manteniendo la agitación durante 5 minutos y lavando posteriormente con agua destilada durante otros 5 minutos en agitación. Finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente. Para observar esta preparación se empleó un microscopio de fluorescencia marca Nikon y modelo Eclipse E800, excitando con luz roja la muestra y captando la emisión de fluorescencia en tono verde claro. Este compuesto se empleó para el estudio morfológico de la cutícula ya que se une de forma específica a compuestos lipídicos, emitiendo fluorescencia en tono verde claro y poniendo de manifiesto la presencia de la cutícula del fruto para el estudio de su grosor y grado de penetración en la epidermis.

Tinción con rojo de rutenio

La solución colorante de rojo rutenio se preparó en agua destilada, (0.2 g/l agua) y se procedió a cubrir los portas con el colorante durante 1 hora, y posterior lavado durante 20 minutos (Considine y Knox, 1979). Este compuesto es un colorante específico para la tinción de pectinas. Las preparaciones teñidas con este colorante se observaron con un microscopio óptico convencional marca Nikon y modelo Eclipse E400, revelando la presencia de pectinas en un tono rosa.

• Estudio morfológico de las muestras de pericarpo

Para conocer los parámetros morfológicos de las muestras de pericarpo de fruto, fue necesario trabajar sobre imágenes digitales, dado que el empleo de colorantes fluorescentes requería de un microscopio de fluorescencia para poder apreciar la emisión de la fluorescencia a la longitud de onda indicada. El microscopio de fluorescencia empleado llevaba acoplada una cámara digital de alta resolución (Nikon DXM1200) que a su vez estaba conectada a un ordenador donde estaba instalado el programa ACT-1 diseñado para la captación, almacenaje y modificación de fotografías. Así, las muestras de pericarpo fueron incluidas en resina y cortadas según el método detallado anteriormente. Se realizó una tinción doble en cada corte de muestra de pericarpo con Auramina O y Calcoflúor, lo cual permitió estudiar el grosor de la cutícula, su grado de invaginación en la epidermis así como la morfología de las células epidérmicas en la misma muestra variando el filtro de excitación de la luz a la que se

exponía la muestra, poniendo así de manifiesto la tinción correspondiente a uno u otro colorante (Fig.2.4).

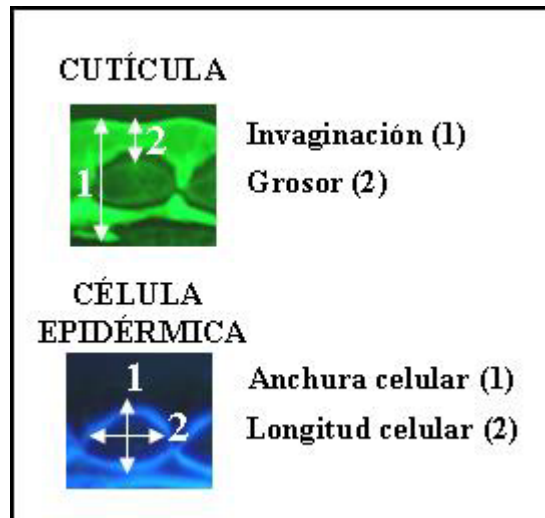


Figura 2.4: Detalle de una microfotografía de un corte de epidermis de fruto teñido en Auramina O (parte superior- Cutícula) y Calcoflúor (parte inferior-Epidermis). Las flechas indican las zonas consideradas para medir los distintos parámetros de morfometría indicados

Para medir el grosor de la capa de colénquima necesario para normalizar los datos de las propiedades mecánicas de la epidermis se empleó el colorante azul de toluidina, lo cual permitió observar a la vez tanto la cutícula como el tejido colenquimático. Este colorante fue empleado también para contrastar las cutículas aisladas de frutos del estadio verde maduro y medir su grosor, empleado posteriormente para normalizar los valores de las propiedades mecánicas estudiadas con cutícula aislada; las muestras de cutículas aisladas de frutos del estadio rojo maduro no necesitaron ser contrastadas ya que dada su coloración natural fueron fácilmente observadas con un microscopio óptico convencional.

Estudio de las propiedades mecánicas

Se estudiaron las propiedades mecánicas de la epidermis, la cutícula y la cutina de los frutos de tomate bajo distintas condiciones y distintos ensayos mecánicos. Dos dispositivos especiales, extensiómetro y texturómetro, permitieron desarrollar este apartado.

• **Extensiómetro**

El estudio comparativo de las propiedades mecánicas de la cutícula y la cutina de los frutos se realizó 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 Ingeniero Máximo L. Romero y construido en los laboratorios de mecanizado de la Universidad de Málaga. El equipo diseñado fue 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 (60x) y luz fría para determinar la ausencia de grietas o defectos antes de realizar el ensayo mecánico. Con este dispositivo fueron llevados a cabo los ensayos de fluencia descritos posteriormente.

Fijación de las muestras

Los segmentos de cutícula aislada y cutina, 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 (Fig. 2.5). 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.



Figura 2.5: Imagen del sistema de sujeción diseñado para fijar las muestras de cutícula en el extensiómetro

Puesta a punto del método del aparato

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.

• **Texturómetro**

El estudio de las propiedades mecánicas de la epidermis y correspondiente cutícula se realizó empleando un texturómetro comercial. Con este dispositivo fueron llevados a cabo los ensayos de fractura y de carga-descarga secuencial descritos posteriormente.

Fijación 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 uniforme y repetible (Figura 2.6). El grosor del segmento (eje X del muestra) fue de 5

cm para muestras de pericarpo del estadio RM y de 2.5 cm para muestras del estadio VM; la diferencia del grosor del segmento según el estadio de maduración se debió a la rigidez aparente del tejido, siendo necesario disminuir el grosor de las muestras de pericarpo del estadio VM para facilitar su adhesión a la chapa metálica. La longitud de los segmentos varió en función de las diferencias en tamaño y forma de los distintos frutos. Cada muestra de pericarpo fue 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. Se tomaron 2 muestras de pericarpo de cada fruto de un total de 7 frutos por cada cultivar, estadio y tratamiento. Así mismo, se tomaron muestras de pericarpo de los frutos RM de ambos cultivares para el aislamiento de la cutícula y posterior estudio de sus propiedades mecánicas. Una vez aisladas, las muestras de cutícula se mantuvieron en tampón citrato hasta ser 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.



Figura 2.6: Imagen del sistema de sujeción diseñado para fijar las muestras de cutícula en el extensiómetro

Para realizar los ensayos mecánicos, las muestras de piel y sus correspondientes cutículas se montaron en dos pequeñas chapas de metal las cuales fueron ancladas en un gancho superior y otro inferior sujetos a los cabezales móviles del texturómetro. Las muestras se sujetaron a las chapas metálicas 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.

Puesta a punto del método del aparato

Al igual que con el extensiómetro, se realizaron varias pruebas de extensión con las chapas metálicas y el pegamento empleado en este aparato para comprobar que la deformación obtenida en una muestra de cutícula correspondía a la propia deformación de la muestra y no al pegamento.

• **Tipos de ensayos**

Ensayo de Fluencia-Creep

Los ensayos mecánicos aplicados a las muestras de cutícula aislada y cutina de fruto de tomate consistieron en una serie sucesiva de ensayos de fluencia. Para determinar los cambios en longitud, cada segmento de cutícula (o de cutina) 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.

- **Obtención de parámetros**

El diagrama esfuerzo-extensión se obtuvo representando el esfuerzo aplicado frente a la máxima deformación longitudinal obtenida después de 20 minutos (Figura 2.7). 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). Para determinar la deformación por tensión, se midió la longitud de cada muestra una vez montada con un calibre digital. Para estimar los esfuerzos, la fuerza de tensión aplicada durante cada ensayo se dividió entre el área transversal media de cada muestra.

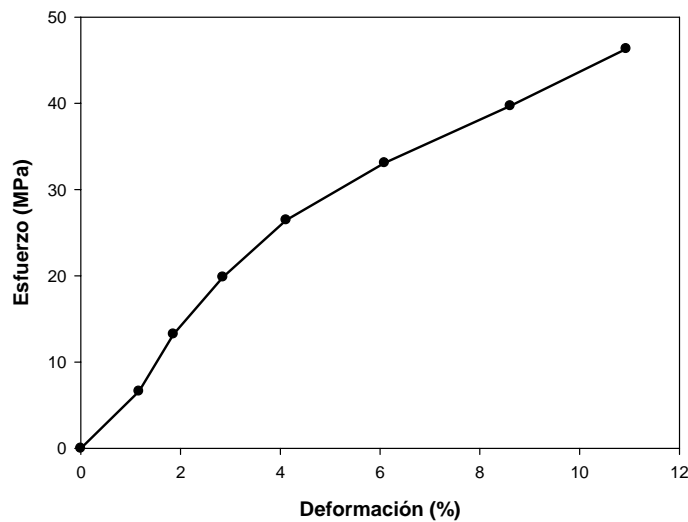


Figura 2.7: Curva típica de un ensayo de fluencia realizado con cutícula aislada en el extensiómetro. Esta curva da una información de la deformación obtenida frente a un esfuerzo aplicado en el tiempo. La curva de la pendiente inicial sería el valor de E, y el punto final de la muestra indica el esfuerzo y la deformación en el punto de ruptura

- Material del ensayo

Los ensayos de fluencia se realizaron con las cutículas aisladas enzimáticamente y las muestras de cutina procedentes de frutos de los estadios verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) de los cultivares Cascada (Ca) y Gardeners Delight (GD) de los grupos controles.

- Condiciones del ensayo

Los ensayos de fluencia se llevaron a cabo bajo la combinación de dos temperaturas (23° C y 35° C) y dos humedades relativas (40% de humedad relativa (HR) y sumergido en tampón citrato a pH 3.5 (Kutschera y Schopfer, 1986; Petracek y Bukovac, 1995), considerando este último como mojado. Tales condiciones fueron elegidas con la intención de ver el efecto del agua sobre la cutina en comparación con la cutícula así como el efecto de temperaturas superiores e inferiores a la temperatura de transición vítrea documentada en la bibliografía.

Ensayo de Fractura

Los ensayos de tensión uniaxial se realizaron aplicando una fractura inicial al tejido, sometiendo el material a tensión constante y estudiando la deformación del tejido hasta provocar la fractura total de la muestra a una velocidad de deformación de 2.0 mm s⁻¹.

- Obtención de parámetros

El esfuerzo máximo (σ_b) fue registrado como el esfuerzo en el punto de fractura total de la muestra respectivamente. De igual forma estos ensayos 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; junto con los valores del módulo elástico (E) y el esfuerzo de fractura (σ_b) de cada muestra se calculó W según la relación $W=(\pi l \sigma_b^2)/2E$ (Kraemer y Chapman, 1991; Niklas, 1992a; Anderson, 1995). En la Figura 2.8 se presenta un ejemplo de una curva obtenida durante un ensayo de fractura.

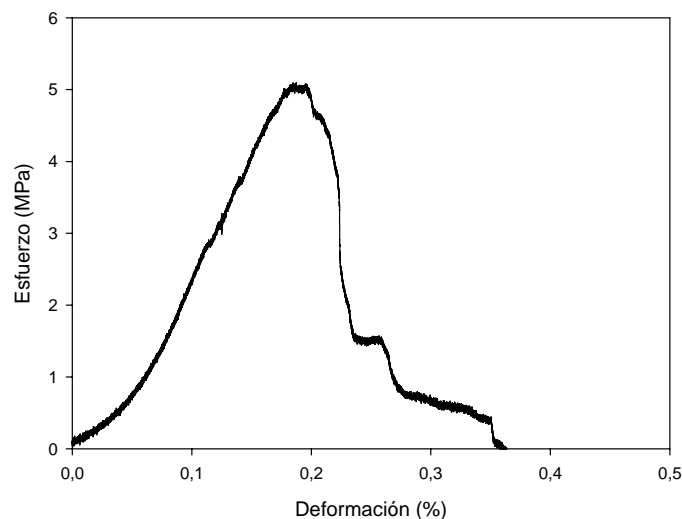


Figura 2.8: Curva típica de un ensayo de fractura realizada con epidermis en el texturómetro Se representa la deformación del tejido frente a un esfuerzo aplicado. La pendiente de la curva sería el valor del módulo elástico y el momento en que empieza a caer la curva sería el punto en que el material termina de romper cutícula y epidermis y traslada la deformación al colénquima.

- Material del ensayo

Los ensayos de fractura se realizaron con muestras de epidermis de frutos de los estadios verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) de los cultivares Cascada (Ca) y Gardeners Delight (GD) de los grupos testigos y salinos (50 mM NaCl). También se realizaron ensayos de fractura con las cutículas aisladas de frutos RM de ambos cultivares de los grupos testigos de los mismos frutos. Cada muestra fue procesada en el momento de la realización del ensayo mecánico dentro de las 5 horas siguientes a la recogida.

- Condiciones del ensayo

Los ensayos de fractura fueron llevados a cabo en condiciones de temperatura (23° C - 25° C) y humedad relativa (40% HR) ambiente. Las muestras se mantuvieron continuamente hidratadas durante cada ensayo, con la superficie subepidérmica en contacto con papel de filtro embebido en jugo extraído de los frutos.

Ensayo de Carga-Descarga

Los ensayos compuestos de sucesivos ciclos de carga y descarga fueron empleados para determinar tanto los efectos de esta aplicación repetitiva de cargas y descargas mecánicas en el módulo de elástico de una muestra como la acumulación de deformaciones plásticas en cada ciclo. 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. Los esfuerzos y las deformaciones fueron registrados cada 0.5 s durante cada ciclo de carga-descarga, con una velocidad de deformación de 2.0 mm s⁻¹.

- Obtención de parámetros

Las deformaciones plásticas así como el módulo elástico fueron estimadas al final de cada ciclo de carga. La rigidez de la muestra (E) fue estimada en función de la pendiente correspondiente a la representación del módulo elástico en cada ciclo frente a cada carga aplicada. La longitud expuesta de cada muestra se midió antes de la aplicación del ensayo para la posterior determinación de la deformación. Para estimar los esfuerzos, la fuerza de tensión aplicada durante cada ensayo se dividió entre el área transversal media de cada muestra. Un gráfico de este tipo de ensayos se muestra en la Figura 2.9.

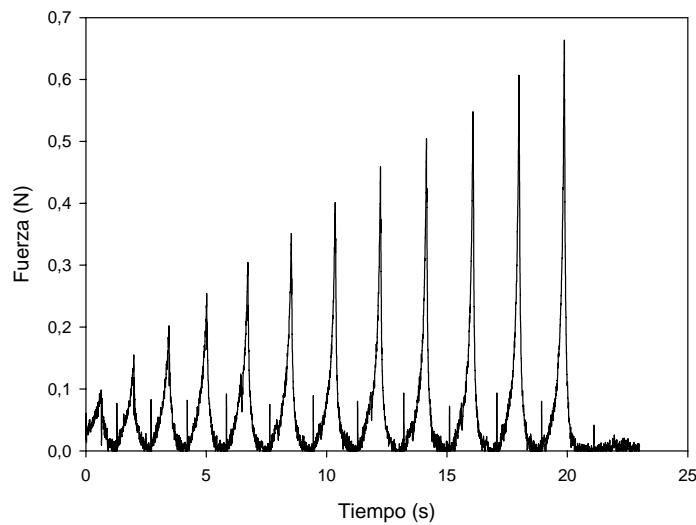


Figura 2.9: Curva correspondiente a un ensayo de carga-descarga secuencial. Cada pirámide corresponde a un ciclo. Se representa la fuerza aplicada en cada ciclo frente al tiempo

- **Material del ensayo**

Los ensayos de carga-descarga secuencial se realizaron con muestras de epidermis de frutos de los estadios verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) de los cultivares Cascada (Ca) y Gardeners Delight (GD) de los grupos de alta conductividad eléctrica ($CE = 6.5 \text{ dSm}^{-1}$) y los correspondientes testigos. Cada muestra fue procesada para llevar a cabo el correspondiente ensayo mecánico dentro de las 5 horas siguientes a la recogida de los frutos.

- **Condiciones del ensayo**

Los ensayos de carga-descarga secuencial fueron llevados a cabo en condiciones de temperatura ($23^\circ \text{C} - 25^\circ \text{C}$) y humedad relativa (40% HR) ambiente. Las muestras se mantuvieron continuamente hidratadas durante cada ensayo, con la superficie subepidérmica en contacto con papel de filtro embebido en jugo extraído de los frutos.

- **Medidas del Grosor de las muestras**

El área de la sección transversal de las muestras de cutina, cutícula y epidermis se obtuvo mediante el análisis de imagen de las microfotografías de los cortes histológicos realizados según el protocolo descrito anteriormente. Tales medidas fueron necesarias para determinar el valor de las áreas trasversales de aplicación de las fuerzas de tensión de las muestras estudiadas mecánicamente y para calcular los esfuerzos y los módulos elásticos asociados.

Para determinar el grosor de las muestras de cutícula y cutina estudiadas, se incluyeron 4 réplicas de cada ejemplar tomadas del conjunto de cutículas aisladas y las correspondientes cutinas de los frutos procesados para aislamiento de cutícula, realizándose las medidas sobre 20 cortes. El grosor fue medido en la zona correspondiente a la pared periclinal externa de las células epidérmicas.

Para determinar el grosor de las muestras de epidermis, se incluyeron 4 réplicas de pericarpo de cuatro frutos diferentes por cada estadio, tratamiento y cultivar estudiado, y se realizaron las medidas sobre 20 cortes de tejido de cada muestra. El grosor de la capa de colénquima contribuyente al desarrollo de las propiedades mecánicas de la epidermis fue medido en cada muestra estableciendo como criterio el tamaño y forma de las células para establecer los límites de la capa de colénquima en cada caso.

• **Análisis de los resultados**

En cada caso, se estudiaron las diferencias estadísticas de los distintos parámetros analizados (módulo de tensión (E), esfuerzo en la fractura (σ_b), deformación máxima, deformación plástica (ϵ_b), trabajo de fractura (W)) para determinar si las características del material variaban de forma significativa en función del estadio de maduración, cultivar, tratamiento de la solución de riego, temperatura y humedad según el caso. La comparación de las medias de cada parámetro se realizó mediante el estadístico Tukey-Kramer HSD, con $\alpha=0.05$, cuando la comparación de las condiciones era dos a dos, o mediante el estadístico t Student con $\alpha=0.05$ cuando se comparaban más de dos condiciones entre sí.

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) en el caso de las muestras de epidermis. Para las muestras de cutículas aisladas y cutinas se tomaron entre 5 y 7 réplicas del conjunto de cutículas aisladas procedentes de distintos frutos.

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).

Método de eliminación de polisacáridos presentes en las cutículas aisladas

Para eliminar los polisacáridos presentes en las cutículas aisladas enzimáticamente, las muestras fueron sumergidas en 5 ml de ácido fluorhídrico en piridina (Aldrich, Milwaukee, Wis. USA) durante 4 horas a 55° C (Villena y col., 1999). Posteriormente, se lavaron exhaustivamente en agua destilada y se dejaron secar. Las muestras fueron pesadas antes y después del tratamiento para registrar la pérdida de peso correspondiente al material de naturaleza polisacáridica.

Estudio de polisacáridos asociados a la cutícula

• Obtención selectiva de polisacáridos

La obtención selectiva de los polisacáridos adscritos a las cutículas aisladas de frutos de tomate conllevó tres pasos básicos. En primer lugar, fue necesario eliminar las ceras presentes en la cutícula. Así, partiendo de 1 g de cutícula aislada se añadieron 300 ml de cloroformo y 100 ml de metanol, manteniendo la solución a 50° C durante 1 hora y realizando posteriormente tres lavados sucesivos con metanol. En segundo lugar, se procedió a la despolimerización de la cutina añadiendo 400 ml de metanol con KOH al 1% y manteniendo la solución a 40° C durante 2 días. Por último, se realizaron sucesivos lavados con metanol hasta que la solución dejó de mostrarse coloreada. Tras esto, se procedió a la evaporación del solvente en una placa de teflón hasta obtener finalmente el extracto de polisacárido seco.

• Comparación de la disposición y localización de los polisacáridos en la cutícula y en el extracto obtenido a partir de cutícula aislada

Para conocer cómo se disponían morfológicamente los polisacáridos en los extractos obtenidos procedentes de cutículas aisladas y comparar esta estructura con la forma en la que se disponían originalmente en la cutícula, se tomaron porciones de

cutícula aislada y extractos de polisacáridos en fresco y, colocados sobre un portaobjetos se le aplicó una gota del colorante correspondiente (calcoflúor y rojo rutenio) a cada muestra de forma independiente para poner de manifiesto la presencia y disposición de pectinas y celulosas en ambos casos.

• **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 en 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 8° y 50° (2θ), con un tamaño de paso de 0.03° , un tiempo de contaje de 3 segundos por punto a una tensión de 40 kV y una intensidad de 30 mA. Las muestras fueron montadas sobre un soporte de metacrilato adaptado al goniómetro del difractómetro.

• **Espectroscopía microRaman**

Se obtuvieron espectros Raman de los polisacáridos extraídos de las cutículas aisladas de frutos de tomate con un espectrofotómetro Renishaw Raman In Via Reflex. Se utilizó una línea de excitación de 785 nm con una potencia láser de 6 mW y un objetivo de 50x. La resolución fue de 4 cm^{-1} y se realizaron 5 acumulaciones por espectro, abarcando un rango espectral desde los 2000 hasta los 500 cm^{-1} .

• **Medida de azúcares totales**

Partiendo de 6 mg de muestra pulverizada, se añadió 0.83 ml de H₂SO₄ concentrado frío y se mantuvo durante 5 minutos en agitación en un orbital vertical. Tras este tiempo se añadieron 0.26 ml de agua destilada por duplicado manteniendo la agitación cada vez durante 5 minutos cada vez. A continuación se completó el volumen añadiendo 10 ml de agua destilada y agitando de nuevo durante 5 minutos. Tras esto cada muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 4000 g, rescatando posteriormente el sobrenadante y eliminando el precipitado. Este sobrenadante fue empleado para medir la cantidad de azúcares totales según el método descrito a continuación.

Para conocer la cantidad de azúcares totales presentes en las muestras procedentes de extractos de compuestos hidrolizables tratadas con H₂SO₄ concentrado, se añadieron 60 µl de orcinol sulfúrico por cada 40 µl muestra en una placa ELISA de 96 pocillos, y se incubaron durante 30-45 minutos en un horno a 100°C. El reactivo orcinol sulfúrico se preparó con 75 ml H₂SO₄ al 60% y 10 ml de orcinol. Tras este tiempo, se paró la reacción a 4° C y se procedió a la lectura de absorbancia a 450 nm. Interpolando el valor de absorbancia en una recta patrón construida con un stock de glucosa (2 mg/ml) se calculó la concentración de azúcares totales presentes en cada extracto. Se probaron 3 diluciones tanto para la recta patrón como para cada muestra: 1:2 (20 µl muestra + 20µl tampón), 1:10 (4 µl muestra + 36 µl tampón) y 1:20 (2µl muestra + 38 µl tampón)

• **Fraccionamiento de polisacáridos**

El fraccionamiento de los polisacáridos obtenidos de forma selectiva a partir de cutículas aisladas de frutos de tomate se basó en protocolos descritos para el fraccionamiento de los polisacáridos que componen la pared celular de frutos de fresa y de tomate. Partiendo de una cantidad variable entre 60 y 70 mg de cada muestra, se llevaron a cabo una serie de pasos comunes detallados a continuación para cada extracto de polisacáridos:

- Lavado de la muestra en tubos falcón con 30 ml de agua destilada durante dos días, manteniendo la agitación con ayuda de un orbital vertical
- Centrifugado de la muestra a 6000 g durante 15 minutos por duplicado en una centrifuga “High Speed Brushless, HPW-350R”.

- Filtrado de cada volumen a través de un filtro de microfibra de vidrio (ALBET) con ayuda de una bomba de vacío Millipore.
- Dializado del sobrenadante en tripas de diálisis, haciendo 3 cambios diarios de agua durante 7 días
- Concentrado de la muestra dializada mediante un rotavapor (Büchi rotavapor R-200) hasta obtener un volumen final de 10 ml
- Liofilizado de cada concentrado y registro del peso resultante

Esta fracción permitió la extracción de las pectinas solubles en agua. El precipitado resultante en el paso de centrifugación se resuspendió en ácido-diaminociclohexanotetracético (CDTA) para separar las pectinas unidas covalentemente, aplicando de nuevo los pasos de dialización, concentración y liofilización de la muestra descritos anteriormente. La siguiente fracción fue resuspendida en Na_2CO_3 para extraer las pectinas unidas iónicamente. Con KOH se extrajo la siguiente fracción correspondiente a hemicelulosas y por último, el residuo que quedó al final de todo el proceso correspondió a la celulosa (Seymour y col., 1990; Redwell y col. 1997).

CAPÍTULO - I

RESULTADOS - I

Efecto de variables ambientales sobre el porcentaje de agrietado, las características morfológicas y propiedades mecánicas de la epidermis de frutos de tomate

1. Caracterización de los cultivares estudiados en condiciones testigo

1.1. Evaluación de campo

• Crecimiento y desarrollo del cultivo

Las plantas de tomate de los genotipos Cascada y Gardeners Delight cultivadas en la Estación Experimental “La Mayora” mostraron un crecimiento vigoroso y se desarrollaron sin incidentes. Como se puede observar en la Figura 3.1, las plantas de Gardeners Delight presentaron un desarrollo más retrasado con respecto a Cascada, lo cual entra dentro del patrón habitual de desarrollo de este genotipo. Quizá por esto, en algunos momentos al inicio del cultivo, las hojas inferiores presentaron manchas amarillentas lo cual podría explicarse por estar recibiendo el mismo tratamiento y cantidad de riego que las plantas de Cascada, que mostraban mayor porte. No obstante, el cultivo se desarrolló sin incidentes.

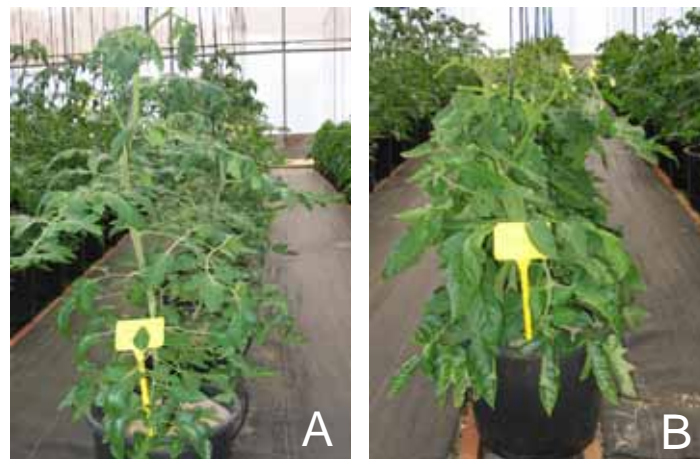


Figura 3.1: Estado de las plantas de los cultivares Cascada (A) y Gardeners Delight (B) en el invernadero 45 días después del trasplante a maceta.

Las curvas de crecimiento de los frutos se construyeron marcando flores y midiendo el diámetro de los frutos a los que dieron lugar cada semana hasta los 32 días después de anthesis (dda) y posteriormente cada 3 días hasta el final del seguimiento. La razón de hacer más medidas al final del desarrollo fue caracterizar con detalle el periodo de maduración. Cascada necesitó un periodo mayor que Gardeners para madurar ya que

el cambio de tonalidad verde a anaranjado comenzó a registrarse en los frutos de Cascada a partir de los 40dda, mientras que para el cultivar Gardeners Delight el cambio de coloración se observó a partir de los 35dda. La medida del diámetro de los frutos de Cascada se siguió hasta los 67dda, cuando ya estaban sobremaduros, mientras que para los frutos de Gardeners Delight se mantuvo hasta los 62dda (Figura 3.2), ya que muchos de los frutos empezaron a agrietarse o simplemente a perder turgencia y por tanto a disminuir el tamaño. El diámetro transversal alcanzado al final de este periodo para los frutos de Cascada fue de $36.1 \pm 2\text{mm}$, mientras que los frutos de Gardeners alcanzaron los $36.5 \pm 1.7\text{mm}$. Las diferencias de diámetro por tanto entre los frutos de los genotipos resistente y susceptible no fueron apreciables. Sí se observó un más rápido desarrollo del fruto en Gardeners.

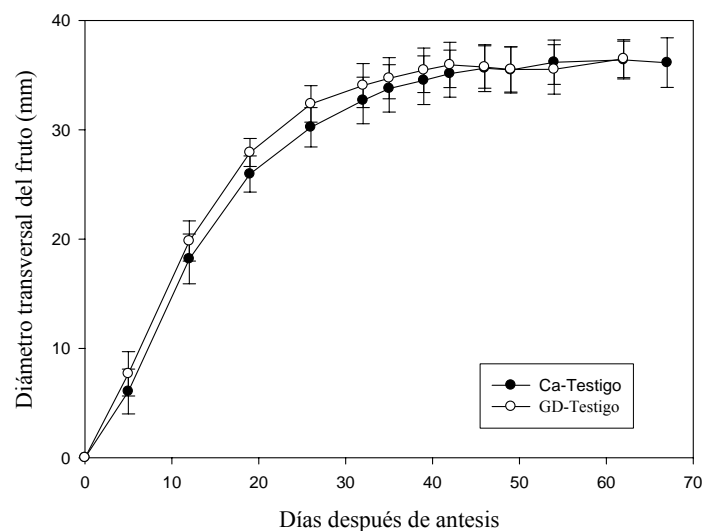


Figura 3.2: Curvas de crecimiento de los frutos de los cultivares Cascada y Gardeners Delight. Medias del diámetro transversal de 25 frutos de cada variedad acompañada de la desviación típica.

En cuanto a la forma, los frutos rojos de Cascada, se mantuvieron más o menos esféricos y turgentes una vez alcanzaban la maduración, mientras que los de Gardeners Delight eran algo más achatados (diámetro transversal mayor que el longitudinal) y perdían la turgencia en pocos días.

El peso de los frutos maduros se registró tras cada recogida planificada para evaluar el agrietado poscosecha. En la Tabla 3.1 puede observarse una disminución del peso medio del fruto hacia el final del cultivo en ambos cultivares aunque dicha disminución fue más temprana en Gardeners (a partir del 6 de junio) que en Cascada (a partir del 22 de junio). Cascada mostró un mayor peso de fruto en valor absoluto en

todas las recogidas y la media general también fue superior en valor absoluto, pero los altos errores de estima impidieron detectar diferencias significativas.

Tabla 3.1: Peso medio de los frutos de los cultivares Cascada en condiciones testigo (Ca-T) y Gardeners Delight (GD-T) en cada una de las recogidas realizadas durante la cosecha. Para estimar el peso medio en cada una de ellas, se dividió el valor del peso total de frutos entre el número de frutos.

	31-may	06-jun	15-jun	22-jun	28-jun	Med \pm DesvTip
Ca-T	22.6	22.3	19.8	22.9	13.8	20.3 \pm 3.8
GD-T	20.9	19.8	16.7	13.2	13.6	16.8 \pm 3.5

• Ritmos circadianos de crecimiento

Los sensores de crecimiento de frutos o dendrómetros nos permitieron hacer un seguimiento de las fluctuaciones diarias del diámetro transversal del fruto, analizando el registro de valores tomado cada 15 minutos. A su vez y en paralelo, fue registrada la temperatura del entorno próximo a los frutos que se estaban evaluando. La forma de analizar estos datos así como el significado de los distintos parámetros que de ellos se derivaron se presentan en el apartado de Material y Métodos.

Tras trabajar con los sensores en un grupo de frutos a modo de prueba, se seleccionaron posteriormente 6 frutos de Cascada en estadio verde maduro y 10 de Gardeners Delight en estado pintón. En el caso de Gardeners, la mayor parte de los 10 frutos empezaron a perder turgencia o agrietarse casi desde el momento de colocación de los sensores, según se observó posteriormente en el registro de los datos; tan solo dos frutos de este cultivar pudieron ser estudiados finalmente.

La colocación de los sensores en frutos en estadio verde maduro y el mantenerlos en algunos casos hasta la sobremaduración nos permitió definir tres fases diferentes (ver Figura 3.3) en base a las fluctuaciones diarias de crecimiento:

- Una primera fase que podríamos considerar fase de crecimiento donde el fruto aún presenta crecimiento de un día a otro; esto se comprueba porque la variación interdía, es decir, lo que varía el diámetro de un fruto de un día a otro, es positiva y va en aumento.

- Una segunda fase que podríamos considerar fase de estabilización, donde el fruto ha alcanzado su diámetro máximo, y la variación interdía es prácticamente nula.
- Por último, una tercera fase donde el fruto comenzaba a perder turgencia y a disminuir el diámetro, siendo por tanto la variación interdía negativa. Esta fase tendría lugar después del agrietado del fruto en el caso de que se diese (disminución brusca en el diámetro), o bien, si el fruto permaneciera en la planta hasta la sobremaduración, por pérdida de agua (pequeña disminución diaria del diámetro).

En este sentido, el estudio de la variación intradía en la segunda fase o fase de estabilización nos permitiría conocer cuál sería el límite máximo de extensión de un fruto antes de que tuviera lugar el agrietado en el estadio rojo maduro.

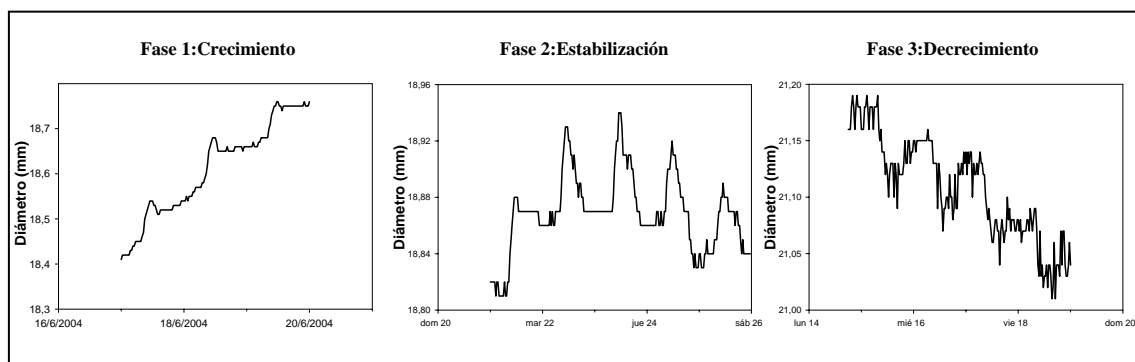


Figura 3.3: Fases de crecimiento en base a las fluctuaciones diarias de diámetro, una vez el fruto ha alcanzado el estadio verde maduro. En cada figura se representa el diámetro transversal del fruto frente al tiempo horario de varios días.

Si analizamos en conjunto las fluctuaciones del diámetro transversal con la temperatura del entorno cercano al fruto, se observa que el diámetro del fruto evolucionó de manera inversa a como lo hizo la temperatura, es decir los mayores valores de diámetro del fruto se alcanzaron cuando la temperatura fue mínima y viceversa (Figura 3.4). Tomando en detalle un día o ciclo de crecimiento de uno de los frutos en la fase de estabilización se observó que el fruto comenzaba su ciclo diario de crecimiento sobre las 16:00 horas, cuando la temperatura era de 32.5° C, partiendo de un diámetro de fruto de 31.33 mm. Este fruto alcanzaba un máximo de crecimiento de 31.46 mm sobre las 6:15 horas, cuando la temperatura disminuía hasta el valor mínimo de ese ciclo de 19.3° C. Tras esto, el diámetro del fruto comenzaba a decrecer hasta

alcanzar el valor mínimo de ese ciclo, que fue de 31.26 mm a las 18:00 horas, momento en que la temperatura alcanzaba un máximo de 34.6° C. Este valor mínimo de diámetro continuó así hasta la siguiente toma de registro a las 18:15 horas, momento en el que comenzaban de nuevo las fluctuaciones de un nuevo ciclo, con un diámetro de partida de 31.30 mm a una temperatura de 32.2° C. Con todo esto se pudo obtener la variación intradía, como la diferencia entre el mínimo y máximo diámetro, que sería de 0.19 mm, considerándolo en valor absoluto, lo cual supondría un 0.6 % de variación de diámetro dentro de un ciclo, ya que sabemos que al inicio de ese ciclo el fruto presentaba un diámetro de 31.33 mm. El valor de la variación interdía, calculado como la diferencia entre el mínimo de un día o ciclo con respecto al anterior fue en este caso de -0.03 mm, lo cual estaba indicando que el fruto se encontraba en la fase de estabilización, y que las variaciones intradía analizadas correspondían a la fase segunda, fase en la que el fruto aún mantiene la turgencia y por tanto en la que el fruto podría agrietarse.

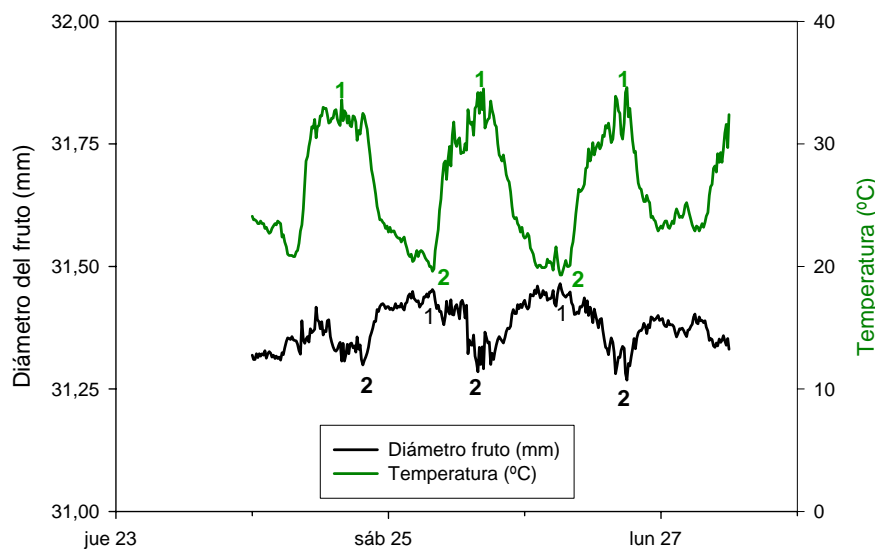


Figura 3.4: Diámetro transversal del fruto (línea negra) y temperatura ambiente (línea verde) cuando el fruto se encuentra en la fase segunda o de estabilización. Los valores máximos de cada diagrama están señalados con el número 1 y los mínimos con el 2.

Esta evolución del diámetro en función de la temperatura se mantenía en el resto de los frutos analizados, aunque hubo diferencias lógicas en cuanto al diámetro de partida de cada fruto, y pequeñas variaciones en el ritmo de crecimiento entre un fruto y otro. De forma general e integrando la información extraída de todos los frutos estudiados en este cultivo de primavera-verano, el crecimiento diario de un fruto comenzaba entre las 16:00 y las 19:00 h aproximadamente; el diámetro máximo era alcanzado en un periodo comprendido entre la 1:00 y las 8:00h, momento tras el cual

comenzaba a disminuir el diámetro del fruto hasta alcanzar el mínimo entre las 14:00 y las 16:00h. Tanto los diámetros máximos como los mínimos podían ser puntuales o prolongarse en el tiempo durante algunas horas. Las temperaturas máximas alcanzadas en los meses de junio y julio tenían lugar entre las 12:00 y las 18:00 h, mientras que las mínimas se daban entre las 6:00 y las 7:30h.

En la Tabla 3.2 se muestran los valores de las variaciones intradía de 3 ciclos asociados a la fase de estabilización de distintos frutos del cultivar Cascada, expresadas en mm. Tales variaciones fueron transformadas en porcentajes respecto al diámetro inicial del fruto, obteniendo así el límite máximo de expansión de un fruto rojo maduro en cada día sin llegar al agrietado. Así, dependiendo del fruto o el momento exacto de maduración del fruto en estado rojo maduro o incluso del día, el límite máximo de expansión de un fruto variaba entre el 0.1 y casi el 1% del total de su superficie.

Puesto que los días consecutivos 1, 2 y 3 fueron los mismos para todos los frutos presentados en la Tabla 3.2, las variaciones de temperatura dentro de cada ciclo incluidas en la última columna de la Tabla fueron comunes. Se observó que el porcentaje de expansión calculado aumentó del día 1 al día 2 y disminuyó del día 2 al día 3 en todos los frutos. La diferencia de temperatura en el mismo periodo en que se calculó la variación intradía para cada fruto también disminuyó del día 1 al 2 y aumentó del día 2 al 3, probando así la estrecha relación entre las variaciones de temperatura y las fluctuaciones diarias de diámetro del fruto.

Tabla 3.2: Diámetro transversal máximo y mínimo, variación intradía, porcentaje de expansión del fruto con respecto al diámetro máximo de frutos en estadio rojo maduro del cultivar Cascada, y diferencia de temperatura máxima y mínima de cada día.

	Diámetro Máximo (mm)	Diámetro Mínimo (mm)	Variación Intradía (mm)	% Expansión	Diferencia de Temperatura (° C)
FRUTO 1					
Día 1	29.96	29.89	-0.07	0.23%	13.7
Día 2	30.02	29.91	-0.11	0.36%	15
Día 3	29.99	29.94	-0.05	0.17%	13.1
FRUTO 2					
Día 1	31.45	31.28	-0.17	0.54%	13.7
Día 2	31.46	31.27	-0.19	0.60%	15
Día 3	31.40	31.32	-0.08	0.25%	13.1
FRUTO 3					
Día 1	30.14	29.98	-0.16	0.53%	13.7
Día 2	30.21	30.03	-0.18	0.60%	15
Día 3	30.23	30.13	-0.1	0.33%	13.1
FRUTO 4					
Día 1	36.60	36.46	-0.14	0.38%	13.7
Día 2	36.63	36.45	-0.18	0.50%	15
Día 3	36.61	36.55	-0.06	0.16%	13.1
FRUTO 5					
Día 1	33.72	33.42	-0.3	0.89%	13.7
Día 2	33.80	33.48	-0.32	0.94%	15
Día 3	33.82	33.68	-0.14	0.41%	13.1
FRUTO 6					
Día 1	36.24	36.14	-0.1	0.27%	13.7
Día 2	36.25	36.14	-0.11	0.30%	15
Día 3	36.25	36.21	-0.04	0.11%	13.1

Todos los frutos analizados de Gardeners estaban agrietados cuando se retiraron los sensores de los frutos. Tan solo en dos de ellos se conservó el registro de la fase de estabilización de las fluctuaciones antes de comenzar a perder turgencia. Tomando el registro de estos dos frutos del cultivar Gardeners junto con un fruto de Cascada que también presentó agrietado durante el seguimiento de sus fluctuaciones, se intentó estudiar las condiciones del fruto en el momento de agrietado.

En cualquiera de los cultivares parece que los frutos se agrietaban en algún momento tras alcanzar el máximo diámetro de ese ciclo, según se observa en los dos primeros esquemas de la Figura 3.5, indicado con un asterisco; en el tercer esquema de la misma Figura no podría indicarse en qué momento se agrieta el fruto ya que no se observó una caída brusca en el diámetro del fruto en ningún momento. Sin embargo y atendiendo a los dos primeros esquemas, el diámetro máximo alcanzado en el último ciclo antes de agrietarse no fue superior al de los ciclos anteriores, siendo incluso menor en el fruto 1. La velocidad de crecimiento deducida a partir de la pendiente entre el

inicio de crecimiento y el máximo diámetro frente al tiempo tampoco fue diferente en el ciclo inmediatamente antes del agrietado y ciclos anteriores (Figura 3.6).

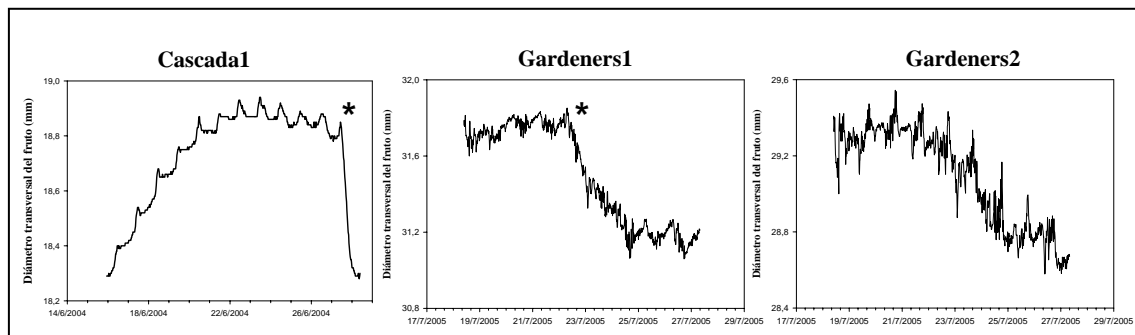


Figura 3.5: Evolución del diámetro frente al tiempo de frutos de Cascada y Gardeners Delight que se mostraban agrietados en el momento de retirar el sensor de crecimiento.

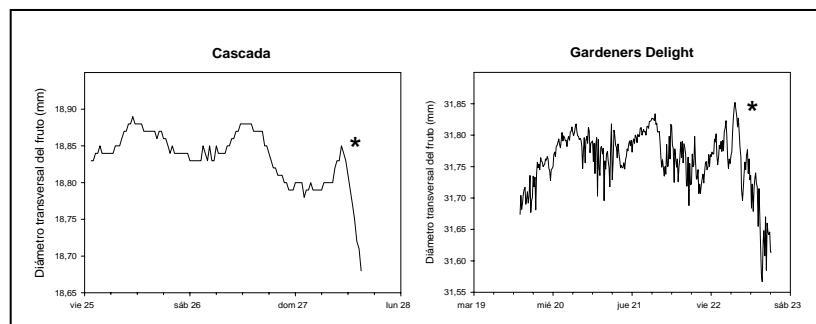


Figura 3.6: Detalle de los frutos 1 y 2 de la Figura 3.5. Se presentan los 3 ciclos anteriores al momento de agrietado del fruto, indicado mediante un asterisco.

• Agrietado poscosecha

El cultivar Cascada presentó apenas el 1% de sus frutos agrietados en la primera de las recogidas, sin registrarse más agrietado en las 4 recogidas restantes (Figura 3.7). Por su parte, el cultivar Gardeners Delight presentó una media en el porcentaje de agrietado de sus frutos a lo largo de las cinco recogidas del $28 \pm 7.9\%$, registrándose los valores más elevados en la segunda (35%) y tercera recogida (34%) y disminuyendo hacia el final del cultivo en las dos últimas recogidas (15 y 26% respectivamente).

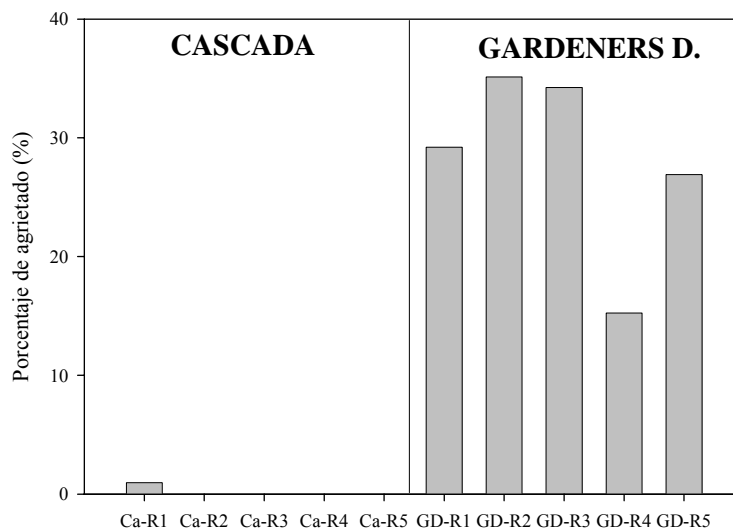


Figura 3.7: Porcentaje de agrietado obtenido en cada recogida (R1, R2, R3, R4 y R5) en los cultivares Cascada (Ca) y Gardeners Delight (GD).

• Inducción de agrietado por inmersión

Los ensayos de inducción de agrietado mediante inmersión en agua a 10° C se llevaron a cabo en las mismas fechas que la evaluación de la tasa de agrietado poscosecha y registro del peso medio del fruto. Este método de inducción de agrietado por inmersión de los frutos en agua produjo un incremento significativo en el número de frutos agrietados del cultivar menos susceptible Cascada. En el cultivar susceptible Gardeners Delight, la probabilidad de agrietado inducido registrada en cada recogida fue disminuyendo según avanzaba el cultivo (Figura 3.8). A la vez se mantuvieron frutos al aire a 10° C registrándose únicamente algún agrietado en la tercera recogida de Cascada.

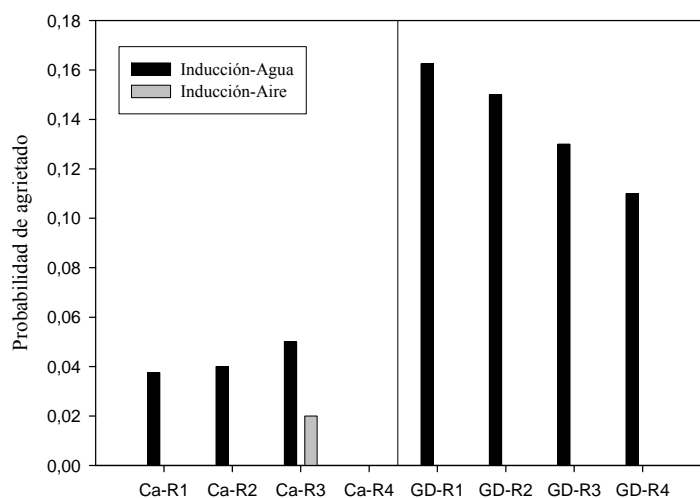


Figura 3.8: Probabilidad de agrietado al inducirlo artificialmente, incubando los frutos sumergidos en agua o al aire en cámara a 10° C durante 20 horas tras cada recogida.

1.2 Estudio morfológico de la piel del fruto en estadio verde maduro y rojo maduro

La piel del fruto de tomate presentó una cutícula en su parte más externa del pericarpo que rodeaba la primera capa de células epidérmicas, penetrando incluso hasta la segunda o tercera capa dependiendo del genotipo en cuestión (Figura 3.9). Bajo las células epidérmicas se encontraban entre tres y cuatro capas de células que constituían el colénquima, generalmente con células de forma más alargada, y debajo de ellas aparecía el parénquima, con células de mayor tamaño.

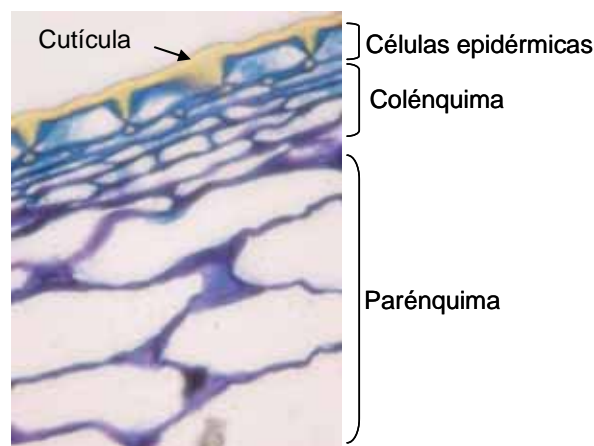
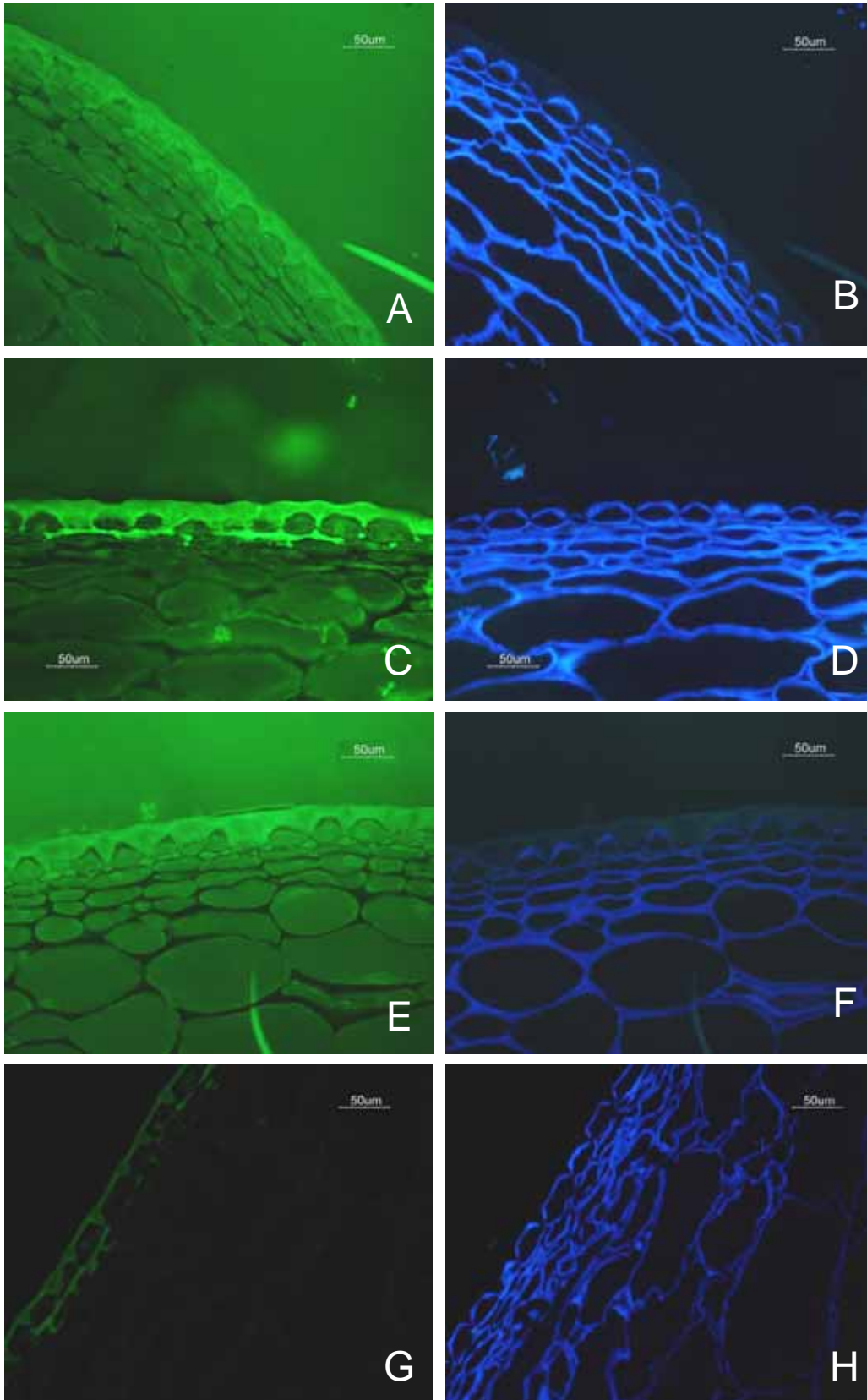


Figura 3.9: Microfotografía de un corte teñido con azul de toluidina a 40X de pericarpo de un fruto rojo maduro. Se indican las distintas partes que componen el pericarpo.

Para la visualización mediante microscopía de la cutícula se empleó Auramina O, colorante que emite fluorescencia cuando se excita con luz roja y tiñe específicamente material lipídico, revelando la presencia de la cutícula en color verde (Figura 3.10). El colorante empleado para estudiar la morfología de las células epidérmicas fue Calcoflúor, compuesto que interacciona con la celulosa y emite fluorescencia cuando se excita con luz ultravioleta, revelando aquellas zonas donde hay polisacáridos, como es el caso de las paredes celulares, en tono celeste.

Figura 3.10 (página siguiente): Microfotografías de pericarpo de fruto de tomate de los cultivares Cascada (A-D) y Gardeners Delight (E-H) 20X. A y E: Tinción con Auramina O de pericarpo Verde Maduro (VM); B y F: Tinción con Calcoflúor de pericarpo VM; C y G: Tinción con Auramina O de pericarpo Rojo Maduro (RM); D y H: Tinción con Calcoflúor de pericarpo RM.



La cutícula del fruto de tomate disminuía de grosor cuando el fruto pasaba de estadio verde maduro (VM) a rojo maduro (RM), tanto en Cascada (Figura 3.10 A-C) como en Gardeners (Figura 3.10 E-G). Así, el grosor de la parte más externa de la cutícula del fruto verde maduro, en la zona más estrecha, disminuía significativamente de grosor en ambos cultivares al madurar el fruto (Tabla 3.3). Cuando se consideró el grosor máximo de la cutícula, la parte más externa de ella junto con las invaginaciones, también se observó una disminución al pasar de verde maduro a rojo maduro, pero las diferencias no llegaron a ser significativas.

Tabla 3.3: Medias y desviación típica del grosor e invaginación de la cutícula de frutos de Cascada y Gardeners Delight de los estadios definidos como verde maduro (VM) y rojo maduro (RM). Para cada parámetro, los valores no conectados con la misma letra son significativamente diferentes con $p \geq 0.05$ según el test t Student.

	CASCADA				GARDENERS DELIGHT			
	VM		RM		VM		RM	
Grosor (μm)	10.8 \pm 0.2	A B	8.5 \pm 0.2		8.8 \pm 0.5	A B	5.4 \pm 0.1	
Invaginación (μm)	38.6 \pm 1.1	A A	36.7 \pm 1.2		30.8 \pm 0.8	A A	28.2 \pm 0.8	

Hubo diferencias significativas entre la cutícula de los dos cultivares (Tabla 3.3). Así, la cutícula de Cascada al final de la maduración del fruto resultó ser un 36 % más gruesa en su parte más estrecha y se invaginaban en la epidermis hasta un 23 % más que la cutícula de Gardeners Delight en el mismo estadio de maduración. Este nivel de penetración correspondía a la segunda y tercera capa de células en el caso del cultivar Cascada, mientras que en Gardeners Delight, la cutícula penetraba bajo la primera capa de células epidérmicas y rara vez alcanzaba la segunda (Figura 3.10 A, C, E y G).

Las medidas para determinar el tamaño celular se efectuaron en cortes perpendiculares a la superficie externa. Dan en conjunto una idea del tamaño celular pero no se deben interpretar aisladamente como cabría hacerlo si las células se hubiesen cortado por sus círculos máximos. Las células epidérmicas aumentaron de tamaño en el paso de estadio verde maduro a rojo maduro, tal y como se observa en la Figura 3.10 B-D y F-H y se presenta en la Tabla 3.4. En el cultivar Cascada, se detectó un aumento significativo del área celular medida en la superficie de corte de las células epidérmicas y un aumento del eje longitudinal o longitud de la célula que indicarían un mayor tamaño de las mismas. Este cambio de tamaño se tradujo fundamentalmente en que la

forma pasaba de células epidérmicas más o menos redondeadas en estadio verde maduro a células más alargadas o aplanadas en el estadio rojo maduro.

Tabla 3.4: Medias y desviación típica de los parámetros de tamaño de células epidérmicas de frutos de Cascada y Gardeners Delight de los estadios definidos como verde maduro (VM) y rojo maduro (RM). Para cada parámetro, los valores no conectados con la misma letra son significativamente diferentes con $p \geq 0.05$ según el test t Student.

	CASCADA				GARDENERS DELIGHT			
	VM		RM		VM		RM	
Area (μm^2)	679 \pm 17	B A	877 \pm 33		754 \pm 32	A A	733 \pm 52	
Perímetro (μm)	146 \pm 6	A A	147 \pm 7		128 \pm 2	B A	152 \pm 42	
Longitud (μm)	38.9 \pm 1.6	A A	43.8 \pm 2.2		40.3 \pm 1.1	A A	44.7 \pm 2.2	
Ancho (μm)	25.9 \pm 0.3	A B	24.1 \pm 0.6		24.8 \pm 0.6	A B	22.3 \pm 0.4	

Por su parte, en el cultivar Gardeners Delight incluido también en la Tabla 3.4, el aumento de tamaño vino reflejado por el perímetro de la célula y por la longitud aunque disminuyó ligeramente su anchura. De este modo, y al igual que se ha descrito previamente para Cascada, el aumento de tamaño de las células epidérmicas del estadio rojo maduro con respecto al verde maduro vino acompañado por un cambio en su morfología que se hizo más aplanada.

Las células epidérmicas del cultivar tolerante Cascada presentaron en estadio rojo maduro mayor tamaño que las del cultivar susceptible Gardeners, tal y como indicó el área de la superficie de corte y la anchura celular (Tabla 3.4).

1.3 Estudio de las propiedades mecánicas de epidermis y cutícula de frutos de tomate en estadios verde maduro y rojo maduro

1.3.A Epidermis

Para estudiar el comportamiento mecánico de la epidermis del fruto de tomate se eligieron los mismos estadios verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) ya presentados para el estudio morfológico de los cultivares Cascada y Gardeners Delight. Para describir el comportamiento mecánico se llevaron a cabo dos tipos de ensayos. El primero de ellos consistió en un ensayo de fractura por tensión en el que se provocaba una grieta a la muestra y se sometía a una tensión constante, pudiendo estudiarse la propagación de ésta a través del tejido mediante el trabajo de fractura realizado (W), módulo elástico (E) y esfuerzo de fractura o esfuerzo máximo (σ_b). En segundo lugar, se realizó un ensayo de carga-descarga secuencial, consistente en la aplicación de

sucesivos ciclos de deformación y relajación de la muestra aplicando fuerzas crecientes en cada ciclo. Este ensayo nos permitió estudiar el módulo elástico como índice de la rigidez adquirida en cada ciclo y la deformación plástica acumulada en el tejido.

• Ensayo de fractura por tensión

Los parámetros mecánicos estudiados en los estadios de maduración verde maduro y rojo maduro en ambos cultivares indicaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta mecánica ofrecida por ambos cultivares. Así, en el cultivar Cascada (Tabla 3.5) los valores del módulo elástico en estadio VM, máximo esfuerzo de fractura y trabajo de fractura fueron superiores a los obtenidos para el estadio RM, siendo estos valores estadísticamente diferentes en el caso del esfuerzo máximo y el trabajo de fractura.

Tabla 3.5: Parámetros mecánicos de epidermis de frutos VM y RM del cultivar Cascada. Las letras A y B indican nivel de diferencia estadística significativa según el test t Student aplicado a cada parámetro y entre ambos estados de desarrollo del fruto. El número de réplicas osciló entre 7 y 12.

	CASCADA - VM		CASCADA- RM	
Módulo elástico (MPa)	40.39 ± 3.03	A	A	35.35 ± 3.78
Máximo esfuerzo (MPa)	9.7 ± 0.3	A	B	4.1 ± 0.3
Trabajo de fractura (J/m²)	2205 ± 172	A	B	1096 ± 106

Del mismo modo, los valores del esfuerzo máximo y el trabajo de fractura asociados al cultivar Gardeners Delight (Tabla 3.6) fueron estadísticamente superiores en estadio VM con respecto al estadio RM, sin mostrar diferencias en el módulo elástico.

Tabla 3.6: Parámetros mecánicos de epidermis de frutos VM y RM del cultivar Gardeners Delight. Las letras A y B indican nivel de diferencia estadística significativa según el test t Student aplicado a cada parámetro y entre ambos estados de desarrollo del fruto. El número de réplicas osciló entre 7 y 12.

	GARDENERS - VM		GARDENERS- RM	
Módulo elástico (MPa)	19.29 ± 2.52	A	A	22.37 ± 3.31
Máximo esfuerzo (MPa)	4.19 ± 0.41	A	B	1.52 ± 0.15
Trabajo de fractura (J/m²)	825 ± 111.44	A	B	306 ± 34.20

Si comparamos a continuación estadísticamente los valores de los parámetros estudiados en epidermis de frutos del estadio RM de ambos cultivares (Tabla 7), se observa que el cultivar tolerante o resistente al agrietado Cascada presentó valores de módulo elástico, esfuerzo máximo y trabajo de fractura significativamente superiores a

los que definieron la epidermis de los frutos RM del cultivar susceptible al agrietado Gardeners Delight.

Tabla 3.7: Parámetros mecánicos de epidermis de frutos de Cascada y Gardeners Delight. Las letras A y B indican nivel de diferencia estadística significativa según el test t Student aplicado a cada parámetro y entre ambos genotipos. El número de réplicas osciló entre 7 y 12.

	CASCADA- RM		GARDENERS- RM	
Módulo elástico (MPa)	35.35 ± 3.78	A B	22.37 ± 3.31	
Máximo esfuerzo (MPa)	4.1 ± 0.3	A B	1.5 ± 0.1	
Trabajo de fractura (J/m²)	1096 ± 106	A B	306 ± 34	

• Ensayo de carga-descarga secuencial

Los ensayos de carga-descarga secuencial también mostraron diferencias entre ambos estadios de maduración. El incremento secuencial del módulo elástico observado en cada ensayo realizado, paralelo al incremento de fuerza de tensión aplicada, indicó un aumento en la rigidez del tejido en cada ciclo de extensión y relajación.

En la Figura 3.11, se presentan los valores medios de los módulos elásticos y de la deformación plástica de la piel de frutos del estadio VM y RM del cultivar Cascada calculados para cada ciclo frente a la correspondiente fuerza de tensión aplicada. Se observó que, para fuerzas de tensión superiores a 0.3N, la piel del fruto RM se endurecía más (mayores valores de módulo elástico a igual fuerza de tensión aplicada) y a mayor velocidad, según indica la pendiente de la recta (Figura 3.11.A). Por otro lado, la deformación plástica acumulada en el tejido de fruto RM fue significativamente superior a la deformación acumulada en el fruto VM durante todo el ensayo (Figura 3.11.B). Mientras la evolución del módulo elástico presentó dos pendientes claras, especialmente para el fruto RM, la deformación plástica acumulada mostró una relación asintótica hacia el final de la curva.

No se observaron diferencias significativas entre los valores medios de los módulos elásticos de la piel de frutos VM y RM del cultivar Gardeners Delight, tal y como se muestra en la Figura 3.12.A. Sin embargo, la deformación plástica acumulada en fruto RM fue significativamente superior a la deformación acumulada en fruto VM en cada ciclo estudiado (Figura 3.12.B). Cabe comentar la existencia de una mayor variabilidad en las muestras RM con respecto a VM, el cual se mostró reiteradamente como un tejido más estable.

En la Figura 3.13.A se muestra la evolución del módulo elástico a lo largo de todo el ensayo de la piel de frutos RM de ambos cultivares estudiados. Para fuerzas de tensión inferiores a 0.3 N, los módulos de Cascada fueron inferiores en valor a los módulos elásticos de Gardeners Delight aunque sin diferencias significativas, mientras que para fuerzas mayores de 0.3 N, los módulos elásticos de Cascada tendían a superar los módulos de Gardeners e incluso a presentar una mayor velocidad de deformación del tejido, parámetro estimado por la pendiente de la recta entre los valores de E y la fuerza aplicada. Si atendemos a la deformación plástica acumulada (Figura 3.13.B), las diferencias entre ambos cultivares sólo fueron significativas para fuerzas de tensión superiores a 0.5 N, dada la variabilidad de las muestras RM del cultivar Gardeners Delight.

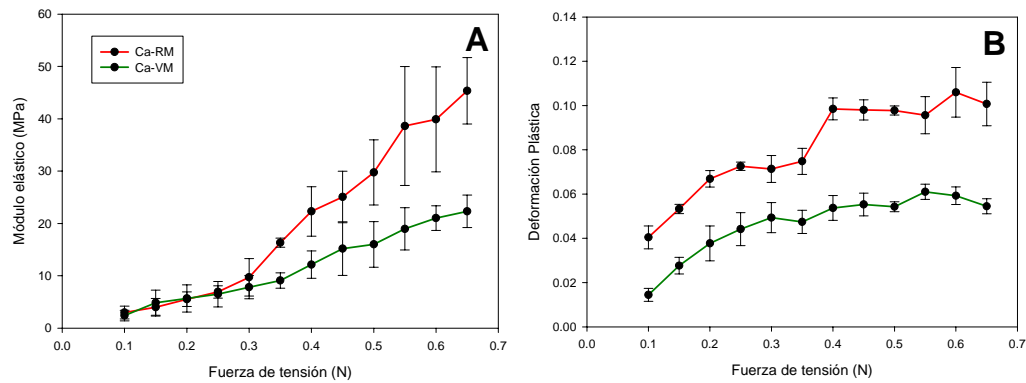


Figura 3.11: Valores medios del módulo elástico (A) y la deformación plástica (B) de la epidermis de frutos del estadio rojo maduro (línea roja) y verde maduro (línea verde) del cultivar Cascada derivados de un ensayo de carga y descarga secuencial con incremento progresivo en el valor de carga.

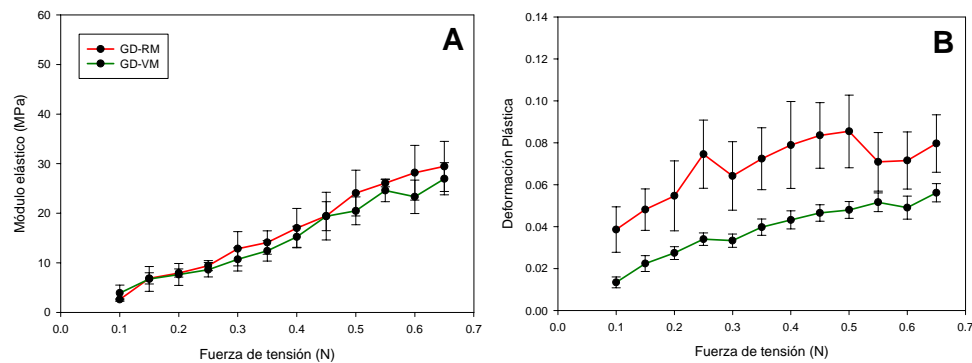


Figura 3.12: Valores medios del módulo elástico (A) y la deformación plástica (B) de la epidermis de frutos del estadio rojo maduro (línea roja) y verde maduro (línea verde) del cultivar Gardeners Delight, derivados de un ensayo de carga y descarga secuencial con incremento progresivo en el valor de carga.

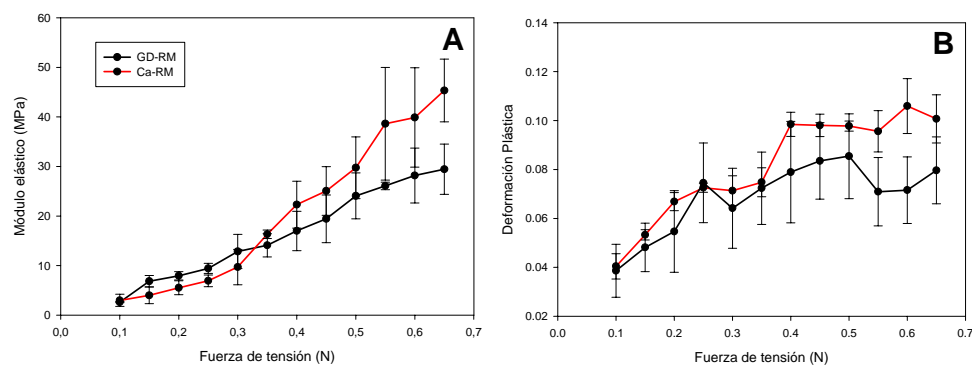


Figura 3.13: Valores medios del módulo elástico (A) y la deformación plástica (B) de la epidermis de frutos del estadio rojo maduro de los cultivares Cascada (línea roja) y Gardeners Delight (línea negra), derivados de un ensayo de carga y descarga secuencial con incremento progresivo en el valor de carga.

1.3. B Cutícula

Cuando se aplicó el ensayo de fractura por tensión a muestras de cutículas aisladas de frutos del estadio rojo maduro de ambos cultivares, se observó que se reproducían las diferencias descritas en el comportamiento mecánico de la piel entre ambos cultivares (Tabla 3.8). La cutícula del cultivar tolerante Cascada resultó ser más rígida que la cutícula del cultivar susceptible Gardeners Delight, es decir, presentó una mayor resistencia a la deformación según indicaban los valores medios del módulo elástico; fue necesario aplicar un mayor esfuerzo de fractura y, por último, realizar un mayor trabajo para propagar la grieta.

Tabla 3.8: Parámetros mecánicos de la cutícula de frutos del estadio rojo maduro de los cultivares Cascada y Gardeners Delight. Se presentan los valores medios junto al error típico asociado. Las letras A y B indican nivel de diferencia estadística según el test t Student aplicado a cada parámetro y entre ambos cultivares. El número de réplicas osciló entre 7 y 12.

	CASCADA - RM		GARDENERS - RM	
Módulo elástico (MPa)	359.78 ± 59.17	A	B	207.58 ± 18.01
Máxima deformación (%)	0.05 ± 0.003	A	B	0.03 ± 0.003
Máximo esfuerzo (MPa)	12.9 ± 3.5	A	B	5.6 ± 1.6
Trabajo de fractura (J/m²)	1047 ± 152	A	B	250 ± 65

La comparación entre los tres parámetros mecánicos (E , W y σ_b) derivados de la aplicación del ensayo de fractura por tensión entre cutícula aislada y piel de frutos del estadio RM indicó que la cutícula era considerablemente más rígida que la piel del fruto (Tabla 3.9), alrededor de 10 veces más, en cualquiera de los dos cultivares analizados. El esfuerzo de fractura también fue superior en la cutícula (entre 3 y 4 veces mayor) mientras que el trabajo de fractura resultó similar.

Tabla 3.9: Parámetros mecánicos de la epidermis y la cutícula de frutos del estadio RM de los cultivares Cascada y Gardeners Delight. Se presentan los valores medios junto al error típico asociado. Las letras A y B indican nivel de diferencia estadística según el test t Student aplicado a cada parámetro dentro de cada cultivar. El número de réplicas osciló entre 7 y 12.

	Epidermis Ca-RM		Cutícula Ca-RM	
Módulo elástico (MPa)	35.35 ± 3.78	B	A	359.78 ± 59.17
Fuerza máxima (N)	1.19 ± 0.24	A	B	0.31 ± 0.08
Máximo esfuerzo (MPa)	4.1 ± 0.3	B	A	12.9 ± 3.5
Trabajo de fractura (J/m²)	1096 ± 106	A	A	1047 ± 152
	Epidermis GD-RM		Cutícula GD-RM	
Módulo elástico (MPa)	22.37 ± 3.31	B	A	207.58 ± 18.01
Fuerza máxima (N)	0.38 ± 0.12	A	B	0.16 ± 0.07
Máximo esfuerzo (MPa)	1.5 ± 0.1	B	A	5.6 ± 1.6
Trabajo de fractura (J/m²)	306 ± 34	A	A	250 ± 65

2. Caracterización de los cultivares estudiados bajo condiciones salinas

2.1 Evaluación de campo

Las plantas de los tratamientos con alta conductividad eléctrica presentaron un desarrollo en cuanto a magnitud de la planta ligeramente retardado con respecto a los testigos correspondientes. Las curvas de crecimiento de los frutos de este tratamiento se llevaron hasta los 67 dda (Figura 3.14) en paralelo con sus correspondientes tratamientos testigos, presentados en el punto 1.1. El cambio de coloración se registró a partir de los 37 dda en Cascada a 6.5 dSm^{-1} y de los 34 dda en Gardeners Delight. El tono rojo alcanzado al final de la maduración fue más intenso en los frutos de estos tratamientos salinos que en los testigos.

El diámetro transversal de los frutos de Cascada 6.5 dSm^{-1} alcanzado al final de la maduración fue de $31.9 \pm 1.8 \text{ mm}$, mientras que el peso medio fue de $13.6 \pm 1.9 \text{ g}$, lo que supuso un 11% en la reducción de diámetro transversal y un 33% en la reducción del peso con respecto a Cascada testigo. Por su parte, los frutos de Gardeners Delight 6.5 dSm^{-1} alcanzaron un diámetro transversal medio al final de la maduración de $34.1 \pm 1.2 \text{ mm}$ y un peso medio de $13.5 \pm 3.2 \text{ g}$, siendo en este caso los porcentajes de reducción de estos parámetros con respecto a sus testigos del 6% para el diámetro transversal y del 19% para el peso medio del fruto.

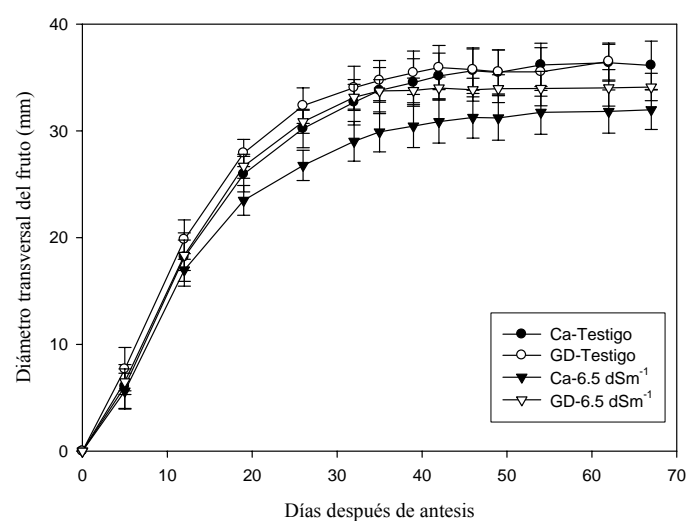


Figura 3.14: Curvas de crecimiento de frutos de Cascada y Gardeners Delight regados con solución testigo y solución salina (6.5 dSm^{-1}). Medias del diámetro transversal de 25 frutos de cada variedad y tratamiento junto a la desviación típica correspondiente.

• Evaluación de agrietado poscosecha

Los frutos de Cascada del tratamiento salino (6.5 dSm^{-1}) no presentaron ningún fruto agrietado en poscosecha. El cultivar Gardeners Delight redujo el agrietado total de los frutos evaluados en cada recogida en el tratamiento salino con respecto al testigo tal y como se observa en la Figura 3.15. Si la media del porcentaje de frutos agrietados en poscosecha en el genotipo Gardeners Delight en tratamiento testigo era del $28 \pm 7.9\%$ tal y como se exponía en el apartado 1.1, con el tratamiento salino este porcentaje se redujo hasta un $16 \pm 7.6\%$, lo que supuso una reducción del agrietado en poscosecha del 42% en el cultivar susceptible.

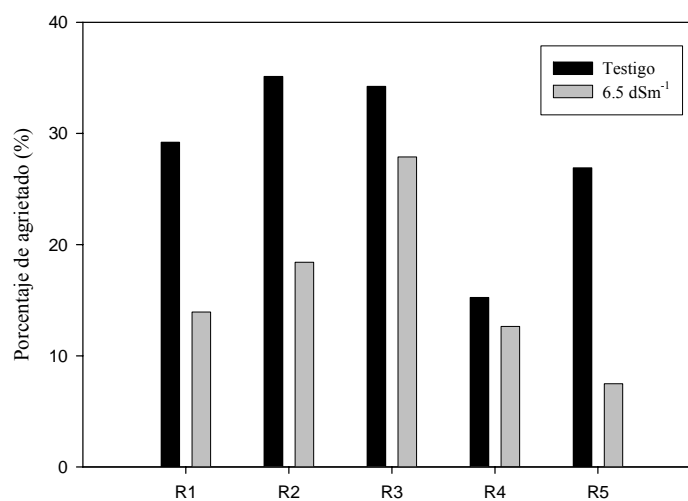


Figura 3.15: Comparación del porcentaje de agrietado de los tratamientos testigo y de alta conductividad eléctrica del genotipo Gardeners Delight en cada recogida.

• Inducción de agrietado por inmersión

Durante el ensayo de inducción de agrietado por inmersión no se detectó agrietado en los frutos procedentes de los tratamientos salinos en ninguna de las recogidas en que se midió este parámetro.

2.2. Estudio morfológico de la piel del fruto en estadio rojo maduro bajo tratamiento salino

La aplicación de NaCl en la solución de riego aumentó el grosor de cutícula en ambos cultivares, tal y como se reflejó en la Tabla 3.10. Así, la cutícula de frutos del cultivar Cascada del estadio rojo maduro con tratamiento salino fue un 24% más gruesa que la cutícula de frutos testigo, sin presentar diferencias significativas en cuanto al grado de invaginación. En el caso del cultivar Gardeners Delight, el grosor de cutícula

de fruto rojo con tratamiento salino fue un 19% mayor que el grosor del testigo correspondiente; al igual que en el cultivar resistente Cascada, el tratamiento salino no varió de forma significativa el grado de invaginación de la cutícula en la epidermis.

Tabla 3.10: Medias y desviación típica de los parámetros estudiados en la cutícula de frutos de Cascada y Gardeners Delight del estadio rojo maduro de tratamiento testigo (RM-T) y salino (RM-50). Para cada parámetro, los valores no conectados con la misma letra dentro de cada cultivar son significativamente diferentes con $p \geq 0.05$ según el test t Student.

	CASCADA				GARDENERS DELIGHT			
	RM-T		RM-50		RM-T		RM-50	
Grosor (μm)	8.5 \pm 0.2	B A	11.2 \pm 0.4		5.4 \pm 0.1	B A		6.7 \pm 0.2
Invaginación (μm)	36.7 \pm 1.2	A A	34.3 \pm 0.7		28.2 \pm 0.8	A A		29.2 \pm 1.0

El tratamiento salino afectó también al tamaño y morfología de las células epidérmicas. En la Tabla 3.11 se muestran los valores del área, perímetro, longitud y anchura de la célula como parámetros indicadores del tamaño celular y de su morfología.

Tabla 3.11: Medias y desviación típica de los parámetros de tamaño de células epidérmicas de frutos de Cascada y Gardeners Delight del estadio rojo maduro de tratamiento testigo (RM-T) y salino (RM-50). Para cada parámetro, los valores no conectados con la misma letra dentro de cada cultivar son significativamente diferentes con $p \geq 0.05$ según el test t Student.

	CASCADA				GARDENERS DELIGHT			
	RM-T		RM-50		RM-T		RM-50	
Area (μm^2)	877 \pm 33	A B	497 \pm 32		733 \pm 52	A B		577 \pm 17
Perímetro (μm)	147 \pm 7	A B	105 \pm 8		152 \pm 42	A A		151 \pm 6
Longitud (μm)	43.8 \pm 2.2	A B	32.9 \pm 1.3		44.7 \pm 2.2	A B		37.6 \pm 1.1
Ancho (μm)	24.1 \pm 0.6	A B	21.2 \pm 1.1		22.3 \pm 0.4	A A		21.7 \pm 0.5

En el cultivar Cascada, el tratamiento salino disminuyó significativamente el tamaño de las células epidérmicas, tal y como reflejan el área y perímetro celular. Esta disminución de tamaño se observó tanto en el eje longitudinal como en el eje transversal de la célula. Sin embargo la proporción en que afecta a cada eje es diferente, la longitud de la célula disminuyó un 25% mientras que la anchura sólo lo hizo alrededor de un 12%. Las células epidérmicas de frutos de Cascada tratados con solución salina adquirieron una forma más redondeada que las células de los frutos testigo.

En el cultivar Gardeners Delight, el efecto de la salinidad se manifestó en términos similares a como lo hizo en el cultivar resistente Cascada. Las células disminuyeron de tamaño atendiendo al valor del área celular de la superficie de corte.

Esta disminución de tamaño no fue homogénea en toda la célula sino que como en Cascada, afectó principalmente al eje longitudinal de la misma, reduciéndolo en un 16%. También en Gardeners las células epidérmicas fueron más redondeadas en los frutos procedentes de plantas regadas con agua salina.

2.3 Estudio de las propiedades mecánicas de epidermis de frutos de tomate en estadio rojo maduro bajo tratamiento salino

• Ensayo de Fractura por tensión

El tratamiento salino aplicado a las plantas de tomate en la solución de riego varió las propiedades mecánicas de la piel de los frutos estudiados en estadio RM, siendo distinta la respuesta en cada cultivar.

En la Tabla 3.12 se muestran los valores de los parámetros estudiados en frutos RM del cultivar Cascada en condiciones testigo (RM-T) y bajo tratamiento salino (RM-50). El estudio estadístico aplicado mostró que la piel del tratamiento salino presentó valores de módulo elástico, esfuerzo máximo y trabajo de fractura superiores a los valores descritos para el testigo del ensayo.

Tabla 3.12: Parámetros mecánicos de epidermis de frutos RM-T y RM-50 del genotipo Cascada. Las letras A y B indican nivel de diferencia estadística significativa según el test t Student aplicado a cada parámetro entre ambos tratamientos. El número de réplicas osciló entre 7 y 12.

	CASCADA RM-T		CASCADA RM-50	
Módulo elástico (MPa)	35.35 ± 3.78	B	A	50.34 ± 2.29
Fuerza Máxima (N)	1.2 ± 0.1	B	A	1.6 ± 0.1
Máximo esfuerzo (MPa)	4.1 ± 0.3	B	A	6.6 ± 0.4
Trabajo de fractura (J/m ²)	1096 ± 106	B	A	2276 ± 198

Sin embargo, en el cultivar Gardenes Delight no se registraron diferencias significativas entre el testigo y el tratamiento salino en los parámetros extraídos del ensayo de fractura por tensión tal y como se muestra en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13: Parámetros mecánicos de epidermis de frutos RM-T y RM-50 del genotipo Gardeners Delight. Las letras A y B indican nivel de diferencia estadística significativa según el test t Student aplicado a cada parámetro entre ambos tratamientos. El número de réplicas osciló entre 7 y 12.

	GARDENERS RM-T		GARDENERS RM-50	
Módulo elástico (MPa)	22.37 ± 3.31	A	A	15.95 ± 2.64
Fuerza Máxima (N)	0.38 ± 0.04	A	A	0.37 ± 0.01
Máximo esfuerzo (MPa)	1.5 ± 0.2	A	A	1.4 ± 0.1
Trabajo de fractura (J/m ²)	306 ± 34	A	A	295 ± 42

- **Ensayo de carga-descarga secuencial**

No se observaron diferencias en la rigidez ni en la velocidad de endurecimiento de la piel de frutos del estadio RM de tratamiento salino y testigo en el cultivar tolerante Cascada en el rango de fuerzas aplicadas, según indicaron los valores medios de los módulos elásticos presentados en la Figura 3.16.A. En cambio, la deformación plástica acumulada en la piel de los frutos testigos fue significativamente superior con respecto al salino a partir de fuerzas superiores a 0.1 N (Figura 3.16.B).

En el cultivar susceptible Gardeners Delight, los valores medios de los módulos elásticos de la piel de los frutos del tratamiento salino fueron superiores a los registrados para la piel de los frutos testigos en cualquiera de las fuerzas de tensión aplicadas (Figura 3.17.A). Además, la velocidad a la que se deforma el tejido, adquiriendo mayor rigidez y endureciéndose, fue superior en la piel de frutos de tratamiento salino, especialmente para fuerzas de tensión superiores a 0.15 N. Aunque la deformación plástica acumulada en la piel de los frutos del tratamiento testigo parecía ser superior a fuerzas superiores a 0.2 N con respecto al tratamiento salino, las diferencias no fueron significativas (Figura 3.17 B).

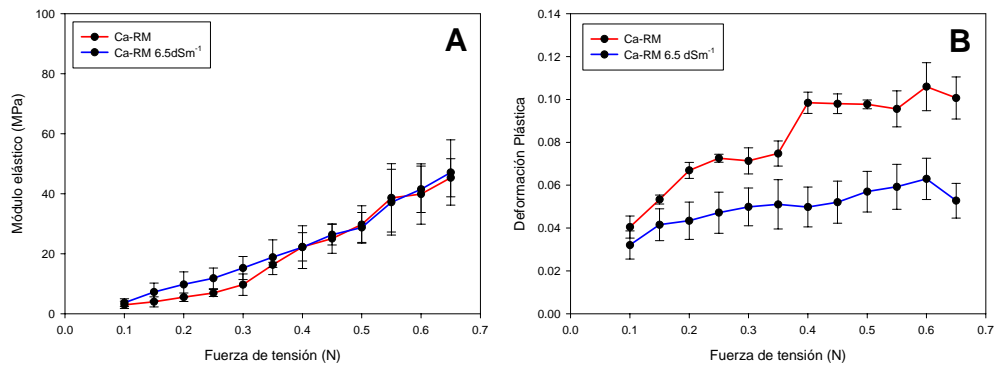


Figura 3.16: Valores medios del módulo elástico (A) y la deformación plástica (B) de la epidermis de frutos del estadio rojo maduro del grupo testigo (línea roja) y tratamiento salino (línea azul) del cultivar Cascada, derivados de un ensayo de carga y descarga secuencial con incremento progresivo en el valor de carga.

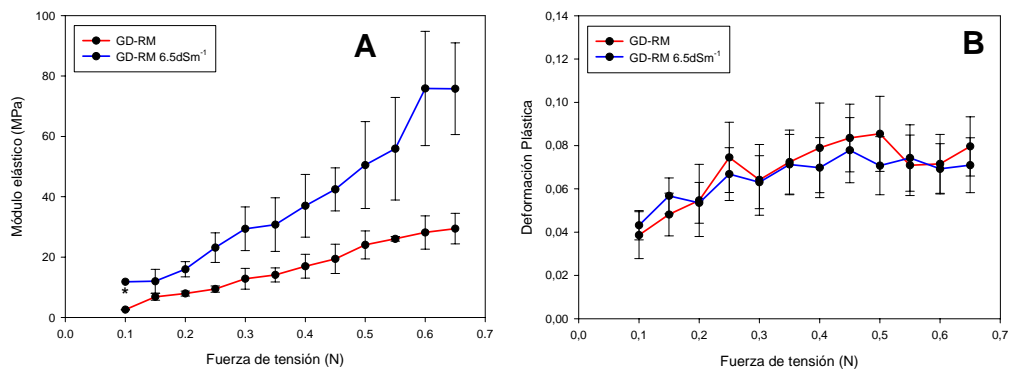


Figura 3.17: Valores medios del módulo elástico (A) y la deformación plástica (B) de la epidermis de frutos del estadio rojo maduro del grupo testigo (línea roja) y tratamiento salino (línea azul) del cultivar Gardeners Delight, derivados de un ensayo de carga y descarga secuencial con incremento progresivo en el valor de carga.

3. Influencia de la temperatura, humedad relativa y radiación sobre características de la cutícula

Se determinaron los parámetros peso específico y grosor de cutícula aislada de frutos de tomate recolectados en estadio rojo maduro en tres épocas diferentes de cultivo: cultivo 2001 de primavera-verano, cultivo 2002 de otoño-invierno y cultivo 2004 de invierno-primavera, cuyos valores se presentan en la Tabla 3.14. Se observa cómo estos parámetros variaron según la estacionalidad.

Tabla 3.14: Peso específico ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y grosor de cutícula (μm) de los cultivares Cascada y Gardeners Delight correspondientes a cultivos en tres temporadas (media \pm desviación típica). Para cada parámetro, los valores no conectados con la misma letra son significativamente diferentes con $p \geq 0.05$ según el test de Tukey-Kramer.

Año	CASCADA				GARDENERS DELIGHT			
	Peso específico ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		Grosor (μm)		Peso específico ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		Grosor (μm)	
2001	1916 \pm 79	A	7.2 \pm 0.2	A	1478 \pm 16	A	5.9 \pm 0.5	B
2002	1488 \pm 76	B	7.8 \pm 0.8	A	1127 \pm 23	B	6.3 \pm 0.5	A
2004	1579 \pm 39	B	7.4 \pm 0.3	A	1067 \pm 65	B	6.0 \pm 0.1	B

Realizando el estudio comparativo de los valores obtenidos en cultivos llevados a cabo en distintas épocas de los cultivares Cascada y Gardeners Delight (Tabla 3.14), se observó que el valor del peso específico en el cultivo 2001 fue significativamente superior que los valores obtenidos en los cultivos de 2002 y 2004, donde no hubo diferencia significativa. Cuando se analizó el grosor de cutícula aislada en cada caso, se observó que el mayor valor absoluto de grosor correspondía al estimado en el cultivo 2002 y el mínimo en el 2001, pero sin diferencias.

Para comprobar si estas diferencias observadas en cultivos de distintas épocas pudieran tener relación alguna con los factores ambientales característicos de cada estación (Temperatura, Humedad Relativa y Radiación), se analizaron los valores medios correspondientes en cada caso al mes anterior a la recogida del fruto en estadio rojo maduro para el análisis posterior de su cutícula aislada. En la Tabla 3.15 se presentan los valores máximos y mínimos de temperatura y humedad relativa registrados en el interior del invernadero en cada época, así como los niveles de radiación registrados en el exterior del invernadero. Los valores máximos de temperatura y radiación se registraron en el cultivo 2001, siendo estadísticamente

diferentes a los registrados en los cultivos 2002 y 2004. No se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de humedad relativa registrada en el invernadero en distintas épocas del año.

Tabla 3.15: Valores medios de Temperatura máxima y mínima diaria (T^a Max y Min), Humedad Relativa máxima y mínima diaria (HR Max y Min) y Radiación Global Total (RGT) y Radiación Difusa Total (RDT) acumuladas correspondientes al mes previo a la recogida del fruto. Para cada parámetro, los valores no conectados con la misma letra son significativamente diferentes con $p \geq 0.95$ según el test de Tukey-Kramer.

Año	T^a Max (°C)		T^o Min (°C)		HR Max (%)		HR Min (%)		RGT (Decenas de KJ/m ²)		RDT (Decenas de KJ/m ²)	
2001	26.2	A	17.2	A	94.2	A	66.3	A	83937	A	21054	A
2002	18.7	B	11.0	B	93.0	A	60.5	A	25906	C	8593	C
2004	18.7	B	11.0	B	94.1	A	62.0	A	57382	B	15446	B

Analizando en conjunto la información presentada en las Tablas 3.14 y 3.15, se observó que temperatura y radiación variaban en el mismo sentido que el peso específico de la cutícula del fruto de tomate, es decir, tanto las cutículas aisladas del cultivar Cascada como del cultivar susceptible Gardeners Delight presentaban un valor de peso específico mayor en los periodos de mayor temperatura ambiente. Atendiendo al grosor de cutícula se intuía que en épocas de mayor temperatura, los frutos parecían tender a desarrollar una cutícula más delgada aunque las diferencias no fueron significativas. No parece que la radiación global o difusa o la humedad relativa tengan relación con peso específico o grosor de cutícula, aunque la radiación global podría tenerla suponiendo la existencia de un umbral que estaría situado entre los niveles de radiación de 2004 y 2001.

DISCUSIÓN - I

1. Caracterización de los cultivares estudiados en condiciones testigo

1.1 Evaluación de campo

• Crecimiento y desarrollo

No se observó diferencia en el diámetro final alcanzado en los frutos rojos maduros de los cultivares resistente (Cascada: 36.1 ± 2 mm) y susceptible (Gardeners Delight: 36.5 ± 1.7 mm) al agrietado al final de la curva de crecimiento. Existen diversos estudios que relacionan el tamaño del fruto con la susceptibilidad al agrietado entre distintas variedades. Según Considine y Brown (1981), el fruto incrementa su tamaño conforme mayor fuerza física es aplicada contra la epidermis, lo que permite un incremento en la susceptibilidad al agrietado; es por esto que el agrietado se correlaciona positivamente, en algunos casos, con el tamaño del fruto (Koske y col., 1980; Emmons y Scott, 1998a). Sin embargo, estudios realizados por Ehret y col. (1993) han mostrado que no existe una clara relación entre el tamaño de los frutos y la tasa de crecimiento con la susceptibilidad o resistencia al agrietado. En nuestro caso, cultivar susceptible y resistente presentan frutos en estadio rojo maduro con similar diámetro transversal, y por tanto, de igual tamaño, por lo que constituyen un excelente material para el estudio del agrietado ya que en ellos se elimina la posible variabilidad atribuible al tamaño del fruto.

El crecimiento del fruto de tomate sigue una curva sigmoideal desde la fecundación del ovario hasta el estadio rojo maduro (Figura 3.2). Aunque no se observa diferencia en la tasa o ritmo de crecimiento de los frutos registrados en ambos cultivares, el cambio de coloración apareció antes en el cultivar susceptible (35 dda) que en el resistente (40 dda) al cultivarlos sin sal. Está documentado que este proceso puede abarcar entre 49 y 70 días según el cultivar (Dorais y col., 2004), y que puede estructurarse en tres fases: una primera fase de crecimiento lento del fruto (10% del peso final) y división celular muy activa, que llega hasta los 14-21 días después de anthesis (dda); una segunda fase de crecimiento rápido del fruto y expansión celular, donde la mayor parte del peso del fruto se acumula al final del estadio verde maduro (21-35 dda); una tercera fase caracterizada por un crecimiento lento e intensos cambios metabólicos característicos del proceso de maduración. El cese de aporte de asimilados ocurre diez días después del cambio de coloración (Ho y Hewitt 1986).

El peso medio de los frutos rojos maduros de Cascada registrado a lo largo de 5 recogidas fue mayor que para Gardeners Delight aunque sin diferencias significativas debido a los altos errores de estima. Cabe comentar que la fecha en que se determinó el diámetro transversal máximo de los frutos de Gardeners Delight (15 Junio) y Cascada (20 Junio) coincide con la evaluación del peso medio del fruto correspondiente a la tercera recogida en el caso del cultivar Gardeners (15 Junio: 16.7 g de peso medio de fruto), y con los días intermedios entre la tercera y cuarta recogida para el cultivar Cascada (15 Junio: 19.8 g; 22 Junio: 22.9 g). El hecho de presentar el mismo diámetro final y diferencia en el peso alcanzado en la fecha aproximada explicaría por qué los frutos de Cascada suelen presentarse de una forma más turgente que los de Gardeners Delight. Se observó una disminución de peso del fruto hacia el final de la cosecha en ambos cultivares, si bien esta disminución de peso fue más gradual en Gardeners Delight desde la segunda recogida.

• Ritmos circadianos de crecimiento

La variación intradía en el diámetro de los frutos indicó una relación inversa entre temperatura y diámetro (Figura 3.4). Los cambios en las fluctuaciones diarias de diámetro son causados por cambios en el estado de hidratación del fruto durante el día (Aloni y col., 1999), el cual en parte está marcado con las condiciones externas de humedad y temperatura. Si en el pedicelo del fruto se hubiese formado una capa de abscisión estanca, la variación del diámetro hubiese sido regida por la dilatación y contracción inherente a los cambios diarios de temperatura. Que la variación en diámetro fuese inversa a la de la temperatura sugiere que durante el periodo de medidas había un intercambio de fluidos entre la planta y el fruto a través del pedicelo y que la capa de abscisión no impedía ese movimiento. Se estaría en los 10 días posteriores al inicio del cambio de color en los que, según Ho y Hewitt (1986), siguen aportándose al fruto agua y asimilados. En este periodo de escaso o nulo crecimiento diametral del fruto, las variaciones de diámetro medidas serían explicadas por el déficit hídrico en la planta. En las horas más calurosas del día la planta sería incapaz de absorber por la raíz el agua que la atmósfera le demandaba, recurriría al agua de los tejidos y del fruto saldría agua hasta que la presión osmótica del fruto equilibrase la demanda hídrica de las hojas. Así se explicaría la disminución de diámetro desde el amanecer hasta alcanzar la temperatura máxima. Por la tarde y noche la presión osmótica del fruto sería más

negativa que la demanda hídrica de las hojas y el fruto ganaría agua aumentando su diámetro.

La aparición de agrietado registrado en dos de los frutos estudiados tuvo lugar tras alcanzar el diámetro máximo del último ciclo, es decir, durante la noche o a primera hora de la mañana. Esto coincide con otros estudios encontrados en la bibliografía que apuntan a que la aparición de grietas tiene lugar a primeras horas de la mañana o al final de la tarde (Ohta y col., 1997), momentos en los que la tasa de crecimiento del fruto así como el flujo de savia son máximos (Sakiyama y Stevens, 1976). Así, las condiciones que favorecen el crecimiento acelerado del fruto propician a su vez la aparición de grietas. Por otro lado, las fluctuaciones de diámetro que tienen lugar en un fruto han sido correlacionadas con los cambios en el potencial hídrico del tallo (Johnson y col., 1992) y con el flujo de agua y carbono hacia el interior del fruto (Guichard y col., 2001).

Existen además trabajos que apoyan la idea de que una entrada de agua al fruto, bien por incremento en la toma desde la raíz o bien a través de la superficie del fruto, provocaría un incremento en la presión interna del fruto, considerando esto la causa principal de agrietado (Peet, 1992; Peet y Willits, 1995; Ohta y col., 1997-1998; Li y col., 2002). Sin embargo, estudios realizados sobre la presión interna del fruto no ofrecen una clara relación entre susceptibilidad al agrietado y presión interna de los lóculos (Almeida y Huber, 2001), es decir, que aquellos frutos de variedades más susceptibles presentarán una mayor presión interna que les hiciera incrementar su volumen hasta provocar la aparición de agrietado.

Atendiendo a los resultados presentados en este trabajo, a pesar de que la aparición de agrietado parece coincidir con los momentos posteriores a la máxima expansión del fruto, no se puede deducir que el diámetro alcanzado en el ciclo en que agrieta el fruto o la velocidad a la que se ha expandido el fruto sea superior que en los ciclos anteriores. Hay estudios realizados con frutos de pimiento en los que se estudia el límite de expansión del fruto cuando está en la planta en estado maduro, y cuando se somete fuera de la planta a ensayos de inmersión para provocar el agrietado (Aloni y col., 1999). Estos autores comprueban que el porcentaje de expansión que alcanza el fruto cuando está sumergido en agua es superior al que experimenta cuando se

encuentra en la planta, es decir, que el fruto no llega a desarrollar su capacidad máxima de expansión al menos en estadio maduro. Por tanto, el agrietado del fruto no podría producirse por sobrepasar el límite máximo de expansión del mismo, sino que deberían ser los ciclos diarios de expansión y contracción del fruto los que llegaran a debilitar la cutícula causando el agrietado. Comprueban además que en frutos maduros mas expuestos directamente al sol presentan fluctuaciones de diámetro superiores a las que se registran en frutos sombreados, siendo esta observación extrapolable a días soleados y nublados. Por tanto, condiciones medioambientales tales como la alta intensidad de luz o grandes cambios de temperatura diaria podrían incrementar las variaciones en los ciclos de expansión-contracción del fruto y potenciar por tanto el agrietado (Peet, 1992; Aloni y col., 1999).

• **Agrietado poscosecha**

Mientras que el cultivar Cascada, considerado tolerante o resistente al agrietado, presentó tan sólo el 1% de los frutos recolectados agrietados en la primera recogida, sin presentar ningún fruto agrietado en las 4 recogidas restantes, el cultivar susceptible Gardeners Delight presentó un porcentaje medio de agrietado poscosecha de $28 \pm 7.9\%$ en las cinco recogidas evaluadas. Cabe destacar la disminución del porcentaje de agrietado en la cuarta recogida con respecto a la recogida inicial; esto coincidió a su vez con una disminución del peso medio del fruto. Sin embargo, este porcentaje vuelve a aumentar en la quinta recogida, coincidiendo con eventos de lluvia en los días previos a la recogida. Estos resultados corroboran los estudios previos en los que Cascada fue menos susceptible al agrietado que Gardeners.

El método de inducción de agrietado llevado a cabo los mismos días de las cuatro primeras recogidas de frutos reprodujo las diferencias en susceptibilidad al agrietado entre ambos cultivares. Así, Cascada mostró una media del 4% en las tres primeras recogidas en los grupos de frutos que se sumergieron en agua a 10° C, lo cual superó al agrietado poscosecha evaluado previamente. El cultivar Gardeners Delight presentó agrietado en las cuatro recogidas en las que se llevó a cabo el método de inducción artificial del agrietado, siendo los porcentajes observados en los métodos de inducción inferiores a los detectados en el agrietado natural poscosecha. Esto podría deberse a que, a pesar de estar forzando las condiciones favorables para que tuviese lugar el agrietado mediante el método de inducción, los frutos empleados para el ensayo

serían los que no se agrietaron ni en planta ni en poscosecha, por lo que serían dentro del mismo cultivar, frutos que ofrecieron una mayor resistencia a agrietarse. Además, la temperatura a la que se evaluó el agrietado poscosecha era muy superior a la que se empleó con el agrietado inducido (10° C). En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se llevó a cabo en varias ocasiones el ensayo de inmersión a 23° C, reproduciendo la temperatura del invernadero en el momento de recogida, obteniendo en este caso hasta un 33% de agrietado por el método de inducción (cuando el recuento de frutos agrietados se hacía a las 2 horas) frente a la ausencia de agrietado poscosecha en el caso del cultivar Cascada. Por esto, en este trabajo se eligió la condición de 10° C como temperatura óptima para los ensayos de inducción, ya que reproducían mejor las diferencias entre cultivares. El porcentaje de agrietado inducido en el cultivar Gardeners Delight disminuyó de una recogida a otra, al igual que ocurrió con el peso medio de los frutos, según se exponía anteriormente. La disminución del peso de los frutos dentro de un mismo cultivar favorece, por tanto, la disminución en el balance de agrietado poscosecha para ese cultivar, tal y como se demuestra en el caso del cultivar susceptible Gardeners Delight.

El método de inmersión de frutos en agua provoca un agrietado artificial que permite ordenar a los cultivares por la resistencia de sus frutos a agrietarse en condiciones naturales. Este método evita la falta de resultados cuando las condiciones de cultivo hacen que no se produzca agrietado natural, es rápido y muy sencillo de aplicar.

1.2 Estudio morfológico de la piel del fruto en estadio verde maduro y rojo maduro

Según Hankinson y Rao (1979), el análisis histológico podría proporcionar una indicación rápida de la susceptibilidad de un nuevo cultivar de tomate al agrietado. La forma de las células epidérmicas y la disposición de la cutina podría jugar un papel importante en el agrietado de la piel del tomate.

Los colorantes empleados en este trabajo permitieron estudiar y medir las características morfológicas de la cutícula y de las células epidérmicas de los frutos de tomate de los estadios verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) de los cultivares Cascada y Gardeners Delight. La cutícula de los frutos de tomate presentaba una disminución en el grosor estimado cuando el fruto cambiaba de estadio VM a RM

(Tabla 3.4). Esta reducción del grosor en el cambio de maduración fue del 20% en Cascada y del 38% en Gardeners. Bargel y Neinhuis (2005) no encontraron repetitivo este carácter, ya que describieron variedades con grosor de cutícula en el estadio RM tanto mayor como menor que en VM, apuntando la posibilidad de que la disminución del grosor de la cutícula cuando el fruto cambiaba de estadio VM a RM se pudiera deber a que la biosíntesis de los componentes cuticulares estuviera disminuida antes que el incremento de volumen del fruto disminuyera al comienzo de la maduración. En nuestro caso sólo se han estudiado dos variedades y no podemos ni rebatir ni confirmar la hipótesis de Bargel y Neinhuis (2005), no obstante sí habría que apuntar que nuestros cultivares son muy diferentes en su comportamiento con respecto al agrietado y en ambos casos disminuyó significativamente el grosor de la cutícula. El máximo grado de invaginación, sin embargo, no pareció variar en el cambio de VM a RM. La invaginación de la cutícula en la epidermis tiene lugar a finales del proceso de crecimiento y maduración del fruto VM, ya que en estadio verde inmaduro (VI), donde el grosor de cutícula es menor (aún se están sintetizando los componentes cuticulares), no parece apenas haber invaginación de la cutícula en la epidermis (datos no mostrados). Por otra parte, aunque disminuyese la invaginación de la cutina, probablemente se afectaría la anchura de las invaginaciones ya que para disminuir en longitud (máximo de invaginación) debería desaparecer totalmente la cutina.

Una vez alcanzado el estadio RM, los frutos del cultivar resistente Cascada presentan una cutícula más gruesa y con mayor grado de penetración en la epidermis que los frutos RM del cultivar susceptible Gardeners Delight. La cutina en cultivares resistentes al agrietado radial penetra hasta la tercera capa de células mientras que en susceptibles solo penetra generalmente hasta la segunda capa (Hankinson y Rao 1979). La escasa penetración de la cutina y la piel delgada ha sido relacionada con la susceptibilidad al agrietado (Peet, 1992), mientras que la profunda penetración de la cutina en la piel y piel gruesa se manifiesta generalmente en cultivares resistentes al agrietado radial del fruto (Hankinson, 1979).

El cambio de estadio VM a RM vino acompañado también por un aumento en el tamaño de las células epidérmicas (Tabla 3.4). Este aumento de tamaño viene registrado generalmente por el área celular de la superficie medida, si bien algunas veces podría considerarse el perímetro como parámetro indicador de tamaño. Tal aumento de tamaño

celular puede reflejarse tanto en el eje Y de la célula o longitud celular, como en el hipotético eje X de la misma o ancho de la célula. Si el aumento de tamaño no afecta por igual a ambos ejes, la forma de la célula cambia. Así, las células epidérmicas del estadio RM son más largas y menos anchas que las del estadio VM, cambiando su morfología de más o menos redondeada a una forma más aplanada.

Cuando se comparan las células epidérmicas de los frutos RM de ambos cultivares entre sí, se observa que las células del cultivar resistente Cascada son más grandes y redondeadas que las células del cultivar susceptible Gardeners Delight, que muestran en contraposición una forma más alargada o aplanada (Figura 3.10). Los frutos de tomates de diferentes cultivares varían en tamaño y forma de las células epidérmicas (Batal y Lersten, 1972). Esta diferencia puede relacionarse con la resistencia o susceptibilidad al agrietado del fruto según Cotner y colaboradores (1969). Los frutos que muestran resistencia al agrietado concéntrico presentan células epidérmicas aplanadas, que posiblemente soporten mejor la presión en este caso que los frutos menos susceptibles al agrietado concéntrico. Al igual que Cotner y colaboradores (1969), Hankinson y Rao (1979) encuentran células epidérmicas aplanadas en cultivares resistentes y células redondeadas en cultivares susceptibles al agrietado concéntrico. Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias anatómicas consistentes con respecto a la resistencia al agrietado radial. Pagaldy y Ruiz (1983) establecieron una clara relación entre grosor de cutícula, altura y anchura de las células epidérmicas del siguiente modo: células alargadas planas y con cutícula delgada equivalen a un número pequeño de células por unidad de superficie epidérmica, mientras que células estrechas y altas (redondeadas) y con cutícula gruesa equivalen a un más alto número de células por unidad de superficie.

1.3 Estudio de las propiedades mecánicas de epidermis y cutícula de frutos de tomate en estadios verde maduro y rojo maduro

Las propiedades mecánicas de la epidermis del fruto varían según el estadio de maduración pero no en todos los parámetros ni en todos los cultivares. Mientras que la rigidez de la epidermis se mantuvo de VM a RM en los dos cultivares probados, el esfuerzo máximo de rotura y el trabajo de fractura disminuyeron en Cascada y se mantuvieron en Gardeners. Las propiedades de la epidermis son el resultado de las propiedades de la cutícula y de las células del colénquima. En un fruto en crecimiento

(fruto verde inmaduro), la cutícula no debería ser un impedimento para la expansión del mismo dado que la rápida expansión del fruto predomina en los primeros estadios de crecimiento (Thompson y col., 1998), presentando una cutícula con una alta extensibilidad y ofreciendo una baja resistencia a la deformación (Bargel y Neinhuis 2005). En el estadio verde maduro VM, el fruto ya no crecería más, sin embargo los cambios metabólicos que se manifiestan en estadio RM aún no han tenido lugar (Bargel y Neinhuis, 2005), por lo que en principio podría asumirse que el comportamiento mecánico del tejido VM sería más parecido a frutos de estadios anteriores, donde sí hay crecimiento.

En los ensayos mecánicos realizados en este trabajo con epidermis de fruto, no se observaron diferencias en la rigidez indicada por el módulo elástico E entre frutos de estadio VM y RM en el ensayo de fractura (Tablas 3.5 y 3.6) ni en el ensayo de carga-descarga secuencial cuando se aplicaban fuerzas menores de 0.3 N en ninguno de los cultivares (Figuras 3.11 y 3.12). Sin embargo, en Cascada, las diferencias respecto al estadio VM cuando se aplicaban fuerzas superiores después de haber aplicado una serie de esfuerzos previos fueron patentes incrementándose el módulo elástico de forma notable. Esto no se observó en el cultivar Gardeners que aunque también presentaba el fenómeno de endurecimiento, esto es, incremento del módulo elástico según aumenta la fuerza aplicada, no mostró diferencias en la rigidez entre ambos estadios de maduración VM y RM aún aplicando el mismo rango de fuerzas. El tejido de Cascada se ve más afectado por la aplicación de una fuerza, oponiendo más resistencia a la deformación en aquel estadio en el que suele aparecer agrietado como es el rojo maduro.

La deformación plástica también se incrementa con la aplicación creciente de esfuerzos, siendo superior en el estadio RM de los frutos de Cascada y ligeramente superior en Gardeners con respecto al estadio VM, y presentando una mayor acumulación frente a esfuerzos elevados, es decir, el tejido se deforma hasta un punto de forma irreversible, ya que una vez cesa el esfuerzo, el tejido no recupera totalmente su dimensión inicial, sino que permanece con una deformación denominada plástica o residual.

Asumiendo un valor de módulo elástico constante durante todo el proceso de extensión, como es el caso del ensayo de fractura, la epidermis de frutos RM, y por

tanto su cutícula, llegaría antes a su límite de extensión, ya que presenta un esfuerzo de fractura menor y necesita menos energía para propagar una grieta respecto al estadio VM (Tablas 3.5 y 3.6). Esto ocurriría tanto en los frutos del cultivar tolerante Cascada como en los frutos del cultivar susceptible Gardeners Delight.

Considerando el comportamiento de los frutos RM de ambos cultivares frente a una fractura iniciada, tanto la epidermis como la cutícula del cultivar susceptible necesitan menos energía para propagar una grieta y presentan un menor esfuerzo de fractura (Matas y col., 2004b), por lo que tales frutos llegarían antes a su límite de extensión, y por tanto al agrietado. La disminución de la extensibilidad de la cutícula del fruto de tomate hacia los estadios finales de maduración podría tener implicaciones en la susceptibilidad al agrietado, tal y como apuntan algunos autores (Bargel y Neinhuis 2005).

La epidermis reproduce la respuesta mecánica de una cutícula aislada durante el ensayo de fractura. El hecho de presentar la cutícula una mayor rigidez, esfuerzo de fractura y energía para propagar una grieta en el estadio RM de ambos cultivares, indica que la cutícula no solo frena en este estadio la expansión del fruto sino que además sería el punto por el que empezaría a agrietarse el fruto.

La epidermis de Cascada presentó unos valores de módulo elástico, máximo esfuerzo de rotura y trabajo de fractura superiores a los de Gardeners. Eso supone que el material de la epidermis es diferente en ambos cultivares. La epidermis representa un muy variado conjunto de tejidos y sería difícil constatar en cual o cuales está el cambio, pero considerando solamente la cutícula, esos tres parámetros también son mayores en Cascada que en Gardeners y por tanto la composición cuticular debe ser diferente.

2. Caracterización de los cultivares estudiados bajo condiciones salinas

2.1 Evaluación de campo

Está bien documentado que el aumento de la conductividad eléctrica en la solución de riego afecta a la producción de frutos de tomates, obteniendo frutos con menor peso y diámetro que los testigos hacia el final del proceso de maduración (Ehret y Ho, 1986; Adams 1991; Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999; Dorais y col., 2001b).

En el cultivar Cascada, las plantas regadas con solución de alta conductividad eléctrica (6.5 dSm^{-1}) produjeron frutos con un 11% menos de diámetro transversal y un 33% menos de peso final con respecto a los controles. Una reducción del 10% en el peso del fruto se espera cuando se riega con un agua de $5-6 \text{ dSm}^{-1}$ (Gonzalez-Fernandez y Cuartero, 1999), lo que concuerda con la reducción de peso observada en el cultivar Cascada. Los frutos del cultivar Gardeners Delight se vieron menos afectados por las condiciones salinas que los del cultivar Cascada. El porcentaje de reducción del diámetro final del fruto fue del 6%, mientras que el porcentaje de reducción de peso fue del 19% con respecto a los controles. Gardeners que es más susceptible al agrietado se mostró más tolerante a la salinidad.

La disminución de tamaño del fruto bajo condiciones salinas ha sido relacionada con la disponibilidad de agua para la planta. Un aumento en la conductividad eléctrica de la solución nutritiva disminuye la disponibilidad de agua para la planta (potencial hídrico más bajo), las plantas en esas condiciones absorben menos agua, se reduce el flujo de agua hacia el fruto y por tanto, la tasa de expansión del mismo (Johnson y col., 1992). Se ha demostrado una fuerte relación lineal entre la conductividad eléctrica de la solución nutritiva y el consumo de agua (Soria y Cuartero, 1997).

Si se observa la Figura 3.14 donde se presenta la curva de crecimiento de los frutos de tratamientos salinos y testigos de ambos cultivares, se puede afirmar que es a partir de los 20 dda donde empieza a apreciarse un cambio en la tasa de crecimiento (atendiendo a la pendiente de la curva) y variación en el diámetro del fruto, especialmente en el cultivar Cascada que se ha mostrado como el más sensible al efecto del tratamiento salino. Según Cuartero y Fernandez Munoz (1999), los frutos de plantas de tratamiento salino parecen mostrar un crecimiento normal durante la fase de división celular y es durante la fase de expansión celular cuando los efectos deletéreos de la sal se observan. La modificación en el ciclo de crecimiento del fruto de la fase 2 o fase de expansión celular bajo condiciones salinas podría explicar, especialmente en el caso de los frutos del cultivar Cascada, la diferencia en el tiempo del cambio de coloración característico de la fase 3 observada entre el testigo (40 dda) y el tratamiento salino (37 dda). En el cultivar Gardeners Delight, no se apreció diferencia temporal en el cambio de coloración.

• **Agrietado poscosecha en tratamiento salino**

El tratamiento salino produjo menor aparición de agrietado poscosecha en el cultivar susceptible Gardeners Delight en cada una de las recogidas que cuando este genotipo se cultivó con agua dulce (condiciones testigo). En Cascada no hubo agrietado significativo ni en salinidad ni en condiciones testigo. Está documentado que bajo altos niveles de conductividad eléctrica en la solución de riego, el fruto de tomate generalmente desarrolla una cutícula más gruesa y resistente, una presión de turgencia más baja (Verveke y Schols, 1992) y una menor susceptibilidad al agrietado del fruto (Sonneveld y Van Der Burg, 1991). Nuestros resultados confirman una notable disminución del agrietado del fruto al regar las plantas con solución salina.

El método de inducción de agrietado aplicado en los tratamientos testigos no reveló ningún fruto agrietado en cualquiera de los cultivares estudiados. Esto demuestra de nuevo la resistencia de los frutos a agrietarse bajo condiciones de tratamiento salino observadas previamente en la evaluación de agrietado poscosecha. Sin embargo, en condiciones salinas, la inducción de agrietado mediante inmersión en agua no parece ser un método apropiado para medir el agrietado ya que debería haber aparecido agrietado al menos en Gardeners. Los frutos de plantas crecidas en condiciones salinas presentan una cutícula más gruesa y con mayor cantidad de ceras epicuticulares (Romero y col., 2001). Cabe suponer que el agua necesite más tiempo para atravesar las ceras epicuticulares e invadir la cutícula de los frutos cultivados en condiciones salinas. Por tanto, quizá se debería haber aumentado el tiempo de inmersión para obtener resultados comparables entre el agrietado natural y el provocado por inmersión.

Al final de la maduración los frutos de tratamiento salino presentaron un color rojo más intenso que los testigos. Algunos estudios han demostrado que el incremento en la conductividad eléctrica de la solución nutritiva en las plantas de tomate o la adición de NaCl, KCl o CaCl₂ en la solución nutritiva incrementa la calidad externa (color, menor tasa de agrietado) e interna del fruto (potencia el sabor al incrementar el contenido en ácidos y azúcares) (Stevens 1979; Cuartero y Fernandez Munoz, 1999).

2.2. Estudio morfológico de la piel del fruto en estadio rojo maduro bajo tratamiento salino

Independientemente del cultivar, el tratamiento salino afecta a las células epidérmicas disminuyendo su tamaño y alterando su morfología, transformándolas en células menos alargadas y por tanto, más isodiamétricas o redondeadas. Cabe destacar sin embargo, que el cultivar Cascada parece afectarse más por el tratamiento salino que el cultivar Gardeners Delight, ya que los porcentajes de aumento del grosor de la cutícula y disminución del tamaño de las células epidérmicas son mayores en el cultivar tolerante al agrietado Cascada con respecto al susceptible Gardeners Delight. Cascada se mostró más sensible a la salinidad cuando se estudió el diámetro y peso del fruto, disminuía más el diámetro y el peso del fruto que Gardeners en comparación con frutos procedentes de riego sin sal. En cuanto a la morfología de las células epidérmicas y grosor de la cutícula de nuevo Cascada se muestra más sensible a la salinidad que Gardeners ya que altera más su grosor y forma en comparación con la que presentaban tanto la cutícula como las células epidérmicas de frutos regados con agua sin sal.

2.3 Estudio de las propiedades mecánicas de epidermis de frutos de tomate en estadio rojo maduro bajo tratamiento salino

La salinidad afectó al comportamiento mecánico de la epidermis especialmente en el cultivar Cascada. En ensayos de fractura realizados con epidermis de fruto RM, las muestras de tratamiento salino no solo eran más rígidas, sino que necesitaban mayor esfuerzo de fractura y energía para propagar una grieta que los correspondientes testigos del cultivar tolerante Cascada (Tabla 3.12). Teniendo en cuenta el efecto que tiene la salinidad en el desarrollo de estos frutos, el menor peso y tamaño, así como el aumento en el grosor de su cutícula contribuirían al aumento de rigidez de la epidermis.

Frente a un ensayo de carga-descarga secuencial, no hay diferencia en la rigidez de la epidermis entre ambos tratamientos, aunque las deformaciones plásticas acumuladas durante el proceso fuesen superiores en tratamiento salino (Figura 3.16).

La respuesta que ofreció la epidermis de los frutos RM del cultivar Gardeners Delight frente a la salinidad fue diferente. Sus propiedades mecánicas no variaron cuando se estudiaron los ensayos de fractura con muestras de tratamientos salinos (Tabla 3.16). Sin embargo, en un ensayo de carga-descarga secuencial, la muestra de tratamiento salino se endurecía más y a mayor velocidad que la muestra testigo, sin mostrar cambios aparentes en la deformación plástica (Figura 3.17).

3 Influencia de la temperatura, humedad relativa y radiación sobre características de la cutícula

Factores ambientales como temperatura y radiación parecen influir en la estructura de la cutícula. Así, en épocas donde la temperatura media del invernadero asociada al periodo en el que se ha desarrollado el fruto ha sido elevada (26° C) al igual que los niveles de radiación en el exterior del invernadero (Cultivo 2001), la cutícula desarrollada en el fruto presentaba valores de peso específico mayores que en épocas donde temperatura y radiación eran menores (Cultivos 2002 y 2004). Por otro lado, el grosor de cutícula parece variar a la inversa de como lo hace la temperatura, ya que para temperaturas elevadas la cutícula desarrollada presentaba un grosor menor (Cultivo 2001) que cuando la temperatura media del periodo analizado era más baja (Cultivos de 2002 y 2004).

Combinando ambos parámetros en las distintas épocas de cultivo, parece ser que la temperatura podría estar actuando sobre la densidad de la cutícula, favoreciendo la formación de cutículas más densas (mayor peso específico) y compactas (menor grosor) cuando son elevadas, mientras que cuando las temperaturas son más bajas se favorecería la formación de cutículas menos densas (menor peso específico) y menos compactas (mayor grosor de cutícula).

CAPÍTULO - II

RESULTADOS - II

Papel de los componentes de la cutícula en sus propiedades mecánicas.

1. Fraccionamiento de cutícula. Separación de cutina y polisacáridos.

1.A Eliminación de los compuestos hidrolizables y comprobación mediante métodos de tinción histológica y control del peso de cutícula.

El tratamiento de las cutículas aisladas con ácido fluorhídrico-piridina permitió la eliminación de los compuestos hidrolizables, siendo éstos principalmente polisacáridos, y la consecuente obtención de la cutina. Durante este proceso fueron eliminadas también las ceras epicuticulares, hecho comprobado al observar la ausencia de brillo de la cara externa de las cutículas tratadas. La eliminación de estos compuestos quedó demostrada mediante una tinción histológica para celulosa con calcoflúor en cortes histológicos de muestras de cutículas aisladas y cutinas embebidas en resina (Figura 4.1). El calcoflúor es un compuesto que interacciona con las fibrillas de celulosa y emite fluorescencia de color blanco cuando se excita la muestra con luz ultravioleta. Se observa cómo las fibrillas de celulosa se localizaron bordeando la zona interna de la cutícula, fundamentalmente en la zona de las invaginaciones (Figura 4.1 A). En los cortes correspondientes a muestras de cutina (Figura 4.1 B) no apareció contrastada esta zona, lo que demuestra la obtención de una cutina libre de polisacáridos tras el tratamiento.

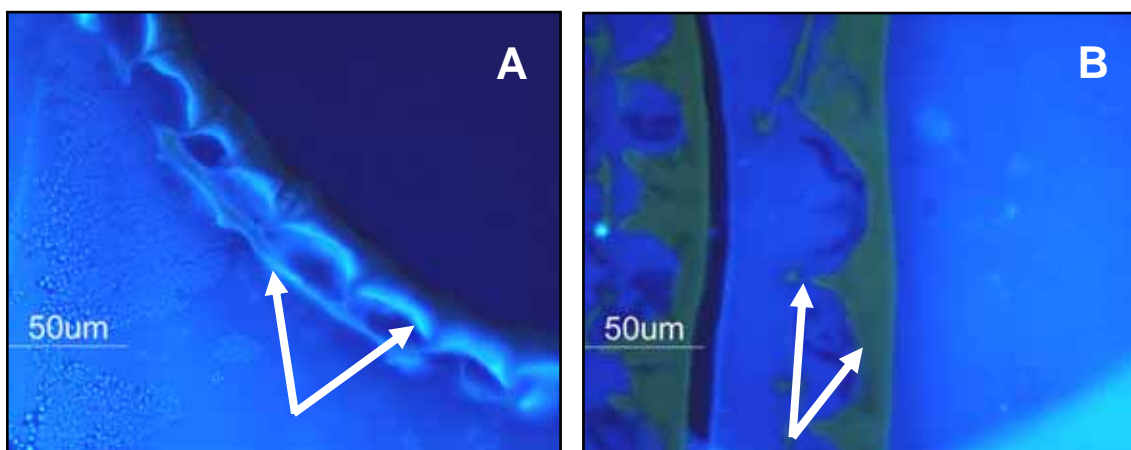


Figura 4.1: Imagen de microscopía de fluorescencia de cortes de cutícula aislada (A) y cutina (B) del cultivar Cascada contrastados con calcoflúor y visualizados con luz UV con 40X.

Por otro lado, se pesaron las cutículas antes y después del tratamiento. Se registro una pérdida del peso de la cutícula del 28% en cutícula procedente de fruto rojo

maduro y del 31% en cutícula de fruto verde maduro. La disminución de peso sería debida a la pérdida de polisacáridos tras el tratamiento.

1.B Puesta a punto de un método de obtención selectiva de polisacáridos a partir de cutículas aisladas de los estadios verde maduro y rojo maduro de Cascada y Gardeners Delight. Comprobación del grado de pureza de la extracción.

El método desarrollado para la obtención selectiva de polisacáridos a partir de muestras de cutículas aisladas de frutos de tomate se compuso de tres pasos principales:

- Eliminación de ceras, mediante la adición de una mezcla de cloroformo-metanol a la muestra en una proporción 3:1
- Despolimerización del poliéster cutina con metanol KOH al 1%, a temperatura ambiente
- Lavados sucesivos con metanol para eliminar los restos de cutina, hasta obtener una solución no coloreada

Las condiciones del proceso, así como la descripción detallada del método figuran en el apartado de Materiales y Métodos. Sin embargo cabe comentar la leve agitación y baja temperatura a la que se llevó a cabo el experimento, evitando así la ruptura total de la capa de polisacáridos, los cuales conservaron la estructura en el plano que presentan en la cutícula, tal y como se observa en las imágenes de microscopía óptica que se comentarán en el apartado 5.1.

El rendimiento del método fue de un 10% para cada una de las muestras estudiadas. Se partió de un gramo de cutícula aislada en cada uno de los casos y se obtuvieron 100 mg aproximadamente después del protocolo descrito.

El grado de pureza de cada extracción se comprobó mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). En la Figura 4.2 se muestran los espectros FT-IR de los extractos de polisacáridos procedentes de las cutículas aisladas de los estadios de maduración rojo maduro (RM) y verde maduro (VM) de los cultivares Cascada y Gardeners Delight. Los espectros realizados a los cuatro extractos de forma independiente fueron prácticamente idénticos tal y como se puede observar en la Figura 4.1.

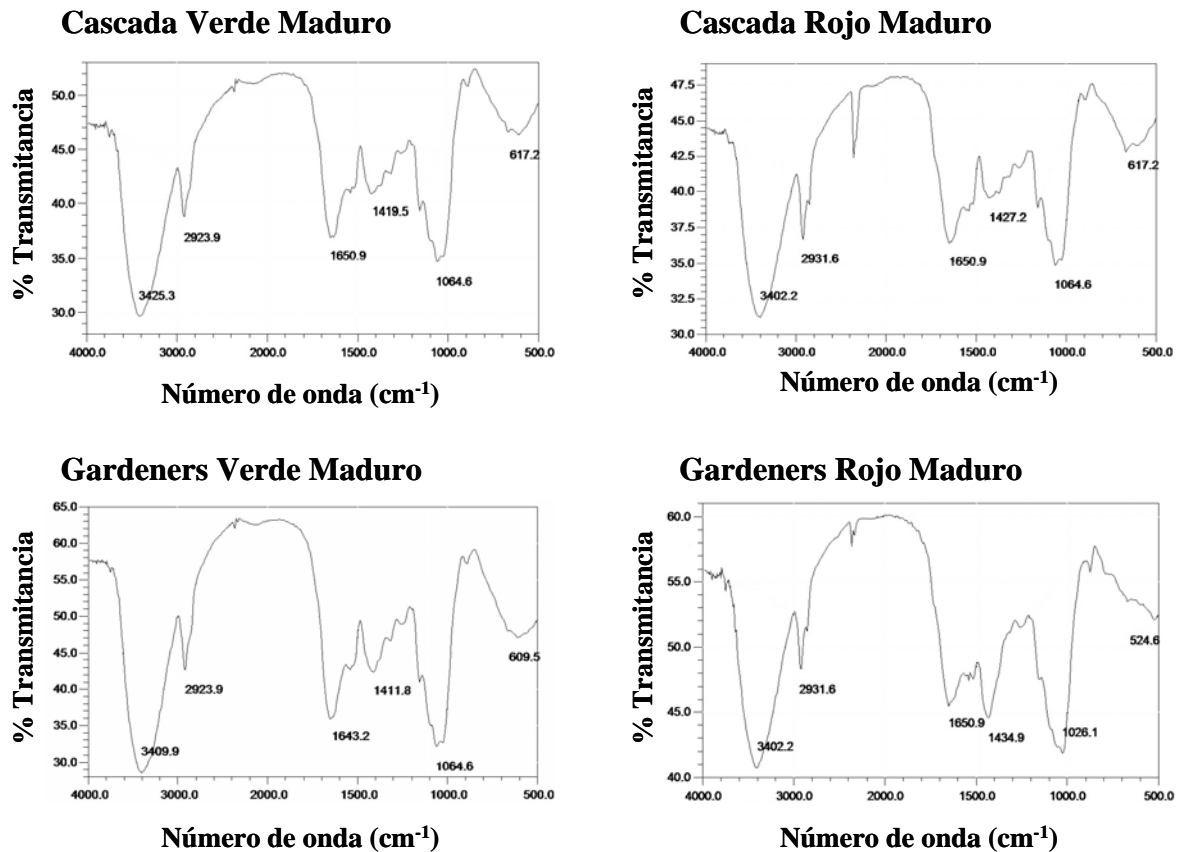


Figura 4.2: Espectros de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de los extractos de polisacáridos procedentes de cutículas aisladas de frutos de tomate de los estadios verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) de los cultivares Cascada y Gardeners Delight.

La ausencia de banda 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 cutina, fue una prueba más de la pureza de la obtención selectiva de polisacáridos.

2. Comparación entre las propiedades mecánicas de la cutícula y de la cutina de frutos rojo maduro

Los ensayos de fluencia realizados con cutícula y cutina aisladas de frutos de dos estadios de maduración y dos cultivares con distinto grado de susceptibilidad al agrietado, fueron realizados bajo dos condiciones de temperatura (23° C y 35° C) y contenido de agua (40% humedad relativa y mojado).

• Cutícula y cutina RM de Cascada

Los ensayos de fluencia con la cutícula aislada mostraron dos fases bien diferenciadas cuando ésta fue sometida a incrementos en la fuerza de tensión de 0.098 N en intervalos de 20 minutos en condiciones de baja humedad relativa (40% HR). Una primera fase que comprendió desde 0 hasta 0.49 N de fuerza (lo que correspondería a cinco incrementos de 0.098N), donde la cutícula respondió a cada incremento con una extensión instantánea. La deformación en esta primera fase fue esencialmente elástica. La segunda fase se manifestó a fuerzas de tensión superiores a 0.49 N, donde la cutícula respondió con una primera extensión instantánea (deformación elástica) seguida de una extensión adicional dependiente de tiempo (deformación viscoelástica). En la Figura 4.3, se presenta un diagrama de la evolución de la deformación alcanzada frente al tiempo; cada escalón señalado correspondería a un esfuerzo aplicado. En condiciones de mojado, las curvas esfuerzo-extensión mostraron un carácter monofásico que se correspondió con una deformación esencialmente viscoelástica.

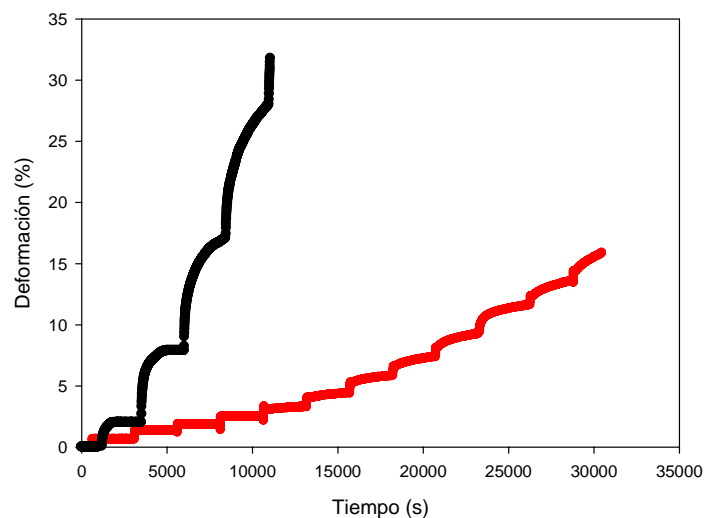


Figura 4.3: Ensayo de fluencia con incrementos sucesivos de fuerza de 0.098N cada 20 minutos de cutícula (línea roja) y cutina (línea negra) de fruto RM de Cascada. Ambos ensayos se realizaron en condiciones de 23° C y 40% HR. Los datos fueron tomados cada 3 s hasta el momento de fractura.

Este comportamiento bifásico para condiciones de baja humedad y monofásico para las condiciones de mojado de la cutícula aislada pudo ser también observado en los diagramas esfuerzo-extensión (Figura 4.4), los cuales permitieron a su vez el cálculo del módulo elástico a partir de la pendiente de la primera fase de la curva (fase lineal elástica).

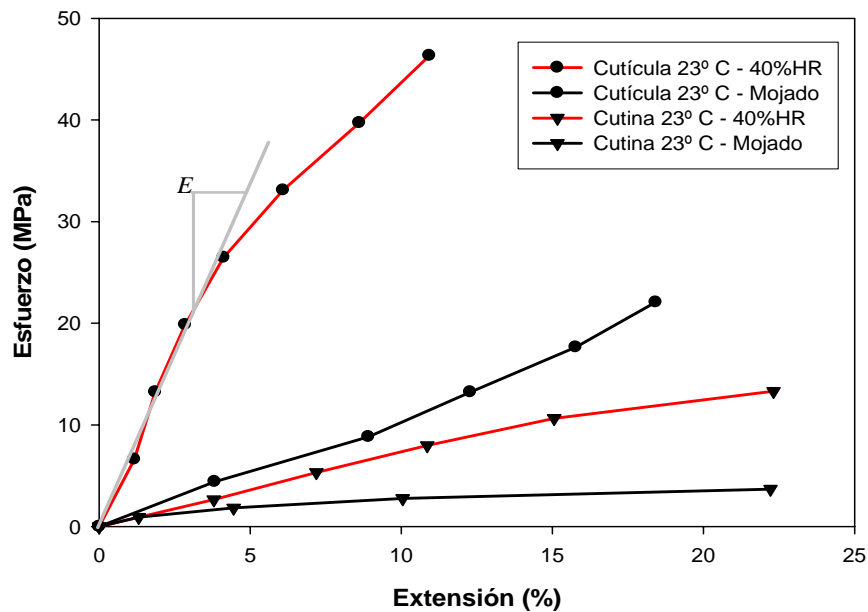


Figura 4.4: Respuesta mecánica de la cutícula (círculo) y la cutina (triángulo) de frutos RM de Cascada en ensayos realizados a 23° C, bajo dos condiciones de humedad: 40% (línea roja) y mojado (línea negra).

Atendiendo a la forma de las curvas esfuerzo-extensión asociadas a la cutina (Figura 4.4), se observó que independientemente de la condición de temperatura o humedad relativa aplicada, el comportamiento de la cutina de frutos RM del cultivar Cascada fue principalmente monofásico, hecho que también se deduce del análisis de la deformación en función del tiempo (Figura 4.3).

El módulo elástico (E) de las cutículas aisladas de frutos del estadio rojo maduro (RM) del cultivar Cascada en condiciones de temperatura 23° C y 40% HR fue de 628 MPa (Figura 4.5A). Cuando se realizó el ensayo de tensión aumentando la temperatura hasta 35° C, el valor de E disminuyó en torno a un 27%. En condiciones de mojado, E disminuyó un 79% con respecto a las condiciones de baja humedad de cada temperatura ensayada. No se obtuvieron diferencias significativas en el valor medio obtenido entre ambas temperaturas en condiciones de mojado.

Al igual que sucedía con el módulo elástico, el esfuerzo de fractura de la cutícula (σ_b) decreció con el aumento de temperatura en torno al 45% (Figura 4.5B). Las condiciones de mojado favorecieron la disminución de σ_b soportado por la cutícula aislada antes de la ruptura, variando desde 45 MPa al 40% HR a 25 MPa en mojado para 23° C y de 25 MPa a 13 MPa para 35° C.

El aumento de temperatura no afectó a la deformación máxima (ϵ_b) alcanzada por la cutícula (Figura 4.5C), mientras que las condiciones de mojado provocaron un aumento significativo a 23° C (ϵ_b 23°C-40% HR: 12%; ϵ_b 23°C-Mojado: 19%).

Analizando el comportamiento mecánico de la cutina de frutos RM del cultivar tolerante Cascada, se observó que el módulo elástico que presentaba a 23° C y 40% HR (E : 45 MPa) fue significativamente diferente del obtenido a 35° C en las mismas condiciones de humedad relativa (E : 32 MPa), representado en la Figura 4.5A. Cuando se sometió la cutina a condiciones de mojado, el valor de E disminuyó un 55% a 23° C y un 31% a 35° C con respecto a las condiciones de baja humedad relativa, sin mostrar diferencias significativas en las condiciones de mojado entre ambas temperaturas.

El valor de σ_b para la cutina (Figura 4.5B) a 23° C y 40% HR (12 MPa) fue un 50% superior al estimado cuando se aumentó la temperatura a 35° C (6 MPa) y un 65% mayor con respecto a las condiciones de mojado (4 MPa). A 35° C también fue superior el σ_b con baja HR que en mojado.

No hubo diferencias significativas en cuanto a ϵ_b de la cutina debido seguramente a los elevados errores en las estimas (Figura 4.5C), si bien en valores absolutos fue mayor al 40% HR (ϵ_b 23° C: 27 %; ϵ_b 35° C: 23%) que en condiciones de mojado (ϵ_b 23° C: 20 %; ϵ_b 35° C: 15%) en cualquiera de las temperaturas, y mayor a 23 que a 35°C en cualquiera de las humedades relativas.

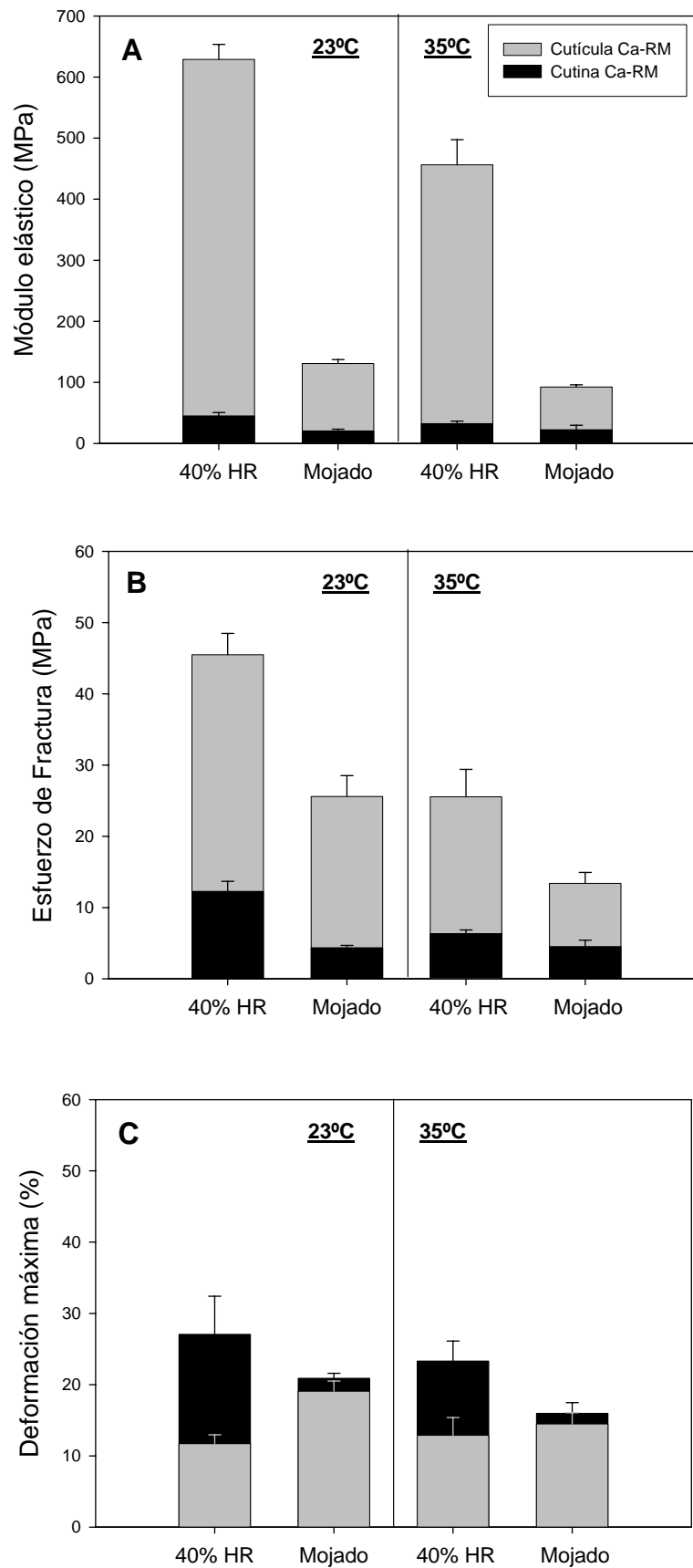


Figura 4.5: Valores del Módulo elástico (A), Esfuerzo de Fractura (B) y Deformación Máxima (C) de la cutícula (barra gris) y la cutina aislada (barra negra) de frutos del estadio rojo maduro (RM) del cultivar tolerante Cascada (Ca).

Al comparar la respuesta mecánica de la cutícula y la cutina de frutos RM del cultivar Cascada en igualdad de condiciones (Figura 4.5), se observó que al eliminar los polisacáridos, el módulo elástico de la cutina disminuía drásticamente en todas las condiciones ambientales probadas: un 93% menor que el de la cutícula en condiciones de baja humedad a ambas temperaturas y entre un 76 y un 85% en condiciones de mojado a ambas temperaturas. Del mismo modo, el esfuerzo máximo en el punto de fractura en la cutina fue también drásticamente inferior al de la cutícula tanto en condiciones de baja humedad (entre 73 y 76% a baja y alta temperatura respectivamente) como en mojado (84 y 69% menor a baja y alta temperatura). La deformación máxima alcanzada por la cutina sin embargo fue entre un 20 y un 60% superior a la de la cutícula en condiciones de baja HR en ambas temperaturas y similar e independiente de la temperatura en condiciones de mojado.

• Cutícula y cutina RM de Gardeners Delight

El efecto que ejercieron las condiciones de temperatura y humedad relativa estudiadas sobre las propiedades mecánicas en la cutícula aislada de frutos RM del cultivar tolerante Cascada, fue reproducido cuando se analizó el cultivar susceptible al agrietado Gardeners Delight. Así, el valor medio del módulo elástico (Figura 4.6A) disminuyó cuando aumentó la temperatura ($E_{-23^{\circ}\text{C}-40\% \text{ RH}}$: 357MPa; $E_{35^{\circ}\text{C}-40\% \text{ RH}}$: 345 MPa), y, sobre todo, cuando se sometió a las muestras a condiciones de mojado ($E_{23^{\circ}\text{C-mojado}}$: 98 MPa; $E_{35^{\circ}\text{C-mojado}}$: 105 MPa). En este caso, el esfuerzo de fractura decreció ligeramente con el aumento de la humedad mientras que el aumento de temperatura redujo el esfuerzo de fractura sólo en condiciones de mojado, tal y como se muestra en la Figura 4.6B. La deformación máxima alcanzada (Figura 4.6C) no varió con el cambio de temperatura, y aumentó en condiciones de mojado, tal y como se describía previamente para Cascada.

La cutina de frutos RM del cultivar susceptible Gardeners Delight reprodujo la respuesta descrita en cutícula frente a las distintas condiciones de humedad y temperatura. El módulo elástico de la cutina a 23° C fue superior al módulo obtenido a 35° C tanto a 40% de HR como en condiciones de mojado; el módulo elástico disminuyó al pasar de 40% HR a las condiciones de mojado en ambas temperaturas. En cuanto al esfuerzo en el punto de fractura, el valor medio obtenido a 23° C y 40% HR

(σ_b : 11 MPa) fue superior y significativamente distinto de σ_b obtenido a 35° C-40% HR (σ_b :8 MPa), 23° C-mojado (σ_b : 6 MPa) y 35° C-mojado (σ_b : 6 MPa), entre los que no hubo diferencias. Por último y en cuanto a ε_b , no se obtuvieron diferencias significativas entre ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 4.6C).

Al comparar el comportamiento mecánico de la cutícula y de la cutina aislada de frutos RM del cultivar susceptible al agrietado Gardeners Delight, se observó que al igual que se describía previamente en el caso del cultivar tolerante Cascada, el valor medio de E para la cutina fue entre un 75 y un 90% menor que el de la cutícula de frutos RM en todas las condiciones ambientales probadas (Figura 4.6). El valor de σ_b para la cutina fue entre un 58% y un 75 menor que el de la cutícula correspondiente mientras la ε_b de la cutina fue entre un 55 y un 33% superior que la de la cutícula en todas las condiciones menos en mojado a baja temperatura que no varió.

Al igual que en el cultivar Cascada, la cutícula RM de Gardeners presentó un comportamiento bifásico en condiciones de baja humedad relativa, mientras que en condiciones de mojado fue monofásico, independientemente de la temperatura aplicada. Por su parte, las curvas de cutina RM fueron monofásicas en cualquiera de las condiciones del ensayo.

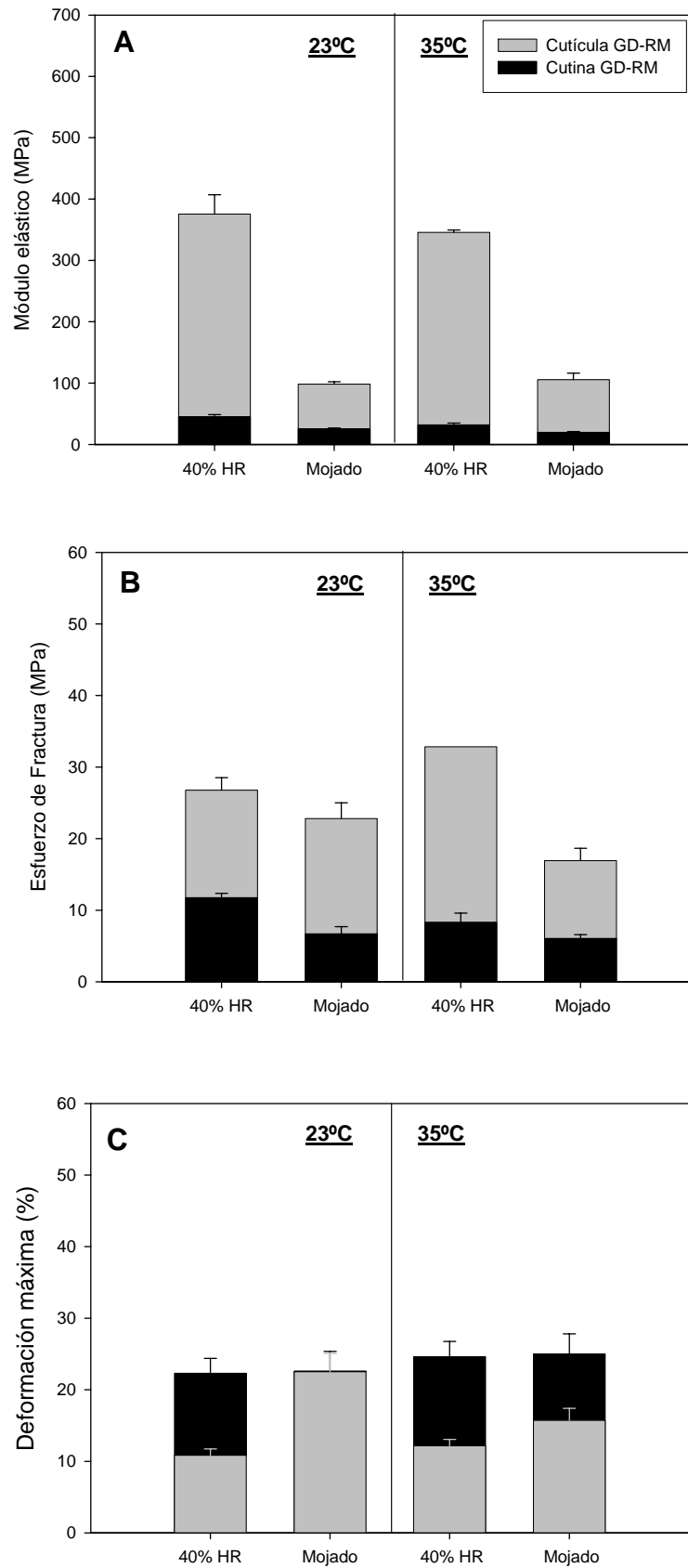


Figura 4.6 Valores del Módulo elástico (A), Esfuerzo de Fractura (B) y Deformación Máxima (C) de la cutícula (barra gris) y la cutina aislada (barra negra) de frutos del estadio rojo maduro (RM) del cultivar susceptible Gardeners Delight (GD)

• **Comparación de las propiedades mecánicas de la cutícula y la cutina RM entre Cascada y Gardeners Delight**

Atendiendo a lo descrito anteriormente sobre las propiedades mecánicas de las cutículas aisladas de frutos RM de los cultivares Cascada y Gardeners Delight, se observó que el comportamiento general frente a las condiciones aplicadas de temperatura y humedad relativa fue en gran parte similar, aunque el valor absoluto de cada uno de los parámetros varió significativamente entre ambos cultivares (Tabla 4.1). Así, en condiciones de 23° C y 40% HR, el módulo elástico de la cutícula aislada de frutos RM del cultivar Cascada fue un 40% superior al módulo elástico del cultivar Gardeners Delight. El esfuerzo máximo en estas mismas condiciones fue un 42% mayor mientras que la deformación máxima alcanzada no resultó ser estadísticamente diferente. Estas diferencias se suavizaron cuando se aumentó la temperatura o las cutículas se sometieron a condiciones de mojado, siendo el mojado un tratamiento con mayor efecto que la temperatura sobre el módulo elástico, y cuando se unieron alta temperatura y alta humedad desaparecieron las diferencias entre los dos cultivares. El esfuerzo de fractura entre los dos cultivares fue similar en otras condiciones que no fueran 23° C y 40% HR.

Tabla 4.1: Valores de E , σ_b y ϵ_b de cutícula aislada de frutos RM de Cascada y Gardeners Delight (media \pm error típico).

	Módulo elástico (E , MPa)		Esfuerzo de Fractura (σ_b , MPa)		Deformación Máxima (ϵ_b , %)	
	Cascada	Gardeners	Cascada	Gardeners	Cascada	Gardeners
23°C-40%	628 \pm 24.7	375 \pm 31.6	45 \pm 2.9	26 \pm 1.7	11 \pm 1.2	10 \pm 0.8
23°C-Moj.	130 \pm 6.4	98 \pm 3.7	25 \pm 2.9	22 \pm 2.2	19 \pm 1.4	22 \pm 2.5
35°C-40%	456 \pm 40.9	345 \pm 3.8	25 \pm 3.8	32	12 \pm 2.5	12 \pm 0.9
35°C-Moj.	92 \pm 3.8	105 \pm 10.6	13 \pm 1.5	16 \pm 1.7	14 \pm 1.6	15 \pm 1.6

No se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados para la cutina de frutos RM de Cascada y Gardeners Delight en las distintas condiciones estudiadas, al contrario de lo que ocurría cuando comparábamos las cutículas aisladas entre sí (Tabla 4.2). Únicamente en Cascada a 35° C-mojado se obtuvo una deformación máxima anormalmente baja.

Tabla 4.2: Valores de E , σ_b y ϵ_b de cutina aislada de frutos RM de Cascada y Gardeners Delight (media \pm error típico)

	Módulo elástico (E , MPa)		Esfuerzo de Fractura (σ_b , MPa)		Deformación Máxima (ϵ_b , %)	
	Cascada	Gardeners	Cascada	Gardeners	Cascada	Gardeners
23°C-40%	45 \pm 5.4	45 \pm 3.3	12 \pm 1.4	11 \pm 0.5	27 \pm 5.3	22 \pm 2.06
23°C-Moj.	20 \pm 2.6	25 \pm 1.6	4 \pm 0.3	6 \pm 0.9	20 \pm 0.6	22 \pm 2.7
35°C-40%	32 \pm 3.9	32 \pm 2.6	6 \pm 0.5	8 \pm 1.2	23 \pm 2.8	24 \pm 2.1
35°C-Moj.	22 \pm 7.3	19 \pm 1.1	4 \pm 0.9	6 \pm 0.5	15 \pm 1.4	24 \pm 2.8

3. Comparación de las propiedades mecánicas de la cutícula y de la cutina de frutos VM

• Cutícula y cutina VM del cultivar Cascada

En el cultivar Cascada, el valor medio de E de la cutícula de frutos VM no disminuyó cuando se aumentó la temperatura de 23° C a 35° C en ninguna de las dos HR probadas, la temperatura parece que no afectó a este parámetro, si bien disminuyó considerablemente cuando sometimos las muestras a condiciones de mojado frente a las condiciones de 40% HR (Figura 4.7). El esfuerzo de fractura de la cutícula tampoco se vió afectado por las dos temperaturas probadas, pero, como en el caso del módulo elástico, disminuyó considerablemente al pasar de 40% HR a condiciones de mojado. La deformación máxima de la cutícula tampoco se afectó por los cambios de temperatura y sí por la HR pero en sentido inverso que el E y el σ_b : la deformación máxima aumentó significativamente al pasar de 40% HR a mojado.

El mayor módulo elástico y esfuerzo de fractura de la cutina se obtuvo en condiciones de la menor temperatura y HR probadas (23° C-40% HR) (Figura 4.7). Estos valores disminuyeron con similar intensidad tanto cuando se pasó de 23 a 35 ° C como de 40% de HR a condiciones de mojado a 23° C, sin embargo a temperatura alta (35° C) no tuvo efecto pasar de 40% HR a mojado. La deformación máxima no cambió significativamente ni con el aumento de la temperatura ni con el aumento de la HR.

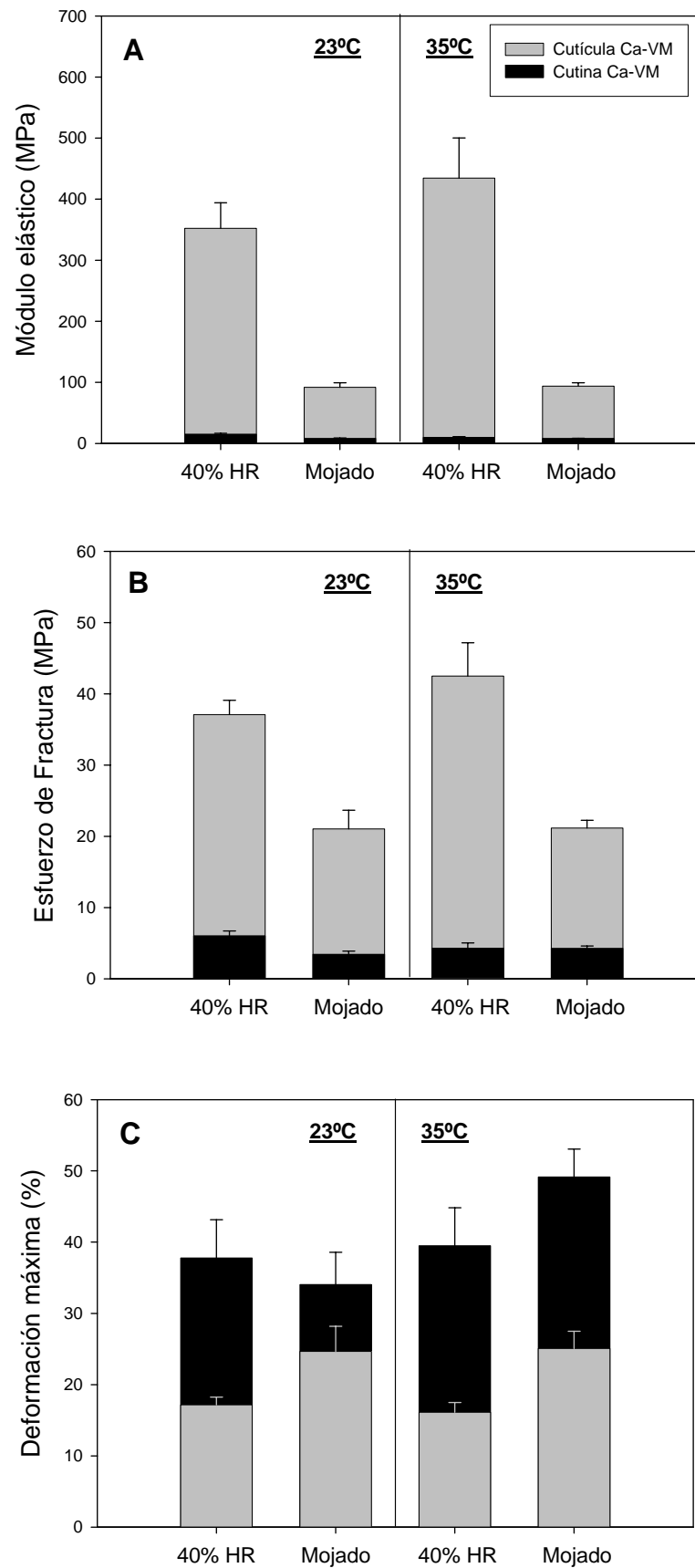


Figura 4.7: Valores del Módulo elástico (A), Esfuerzo de Fractura (B) y Deformación Máxima (C) de la cutícula aislada (barra gris) y de la cutina (barra negra) de frutos VM del cultivar tolerante Cascada (Ca).

Comparando cutícula y cutina aislada procedente de frutos VM del cultivar Cascada se observó que el valor de E para la cutina VM disminuyó enormemente, entre un 91 y un 98%, con respecto a la cutícula VM. El σ_b de la cutina también fue muy inferior, entre un 81 y un 90%, al encontrado en la cutícula de frutos VM. La ε_b de la cutina se incrementaba entre un 49 y un 59% en comparación a la cutícula, excepto para 23° C-mojado donde el incremento, aunque significativo, fue de un 29%.

• Cutícula y cutina VM del cultivar Gardeners Delight

Al igual que en el cultivar tolerante Cascada, las propiedades mecánicas de las cutículas aisladas de frutos VM del cultivar susceptible al agrietado Gardeners Delight tuvieron respuestas diferenciales frente a temperatura y humedad (Figura 4.8). Así, el valor medio E para la cutícula VM a 23° C y 40% HR (E : 280 MPa) disminuyó cuando se aumentó la temperatura a 35° C (E : 231 MPa) y cuando se sometió a condiciones de mojado ($E_{23^\circ\text{ C-mojado}}$: 145 MPa; $E_{35^\circ\text{ C-mojado}}$: 159 MPa), pero no hubo diferencias en la cutícula mojada al pasar de 23 a 35° C. El valor de σ_b fue superior en condiciones de baja humedad (σ_b 23° C: 35 MPa; σ_b 35° C: 33 MPa) con respecto a las situaciones de mojado (σ_b 23° C: 21 MPa; σ_b 35° C: 24 MPa), sin encontrar diferencias significativas entre las dos temperaturas ni a 40% HR ni en mojado. La ε_b no varió significativamente en las cuatro condiciones ambientales estudiadas.

La cutina de frutos VM no presentó una respuesta diferencial frente a cambios de humedad y temperatura en los tres parámetros analizados, aunque cabe destacar un ligero aumento en la ε_b a 23° C-40% HR frente al resto (Figura 4.8).

Cuando se compararon las propiedades mecánicas de la cutícula y de la cutina procedente de frutos VM del cultivar Gardeners Delight se observó que el valor de E para la cutina fue entre un 94 y un 96% inferior que para la cutícula VM (Figura 4.8). El σ_b fue también entre un 88 y un 91% inferior. La ε_b de la cutina fue superior a la de la cutícula en todos los casos, variando el aumento entre un 31 y un 58%.

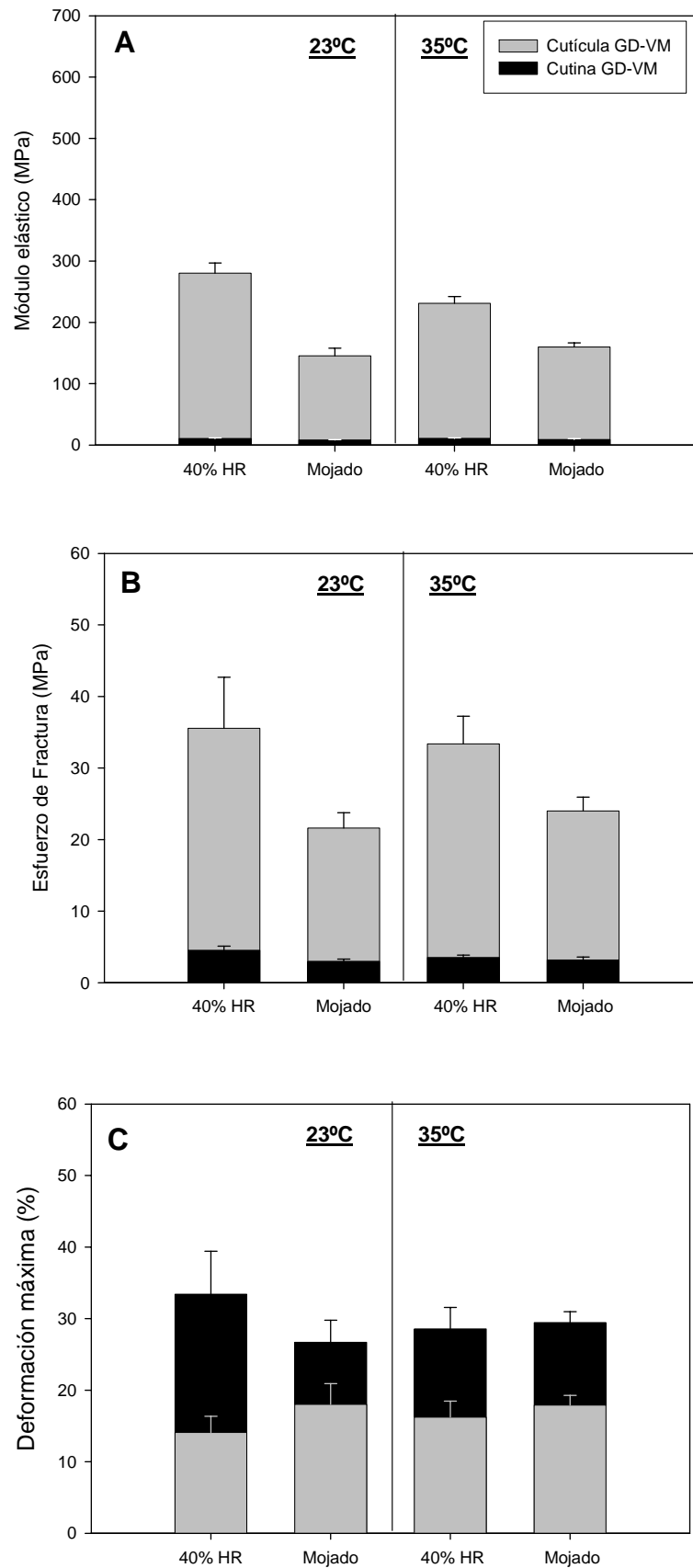


Figura 4.8: Valores del Módulo elástico (A), Esfuerzo de Fractura (B) y Deformación Máxima (C) de la cutícula aislada (barra gris) y cutina (barra negra) de frutos VM procedente del cultivar susceptible Gardeners Delight (GD).

• **Comparación de las propiedades mecánicas de la cutícula y cutina VM entre Cascada y Gardeners Delight**

Para la cutícula, Cascada presentó unos valores de módulo elástico significativamente mayores que los de Gardeners Delight a 40% de HR en cualquiera de las temperaturas, cuando esa cutícula se mojó ambos cultivares disminuyeron sus valores de E , pero Cascada se afectó mucho más y en mojado los valores de E de Gardeners Delight fueron superiores a los de Cascada (Tabla 4.3). El esfuerzo de fractura de la cutícula VM fue similar en los dos cultivares, y similar fue también la deformación máxima excepto para 35° C-mojado en que Cascada tuvo un valor mayor que Gardeners Delight quizá atribuible al bajo valor observado para éste último.

Tabla 4.3: Valores de E , σ_b y ϵ_b de cutícula aislada de frutos VM de Cascada y Gardeners Delight (media \pm error típico).

	Módulo elástico (E , MPa)		Esfuerzo de Fractura (σ_b , MPa)		Deformación Máxima (ϵ_b , %)	
	CASCADA	GARDENERS	CASCADA	GARDENERS	CASCADA	GARDENERS
23°C-40%	352 \pm 41.8	280 \pm 16.5	37 \pm 2.01	35 \pm 7.1	17 \pm 1.1	14 \pm 2.2
23°C-Moj.	91 \pm 7.3	145 \pm 12.5	21 \pm 2.6	21 \pm 2.1	24 \pm 3.5	18 \pm 2.9
35°C-40%	434 \pm 65.7	231 \pm 11.06	42 \pm 4.6	33 \pm 3.8	16 \pm 1.3	16 \pm 2.2
35°C-Moj.	93 \pm 5.3	159 \pm 6.9	21 \pm 1.06	24 \pm 1.9	25 \pm 2.4	17 \pm 1.3

Para la cutina, ambos cultivares tuvieron similar módulo elástico excepto a 23° C-40% HR en que Cascada fue superior (Tabla 4.4). Esa misma falta de diferencias significativas se apreció también en cuanto al esfuerzo de fractura y a la deformación máxima excepto para este último parámetro a 35° C-mojado en que Cascada fue superior; no obstante, a pesar de no haber diferencias significativas al comparar los valores de ambos cultivares dos a dos, sí se observó una tendencia general a ser superiores los mostrados por Cascada.

Tabla 4.4: Valores de E , σ_b y ε_b de cutina aislada de frutos VM de Cascada y Gardeners Delight (media \pm error típico).

	Módulo elástico (E , MPa)		Esfuerzo de Fractura (σ_b , MPa)		Deformación Máxima (ε_b , %)	
	CASCADA	GARDENERS	CASCADA	GARDENERS	CASCADA	GARDENERS
23°C-40%	15 \pm 1.6	10 \pm 1.1	6 \pm 0.6	4 \pm 0.5	37 \pm 5.3	33 \pm 6.0
23°C-Moj.	8 \pm 0.6	8 \pm 0.5	3 \pm 0.4	2 \pm 0.2	34 \pm 4.5	26 \pm 3.1
35°C-40%	9 \pm 1.1	10 \pm 0.7	4 \pm 0.7	3 \pm 0.3	39 \pm 5.3	28 \pm 3.0
35°C-Moj.	8 \pm 0.3	8 \pm 1.4	21 \pm 1.06	3 \pm 0.4	49 \pm 3.9	29 \pm 1.5

4. Comparación de las propiedades mecánicas de cutícula y cutina procedentes de frutos VM y RM

Cuando comparamos ambos estadios de maduración, se observó que los valores de E para la cutícula VM a 23° C y 40% HR eran menores que en RM en ambos cultivares y también tendieron a serlo a 35° C y 40% HR (Tabla 4.5); al mojar la cutícula su módulo elástico disminuía siempre, pero en mojado, mientras Gardeners presentó un E mayor en VM que en RM, en Cascada E fue mayor en RM o similar en los dos estadios. El esfuerzo de fractura en general fue similar en los dos estadios de maduración y en los dos cultivares, las diferencias significativas dignas de mención se dieron a 35° C-mojado con un E mayor en VM que en RM en los dos cultivares. La deformación máxima tampoco presentó variaciones notables ni entre cultivares ni entre estadios de maduración; sí se detectó tendencia a ser más alta en el caso de VM que en RM llegando esa tendencia a ser significativa en algunos casos.

Tabla 4.5: Valores de E , σ_b y ε_b de cutícula aislada de frutos VM y RM de Cascada y Gardeners Delight (media \pm error típico).

	Módulo elástico (E , MPa)		Esfuerzo de Fractura (σ_b , MPa)		Deformación Máxima (ε_b , %)	
	Cutícula VM	Cutícula RM	Cutícula VM	Cutícula RM	Cutícula VM	Cutícula RM
CASCADA						
23°C-40%	352 \pm 41.8	628 \pm 24.7	37 \pm 2.01	45 \pm 2.9	17 \pm 1.1	11 \pm 1.2
23°C-Moj.	91 \pm 7.3	130 \pm 6.4	21 \pm 2.6	25 \pm 2.9	24 \pm 3.5	19 \pm 1.4
35°C-40%	434 \pm 65.7	456 \pm 40.9	42 \pm 4.6	25 \pm 3.8	16 \pm 1.3	12 \pm 2.5
35°C-Moj.	93 \pm 5.3	92 \pm 3.8	21 \pm 1.06	13 \pm 1.5	25 \pm 2.4	14 \pm 1.6
GARDENERS						
23°C-40%	280 \pm 16.5	375 \pm 31.6	35 \pm 7.1	26 \pm 1.7	14 \pm 2.2	10 \pm 0.8
23°C-Moj.	145 \pm 12.5	98 \pm 3.7	21 \pm 2.1	22 \pm 2.2	18 \pm 2.9	22 \pm 2.5
35°C-40%	231 \pm 11.06	345 \pm 3.8	33 \pm 3.8	32	16 \pm 2.2	12 \pm 0.9
35°C-Moj.	159 \pm 6.9	105 \pm 10.6	24 \pm 1.9	16 \pm 1.7	17 \pm 1.3	15 \pm 1.6

El módulo elástico de la cutina aumento drásticamente al madurar el fruto en los dos cultivares: E se multiplicó por 2,5 a 3 veces en la mayoría de los casos, llegando hasta 4,5 veces para Gardeners a 23° C-40% HR; no se observaron diferencias importantes entre los dos cultivares (Tabla 4.6). El esfuerzo de fractura también aumentó, aunque en menor proporción que el módulo elástico, con la maduración; en este caso sí hubo diferencias entre los cultivares ya que Cascada en RM multiplicó los valores de σ_b entre 1 y 2 veces los de VM, mientras que Gardeners lo hizo de 2 a 3 veces, lo que hizo que Cascada tuviera unos valores similares o incluso mayores que Gardeners en VM y que Gardeners superase a Cascada en RM. La deformación máxima de la cutina disminuyó significativamente al pasar de VM a RM en los dos cultivares pero lo hizo con mayor intensidad en Cascada (entre un 30 y un 70%) que en Gardeners Delight (entre un 15 y un 30 %). La deformación máxima de Cascada en VM fue ligeramente superior a la mostrada por Gardeners, pero como disminuyó más al madurar, en RM ambos cultivares dieron valores similares en general.

Tabla 4.6: Valores de E , σ_b y ε_b de cutina aislada de frutos VM y RM de Cascada y Gardeners Delight (media \pm error típico).

	Módulo elástico (E , MPa)		Esfuerzo de Fractura (σ_b , MPa)		Deformación Máxima (ε_b , %)	
	Cutina VM	Cutina RM	Cutina VM	Cutina RM	Cutina VM	Cutina RM
CASCADA						
23°C-40%	15 \pm 1.6	45 \pm 5.4	6 \pm 0.6	12 \pm 1.4	37 \pm 5.3	27 \pm 5.3
23°C-Moj.	8 \pm 0.6	20 \pm 2.6	3 \pm 0.4	4 \pm 0.3	34 \pm 4.5	20 \pm 0.6
35°C-40%	9 \pm 1.1	32 \pm 3.9	4 \pm 0.7	6 \pm 0.5	39 \pm 5.3	23 \pm 2.8
35°C-Moj.	8 \pm 0.3	22 \pm 7.3	4 \pm 0.3	4 \pm 0.9	49 \pm 3.9	15 \pm 1.4
GARDENERS						
23°C-40%	10 \pm 1.1	45 \pm 3.3	4 \pm 0.5	11 \pm 0.5	33 \pm 6.0	22 \pm 2.1
23°C-Moj.	8 \pm 0.5	25 \pm 1.6	2 \pm 0.2	6 \pm 0.9	26 \pm 3.1	22 \pm 2.7
35°C-40%	1 \pm 0.7	32 \pm 2.6	3 \pm 0.3	8 \pm 1.2	28 \pm 3.0	24 \pm 2.1
35°C-Moj.	8 \pm 1.4	19 \pm 1.1	3 \pm 0.4	6 \pm 0.5	29 \pm 1.5	24 \pm 2.8

5. Estudio de los polisacáridos presentes en la cutícula del fruto

5.1 Localización y disposición de los polisacáridos en la cutícula

El proceso de extracción de polisacáridos a partir de cutícula aislada de fruto de tomate permitió obtener muestras con entidad e integridad suficiente para la posterior caracterización a nivel microscópico de su estructura. En la Figura 4.9 se muestran imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia de muestras de cutículas aisladas y del extracto de polisacáridos revelando su autofluorescencia con luz roja (Figura 4.9A y 4.9B) y su contraste con calcoflúor (Figura 4.9C y 4.9D) y rojo rutenio (Figura 4.9E y 4.9F) para poner de manifiesto la presencia de celulosa y pectina respectivamente.

Se podría afirmar que la estructura en el plano horizontal de la cutícula se presentó a modo de malla o red, tal y como se observa en la Figura 4.9 (A-C-D). Las zonas circulares ubicadas en el entramado en cada caso corresponderían al espacio que ocuparían las células epidérmicas antes del procesado del fruto para la extracción de la cutícula. El entramado se correspondería con los restos de paredes celulares asociados a tales células epidérmicas, restos fuertemente unidos o integrados en la cutícula ya que siguen presentando una notable integridad después de aislar las cutículas de los frutos con disolución conteniendo enzimas celulasas y pectinasas.

Las muestras de polisacáridos conservaron tras la extracción la forma en la que se disponían en la cutícula aislada, tal y como se observa en las imágenes de la derecha

de la misma Figura (4.9 B-D-F). Los polisacáridos cubren toda la cara interna de la cutícula, acumulándose especialmente en el perímetro de los huecos celulares, esto es en las paredes celulares. Esto puede observarse especialmente en la imagen de la muestra de polisacárido contrastado con calcoflúor donde sobre un fondo azul destacan los contornos celulares en tono celeste, resaltando la acumulación de celulosa en esa zona (Figura 4.9D). La tinción para pectinas con rojo rutenio de la cutícula revela también la acumulación de pectinas en tono rosa anaranjado en los perímetros de la cutícula (Figura 4.9E).

CUTÍCULA

POLISACÁRIDOS

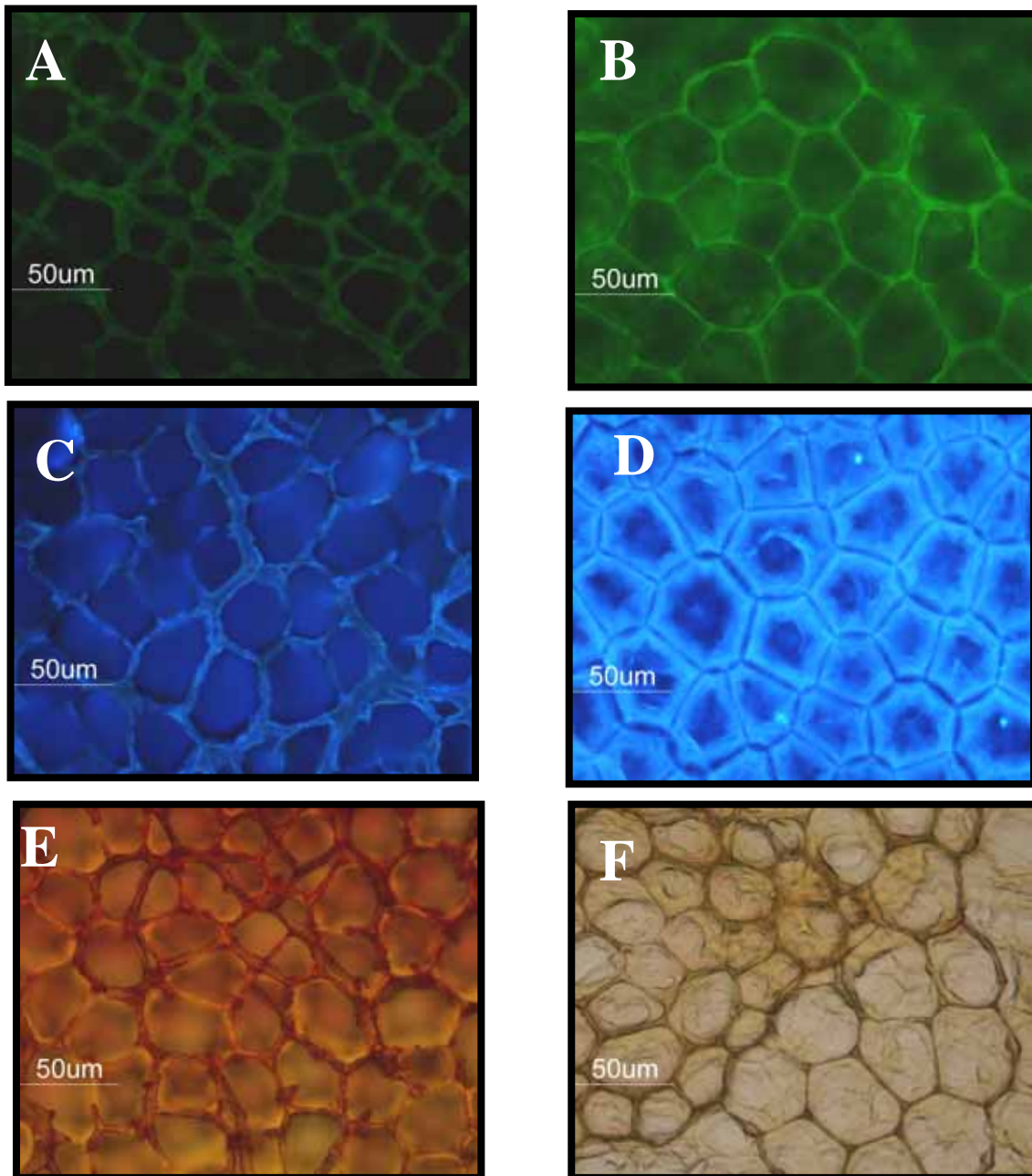


Figura 4.9: Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40X de muestras de cutículas aisladas (A, C, E) y extracto de polisacáridos (B, D, F). Las muestras de cutícula están teñidas por la cara interna que permanece en contacto con el fruto. Autofluorescencia (A y B), contraste de celulosa con calcoflúor (C y D), y tinción específica para pectinas con rojo rutenio (E y F).

5.2 Estudio de la cristalinidad y orientación de las muestras de polisacáridos

Con el objetivo de estimar parámetros moleculares relacionados con la cristalinidad u ordenamiento molecular de las muestras de polisacáridos selectivamente extraídas según el método comentado anteriormente, se llevaron a cabo análisis de dichas muestras mediante difracción de rayos X y microscopía vibracional Raman o espectroscopia micro Raman.

Los perfiles de difracción de rayos X obtenidos no mostraron ningún patrón relevante de orden a nivel molecular en las muestras investigadas (datos no mostrados). Por otro lado, el espectro micro Raman de la correspondiente muestra confirmó la escasa cristalinidad de estas muestras (Figura 4.10). El espectro recogido entre 2000 y 500 cm^{-1} es típico de una muestra de polisacáridos de distinta naturaleza. Sin embargo, es posible destacar en dicho espectro la presencia de unas absorciones a unas frecuencias determinadas que se utilizan, usualmente, como parámetro espectroscópico de cristalinidad de la celulosa. Asumiendo la existencia de celulosa en estas muestras, dicho espectro proporciona información sobre la cristalinidad y adicionalmente orientación de estos biopolímeros glucídicos. La ratio I_{1462}/I_{1481} de intensidades a dichas frecuencias se toma como una medida de la cristalinidad de la celulosa (Fisher y col., 2005). Conforme dicha ratio es mayor, menor es la cristalinidad. En nuestro caso, Figura 4.10, dicha ratio es baja indicando un escaso ordenamiento de este polisacárido.

Adicionalmente, el espectro micro Raman informa también de la orientación espacial de las fibras de celulosa. Concretamente, la ratio de intensidades a las frecuencias de aproximadamente 1090 y 1120 cm^{-1} se toma como medida de la orientación molecular de las fibras. Dicha ratio supone la razón entre las intensidades de los modos de vibración simétrico y asimétrico de los enlaces C-O-C (Edwards y col., 1997; Jähn y col., 2002). En las muestras de polisacáridos extraídas de las cutículas de fruto de tomate dicha razón de intensidades está de acuerdo con una escasa orientación de las fibras (Jähn y col., 2002).

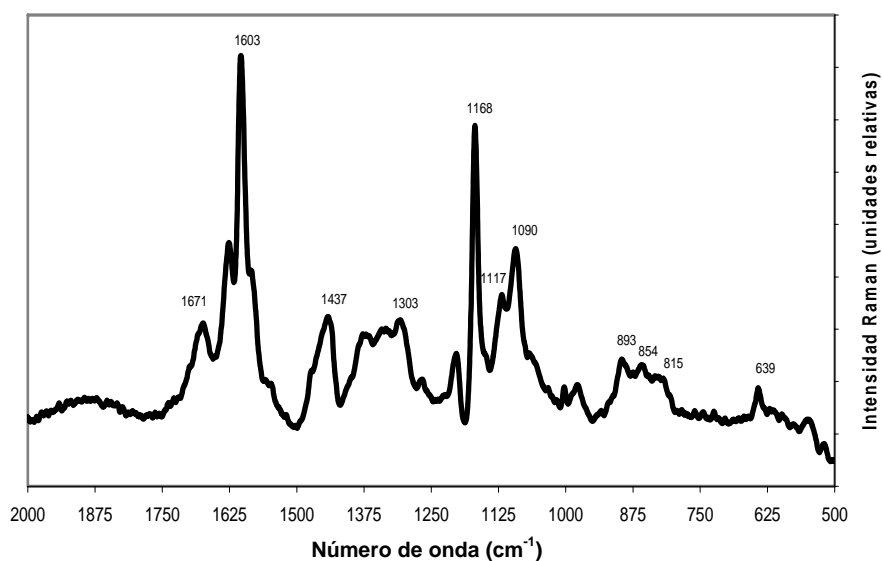


Figura 4.10: Espectro micro Raman de una muestra de polisacárido obtenido a partir de cutículas aisladas de fruto de tomate de Cascada en estadio rojo maduro.

5.3 Fraccionamiento, cuantificación relativa e identificación de tales compuestos polisacáridos

Previo al fraccionamiento de los extractos enriquecidos en polisacáridos de las distintas muestras con el objetivo de determinar los componentes principales de los mismos, se hizo una valoración de la cantidad de azúcares totales presentes en cada muestra. Así, mediante un método colorimétrico que nos permitió medir los valores de absorbancia a 450 nm y extrapolarlos a una recta patrón diseñada con glucosa (ver Material y Métodos), se obtuvo que, teniendo en cuenta los errores de medida, prácticamente la totalidad de la muestra (1000 μg de cada muestra) correspondía a azúcares totales, lo que garantizaba la naturaleza polisacáridica del material de partida para el posterior fraccionamiento. Los valores de las cantidades de azúcares totales estimadas en los extractos de partidas figuran a continuación en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7: Valores medios de azúcares totales expresados en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de muestra junto a sus medidas de desviación correspondientes. En cada caso se partió de 1000 μg de muestra. CaVM: Cascada Verde maduro; CaRM: Cascada Rojo Maduro; GDVM: Gardeners Delight Verde Maduro; GDRM: Gardeners Delight Rojo Maduro.

	CaVM	CaRM	GDVM	GDRM
Media ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	996.6	1152.8	880.5	1276.6
Desv. Típica	119.8	110.8	109.7	185.6
Error típico	12.02	9.6	12.4	14.5

En la Figura 4.11 se representan los porcentajes de pectinas totales, celulosas y hemicelulosas obtenidas tras el fraccionamiento de la capa de polisacáridos extraída de las cutículas de los frutos de Cascada y Gardeners Delight de los estadios Verde Maduro (VM) y Rojo Maduro (RM), según el protocolo de fraccionamiento indicado en Material y Métodos. Cada fracción de polisacáridos osciló entre el 20 y 30% del total de polisacáridos de cada muestra con distintas variaciones dependiendo de cada caso. Según se puede observar, la suma de los porcentajes de pectinas, hemicelulosas y celulosas dentro de cada muestra no completa el 100% en ningún caso, dado que durante el protocolo de fraccionamiento tiene lugar una pérdida de material en torno al 15%-25%. Adicionalmente, en la Figura 4.12 se representan los porcentajes de los 3 tipos de pectinas obtenidas (solubles en agua, unidas iónicamente y unidas covalentemente) según la metodología indicada en el apartado de Material y Métodos.

En las muestras del cultivar Cascada VM, los porcentajes de pectinas y celulosas correspondieron al 28 y 32% respectivamente, encontrándose en menor proporción la fracción de hemicelulosas (18%). Esto ocurrió también cuando analizó el estadio RM del mismo cultivar; mientras las fracciones de pectinas y celulosas estaban representadas en igual proporción, aproximadamente un 25%, la fracción de hemicelulosas alcanzaba el 21%. Las pectinas solubles en agua fueron las más representativas dentro de la fracción de pectinas totales del estadio VM (14%), mientras que en el caso del estadio RM, tanto las pectinas solubles en agua como las solubles en CDTA se encontraron en igual proporción (11%).

Con respecto a las muestras del cultivar Gardeners Delight, en el estadio VM, pectinas totales y hemicelulosas corresponden al 15 y 18% respectivamente, siendo la fracción de celulosas la mayoritaria (31%). En el estadio RM, los tres tipos de polisacáridos analizados se encontraron en proporciones similares, correspondiendo el 21% a pectinas totales, 23% a hemicelulosas y 24% a celulosas. Desglosando el total de pectinas, mientras en estadio VM pectinas solubles en agua y pectinas solubles en CDTA fueron las mayoritarias (6 y 8% respectivamente), en el estadio RM fueron las pectinas solubles en carbonato las que se encontraron en mayor proporción (12%).

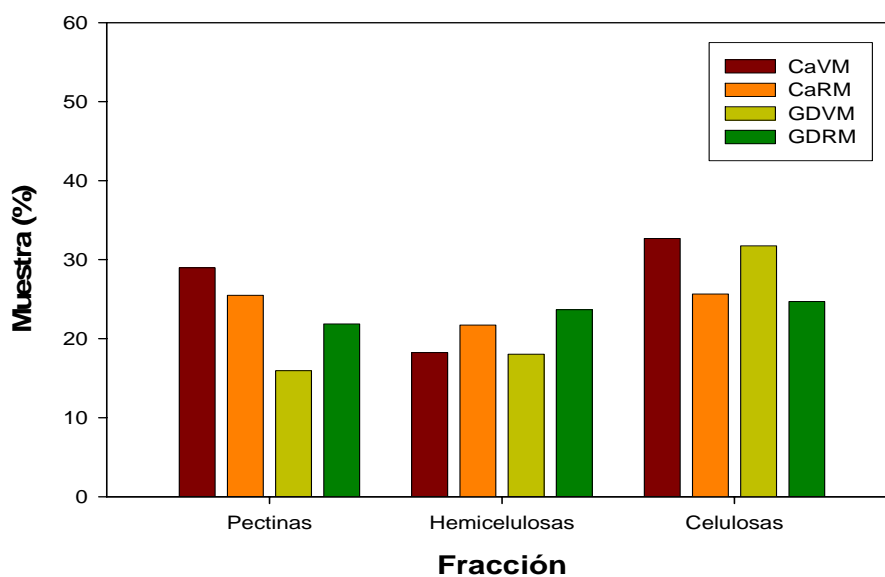


Figura 4.11: Porcentajes de pectinas totales, hemicelulosas y celulosas obtenidos tras el fraccionamiento de la capa de polisacáridos aislada de la cutícula del fruto de tomate de dos estadios de maduración y dos cultivares. CaVM: Cascada Verde maduro; CaRM: Cascada Rojo Maduro; GDVM: Gardeners Delight Verde Maduro; GDRM: Gardeners Delight Rojo Maduro.

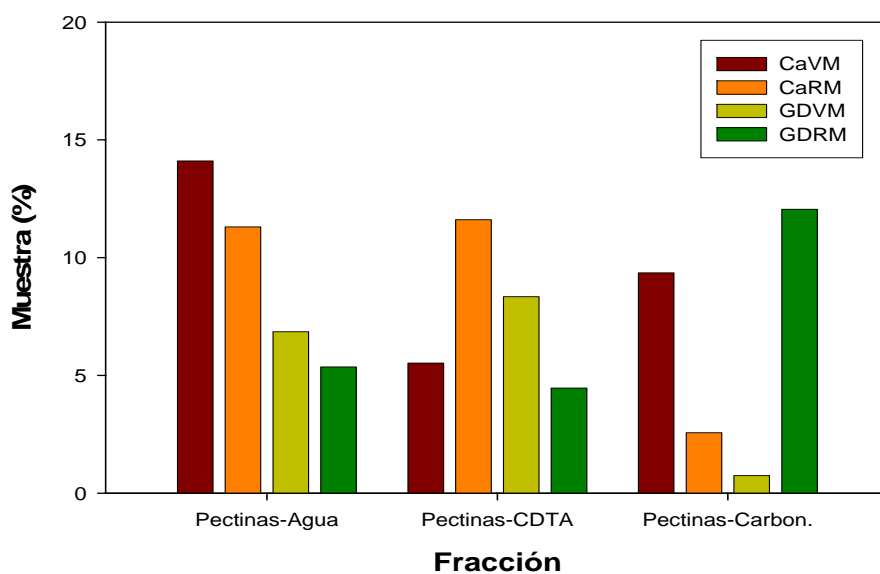


Figura 4.12: Porcentajes de los distintos tipos de pectinas (solubles en agua, CDTA y Carbonato) obtenidos tras el fraccionamiento de la capa de polisacáridos aislada de la cutícula del fruto de tomate de dos estadios de maduración y dos cultivares. CaVM: Cascada Verde maduro; CaRM: Cascada Rojo Maduro; GDVM: Gardeners Delight Verde Maduro; GDRM: Gardeners Delight Rojo Maduro.

DISCUSIÓN - II

Propiedades mecánicas de la cutícula del fruto de tomate

Las curvas de esfuerzo-deformación de las cutículas aisladas de fruto de tomate revelaron un comportamiento bifásico cuando los ensayos se realizaron en condiciones de 40% de humedad relativa. Este carácter bifásico se observó no sólo en las cutículas aisladas de frutos en estadio RM (Figura 4.4), sino también en aquellas procedentes de frutos verdes maduros, cuando se realizaban los ensayos en condiciones de 40% HR, tanto en cultivar Cascada como en Gardeners Delight.

El carácter viscoelástico de la piel del fruto de tomate fue ya observado por Thompson (2001) quién describió fenómenos de endurecimiento por la deformación cuando aplicaba ensayos de ciclos de carga y descarga, lo que sugiere que dichos ensayos provocaban una disminución sucesiva de la tasa de fluencia. Petracek y Bukovac (1995), quienes también mostraron el carácter viscoelástico de la membrana cuticular o cutícula (CM), obtuvieron resultados similares a los obtenidos en esta tesis. Este comportamiento bifásico no había sido descrito previamente en los escasos estudios de las propiedades biomecánicas de la cutícula de fruto de tomate (Petracek y Bukovac, 1995; Wiedeman y Neinhuis, 1998) ni en cutícula de frutos de otras especies. Es de reseñar, no obstante, que el comportamiento bifásico de otros tejidos vegetales ha sido descrito para fibras de *Agave americana* o *Cocos nucifera*, madera de *Juniperus virginiana*, tejidos sometidos a tensión de *Fontinalis antipyretica* y *Equisetum hyemale*, y para tallos de diversas especies de *Aristolochia* (Köler, 2000).

Recientemente Matas y col. (2005) han descrito el carácter bifásico de las cutículas aisladas de frutos de tomate en estadio rojo maduro, en condiciones de baja humedad frente al carácter monofásico observado en condiciones de mojado. En este trabajo, además de RM se observa carácter bifásico en cutícula de estadio VM, hecho apoyado por recientes publicaciones de Bargel y Neinhuis (2004-2005), quienes describen comportamiento en condiciones de baja humedad como bifásico y en mojado como curva cóncava.

En condiciones de mojado las curvas esfuerzo-extensión mostraron un carácter monofásico (Figura 4.4). La hidratación de la cutícula favoreció la disminución de su rigidez disminuyendo el módulo elástico y el esfuerzo de fractura y aumentando la

deformación máxima (Tablas 4.1 y 4.3). En condiciones de 23° C y mojado, el módulo elástico de la cutícula aislada disminuyó en torno a un 79% con respecto a las condiciones de baja humedad, lo cual está en concordancia con los porcentajes de reducción del módulo en presencia de agua del orden de un 50-70% descrito por otros autores (Bargel y Neinhuis, 2004).

Se podría afirmar que el agua, por tanto, actúa como un agente plastificador de la cutícula, según han descrito algunos autores en sus trabajos sobre propiedades reológicas de la cutícula (Petracek y Bukovac 1995; Wiedeman y Neinhuis, 1998). Este efecto de plastificado se puede describir como una disminución de la fuerza de fractura, del módulo elástico, y posiblemente, de la viscosidad del polímero (Matas y col, 2005; Bargel y Neinhuis, 2005).

Estos resultados están en buena concordancia con los obtenidos por Round y col. (2000) mediante microscopía de fuerza atómica y resonancia magnética nuclear de estado sólido, quienes indicaban que el agua absorbida por la cutícula del fruto de tomate actuaba como un plastificador favoreciendo una flexibilidad molecular que ablandaba el polímero y, en consecuencia, disminuía su módulo elástico. 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. No obstante, la influencia del agua en el comportamiento mecánico de la cutícula del fruto de tomate in vivo depende en alto grado de la cantidad de agua presente en la misma. Aunque existen varios estudios acerca de la capacidad de absorción de las cutículas aisladas de varias especies, incluida la del fruto de tomate (Chamel y col., 1991; Coret y Chamel, 1993; Luque y col., 1995b), el estado natural de hidratación de la cutícula cuando está formando parte del fruto está aún por determinar.

Por otro lado, el aumento de temperatura afecta también a la rigidez de la cutícula aislada disminuyendo en este caso el módulo elástico cuando la temperatura cambia de 23° C a 35° C en condiciones de 40% HR en estadio RM. Esta disminución de la rigidez es menor que cuando se somete la cutícula a condiciones de mojado para 35° C. Se mantiene el carácter bifásico de la cutícula incluso a 35° C.

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, que se muestra más patente en la cutina purificada (Matas y col., 2004a). Según estos autores, las muestras de cutina procedente de cutícula de fruto de tomate presentan una clara transición de segundo orden, semejante a una transición vítrea, en un rango de temperaturas entre 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 un polímero se activan por la temperatura, condicionando las propiedades mecánicas y reológicas del polímero (Rodríguez, 1989).

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 una temperatura de transición vítrea implica la existencia de determinados cambios conformacionales en la disposición macromolecular amorfa del poliéster. 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 (Matas y col., 2004a).

La presencia de agua y las distintas condiciones de temperatura afectan por tanto a las propiedades mecánicas de la cutícula aislada de fruto de tomate. Sin embargo, este efecto depende a su vez del estadio de maduración del fruto de tomate y por tanto, del estado de su cutícula.

Si bien es común el efecto que ejerce el agua en la rigidez de la cutícula para ambos estadios de maduración y cultivares, disminuyendo el módulo elástico y esfuerzo máximo especialmente a 23° C, la temperatura no parece tener el mismo efecto en el caso del cultivar Gardeners Delight (Tabla 4.3).

En igualdad de condiciones, las cutículas de distintos estadios de maduración presentan distintas propiedades mecánicas cuando son sometidas a ensayos de fluencia. Tomando como referencia la condición de 23° C y 40% HR, las cutículas aisladas de frutos RM de los dos cultivares son más rígidas que las del estadio VM, ya que presentan mayor módulo elástico y similar esfuerzo de fractura, mientras que la máxima deformación es menor. Esto mismo tiende a ocurrir a 35° C y 40% de HR. Sin embargo al mojar la cutícula, el descenso descrito más arriba en cuanto a módulo elástico se hizo más patente en cutículas de frutos RM que de frutos VM: el agua sería más determinante de la disminución de la rigidez en RM, coincidiendo con que es en este estadio en el que se observa el agrietado del fruto. Según Bargel y Neinhuis (2004) esta diferencia entre estadios VM y RM puede deberse al incremento en las fibras de celulosa en la matriz de cutina que tiene lugar durante el desarrollo del fruto de tomate, permitiendo así una mayor capacidad de unión al agua. Sin embargo, Baker y col. (1982) describieron en su cultivar de estudio una mayor proporción del residuo de cutícula que contenía celulosa en estadio VM.

En igualdad de condiciones, aunque el efecto de temperatura y humedad sobre las cutículas RM de Cascada y Gardeners Delight fuera similar, el valor absoluto de los parámetros estudiados varió considerablemente. En general, las cutículas aisladas RM de Cascada presentaron mayor módulo, mayor esfuerzo de fractura y similar deformación máxima. Cutículas por tanto más rígidas que necesitan de un mayor esfuerzo de fractura en el cultivar tolerante Cascada para llegar a una deformación máxima similar a la del cultivar susceptible Gardeners Delight. Estas diferencias se suavizaron cuando aumentó la temperatura o se sometió a condiciones de mojado (Tabla 4.1).

Por otro lado, Matas y col. (2004b) propusieron un modelo basado en el grado de cutinización y en el contenido en polisacáridos para explicar las diferencias en propiedades mecánicas entre cultivares. Las fibras de celulosa cutinizadas de las paredes celulares de las células epidérmicas dentro de las cutículas contribuyen a los cambios en la rigidez relacionados con la maduración de acuerdo con la teoría de materiales compuestos de Courtney (1990). Así, las diferencias descritas en la respuesta mecánica de la cutícula aislada de frutos en estadio RM de dos cultivares con distinta susceptibilidad al agrietado (Cascada como cv. tolerante y Gardeners Delight como cv.

susceptible) podrían atribuirse a las diferencias en grosor de cutícula y grado de invaginación descrito previamente en el capítulo anterior.

Propiedades mecánicas de la cutina del fruto de tomate

Las curvas esfuerzo-extensión de cutina RM presentaron comportamiento monofásico tanto en condiciones de 40% HR como en mojado (Figura 4.4). Si atendemos a las curvas deformación-tiempo, es un comportamiento viscoelástico, similar al descrito para las curvas monofásicas de cutícula en mojado (Figura 4.3).

El aumento de temperatura y las condiciones de mojado contribuyeron a la disminución del módulo elástico y del esfuerzo de fractura, tal y como se describía en cutícula, así como al aumento de la deformación máxima en Cascada en condiciones de mojado para cualquiera de las dos temperaturas estudiadas (Figuras 4.5 y 4.6).

El módulo elástico de la cutina fue un 92% inferior en Cascada y 88% inferior en Gardeners Delight que el de la cutícula en igualdad de condiciones (23° C-40% HR), siendo menor incluso que en condiciones de mojado. El esfuerzo de fractura también fue un 73% y 57% respectivamente menor mientras que la máxima deformación fue un 60% y 55% superior bajo estas condiciones.

Es interesante resaltar que la maduración produjo un cambio notable en las propiedades mecánicas de la cutina: ésta se hizo más rígida, requirió un esfuerzo de fractura mayor y la deformación máxima tendió a ser mayor. Las diferencias descritas entre estadios de maduración VM y RM de cutícula aislada se reprodujeron en la cutina de ambos estadios y cultivares.

La presencia de flavonoides, el grado de entrecruzamiento de la cutina y el tipo de monómeros de ácidos grasos son factores que cambian durante la maduración del fruto y que afectan a la cutina de forma independiente a los polisacáridos. El incremento de los niveles de ácido *p*-cumárico y flavonoides totales como naringerina y calconaringerina en la cutícula del fruto de tomate durante la maduración han sido aportados por varios autores (Schönherr y Bukovac, 1973; Hunt y Baker, 1980; Baker y col., 1982; Luque y col., 1995a; Laguna y col., 1999). Estos constituyentes fenólicos

son sintetizados y transportados por las células epidérmicas a la cutícula, estando presentes tanto en la cutina (5-10% del peso total) como en las ceras epicuticulares (10-40% del peso total) en el caso de frutos de tomate (Hunt y Baker, 1980; Baker y col., 1982). Los flavonoides parecen encontrarse en la cutina formando “clusters” moleculares o uniones covalentes a la cutina (Luque y col., 1995a), probablemente mediante puentes de hidrógeno y grupos hidroxilos secundarios (Deas y Holloway, 1977; Heredia, 2003). Los flavonoides juegan un papel importante en el transporte de agua a través de la cutícula, obstruyendo la ruta de transporte en el caso de las cutículas de fruto rojo maduro (Luque y col., 1995a). Debido a esto en parte, diversos autores atribuyen a estos compuestos fenólicos (Bargel y Neinhuis, 2004) el ser diana candidata en la determinación del comportamiento mecánico de la membrana externa del fruto, contribuyendo a un aumento de la rigidez de la cutícula de fruto rojo maduro al disminuir la disponibilidad de grupos hidroxilos libres en la matriz de cutina (Bargel y Neinhuis, 2005).

La composición molecular del poliéster de la matriz de cutina cambia durante el proceso de maduración del fruto. Así, las cutículas aisladas de frutos de los estadios verde inmaduro y verde maduro presentan un menor grado de entrecruzamiento (Matas y col., 2004b). Conforme el fruto madura, aumenta este grado de entrecruzamiento por ejemplo en los sitios de grupos hidroxilos secundarios, y un reducido estado hidratado podría permitir la descrita rigidez en la completa maduración (Vincent 1990; Marga y col., 2001).

Por otro lado, hay autores que apuntan que los cambios observados en las propiedades mecánicas de la cutícula en relación con la maduración estarían determinados principalmente por modificaciones en la composición química de la cutina (Bargel y Neinhuis, 2004). Baker y col., (1982) mostraron que la cantidad de ácidos grasos trihidroxi C18 en cutícula de fruto de tomate disminuía durante la maduración, siendo casi indetectable en estadio rojo maduro, aunque la presencia de éstos no representara más del 5% del total de monómeros tras la despolimerización de la cutina en estadio verde inmaduro. Marga y col., (2001) atribuían las diferencias en las propiedades mecánicas de las cutículas de distintos órganos y especies a la predominancia de determinados tipos de monómeros de cutina. Así, caracterizaba cutículas más rígidas aquellas constituidas por monómeros C16, mientras que

caracterizaba cutículas elásticas las que presentaban monómeros una mezcla entre ambos tipos de monómeros. De este modo, los grupos hidroxilos podrían potenciar el carácter hidrofílico y el estado hidratado de la matriz de cutina, lo cual resultaría en una mayor elasticidad en el estado inmaduro (Bargel y Neinhuis, 2004). Graca y col., (2002) caracterizaron la cutina de frutos de tomate RM como tipo C16 como monómero de cutina dominante, y reportaron pequeñas cantidades de glicerol, significativo sólo en el caso de frutos maduros, como constituyente esterificante en la matriz de cutina que posiblemente reforzara la estructura del polímero. Los grupos hidroxilos parecen potenciar el carácter hidrofílico y posiblemente el estado hidratado de la matriz de cutina de tomate, lo cual resultaría en una mayor extensibilidad de los frutos inmaduros (Bargel y Neinhuis, 2004). Este escenario podría razonablemente aplicarse al incremento de la rigidez de las cutículas aisladas de frutos RM relacionado con la madurez.

Sin embargo, aunque los cambios que tienen lugar durante la maduración del fruto en la cutina en base a la presencia de flavonoides, el grado de entrecruzamiento y el tipo de monómeros libres en la cutina puedan contribuir en mayor o menor medida a los cambios en la rigidez de la cutícula propios de la maduración del fruto según la bibliografía, en este trabajo se demuestra el papel determinante que juegan los compuestos polisacáridos en la respuesta mecánica de la cutícula frente a un esfuerzo aplicado.

Papel de los polisacáridos asociados a la cutícula

Los polisacáridos incorporados en el polímero contribuyen de forma significativa a la absorción de agua en la cutícula vegetal, dependiendo del contenido en polisacáridos (Chamel y col., 1991; Dominguez y Heredia, 1999). Así, el carácter monofásico de las curvas esfuerzo-extensión de cutina en condiciones de baja humedad, junto con la disminución que sufre el módulo elástico de la cutina (ausencia de polisacáridos) cuando comparamos con la cutícula (presencia de polisacáridos), podría estar indicando que los polisacáridos podrían ser la diana del agua. La cutina presenta un comportamiento viscoelástico. Sin embargo, y a pesar de ser el componente mayoritario de la cutícula, parecen ser los compuestos polisacáridos los que otorgan rigidez a la cutícula. En condiciones de baja humedad y temperatura, cutícula y cutina

presentaban valores de módulo elástico del orden de megapascales; aunque no se ha podido determinar el valor del módulo elástico en la fracción polisacáridica aislada de tales cutículas, en la bibliografía se describen valores del módulo elástico de fibras de celulosa aisladas de otros materiales del orden de gigapascales (Sturcová y col., 2005).

Estudiando en conjunto las propiedades mecánicas de la cutina de frutos RM de ambos cultivares entre sí, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados frente a las distintas condiciones de humedad y temperatura empleadas (Tabla 4.2). La ausencia de diferencias significativas en las propiedades mecánicas de la cutina y la emergencia de éstas cuando se estudia la cutícula de ambos cultivares podría estar señalando el interés de la componente polisacáridica de la cutícula como carácter diferenciador entre cultivares. Si bien el porcentaje total de compuestos hidrolizables entre los que se encuentran los polisacáridos como mayoritarios, no varía en las cutículas de frutos en estadio RM de estos dos cultivares, Cascada y Gardeners Delight, entre sí, constituyendo alrededor de un 15% en cada cultivar (Matas, 2005), el porcentaje de cada uno de ellos no es significativamente diferente (Figura 4.11). El porcentaje de pectinas, hemicelulosas y celulosas en cutícula aislada oscilaba entre el 21 y 25% entre ambos cultivares. El método empleado para la extracción de polisacáridos fue efectivo ya que se obtuvo alrededor de un 10% de compuestos polisacáridos de cada grupo de cutículas, frente al 15% determinado por otros métodos. El método aplicado para determinar la cantidad de azúcares totales en cada obtención selectiva de polisacáridos mostró la pureza de la extracción en cada caso, siendo la sobreestimación en azúcares totales por este método colorimétrico descrita también en la bibliografía (Seymour, 1990). Cabe comentar que estos porcentajes se asemejan a los descritos en la bibliografía para pared celular de tomate siendo del 28% para pectinas, 30% para xiloglucanos y hemicelulosas y 23% para celulosa (Reinders y col., 1999). No obstante, ni el porcentaje ni el tipo de polisacáridos parecen ser diferentes entre cultivares tolerantes y resistentes al agrietado en este caso.

Trabajos realizados en paredes celulares indican que la orientación de las fibras de celulosa presentes en las paredes celulares de células epidérmicas podrían estar determinando las propiedades mecánicas de las mismas (Kerstens y col., 2001). Técnicas como microdifracción de rayos X y microscopía electrónica de transmisión han sido empleadas para el estudio de la orientación de estas fibras en distintos

materiales (Lichtenegger y col., 1999; Jakob y col., 1955; Müller y col., 1998). Otros autores han empleado microscopía láser confocal con luz polarizada y aprovechan el dichroísmo que presenta el rojo congo en su emisión de fluorescencia para estudiar la orientación de las fibras de celulosa en paredes celulares de hojas, tallos, semillas y raíces de diversas especies entre las que se encuentran *Arabidopsis thaliana* L., *Allium cepa* L., *Zea mais* L.; en general encuentran que las células presentan una orientación preferente de las fibras de celulosa en la pared celular perpendicular al eje longitudinal de las células (Verbelen y Stickens, 1995; Verbelen y Kerstens, 2000; Kerstens y Verbelen, 2003). Incluso la morfología de la célula está determinada por la orientación de éstas fibras en la pared celular (Verbelen y Stickens, 1995). Mediante ensayos de extensimetría y microscopía láser confocal se puso de manifiesto que la orientación de las fibras de celulosa jugaba un papel importante en las propiedades mecánicas del material ya que determinaba la anisotropía de la pared celular vegetal (Kerstens y col., 2001) y la dirección de crecimiento de células y órganos (Niklas, 1992; Verbelen y col., 2001).

No obstante, la disposición de una orientación preferente de las fibras de celulosa ha sido descrita en paredes celulares de distintos tejidos pero no en cutícula de fruto. Aunque puedan existir diferencias en cuanto a la orientación de dichas fibras en la pared celular de un mismo tejido entre distintas especies, no es presumible que estas diferencias pudieran conservarse entre cultivares o variedades de la misma especie. Como se describió en la Figura 4.9, las fibras de celulosa presentes en las cutículas extraídas de los frutos de tomate presentaban una baja cristalinidad y orientación.

Integración de polisacáridos y cutina

Observaciones de microscopía muestran que el agrietado cuticular del fruto de tomate se origina primeramente en la parte de la cutícula situada sobre las uniones celulares que se encuentra formando “pegs” (Wilson y Sterling, 1976; Holloway 1982a). Estas zonas parecen estar compuestas por material no reticulado que presenta una electrodensidad más baja que el material cuticular que cubre la superficie tangencial de las células epidérmicas (Emmons y Scott, 1998a). Esta diferencia en apariencia podría indicar una diferencia en la estructura química o morfología de la membrana cuticular en las uniones celulares. La apariencia de las regiones reticuladas sobre las

paredes tangenciales indica la presencia de celulosa, que no está presente en las regiones de los pegs, dándoles a éstos una apariencia amorfa. Si el material no celulósico y amorfo es más débil que la cutícula situada sobre las células epidérmicas entonces, según la presión de turgencia que es ejercida desde el interior del fruto, las uniones celulares presentarían la menor resistencia a la presión y serían las primeras áreas que agrietarían. En los trabajos realizados por estos autores, el 82% de las grietas originadas en la cutícula tienen lugar sobre las uniones celulares. Por tanto, podría afirmarse una vez más que el papel de los polisacáridos en la cutícula es determinante en la resistencia mecánica de ésta. De este modo, aquellas cutículas que presentaran mayor proporción de polisacáridos o una mayor distribución en el entramado de cutina podrían responder a tensiones mecánicas ofreciendo mayor resistencia a deformarse, y en última instancia, a provocar el agrietado del fruto.

Por tanto, a la vista de estos resultados, podría decirse que son varios los factores implicados en la resistencia mecánica de la cutícula los que marcan las diferencias en cuanto a susceptibilidad al agrietado entre cultivares. En primer lugar, el grosor de cutícula es importante porque es donde mayor presión ejercen las células epidérmicas desde el interior del fruto. En segundo lugar, conociendo que la mayor parte de los polisacáridos se acumulan en la cara interna de la cutícula, el grado de invaginación de ésta en la epidermis cobra importancia ya que contribuye a soportar la presión ejercida. Ambos factores conservan sus diferencias entre cultivares con distinta susceptibilidad o resistencia al agrietado. Por último, considerando que tanto el tipo como la proporción y la orientación o disposición de los polisacáridos presentes en la cutícula son similares entre cultivares, una mayor interacción entre polisacáridos y cutícula, así como una mayor cantidad de polisacáridos contribuirían a la resistencia mecánica del tejido y por tanto a la resistencia al agrietado del fruto.

CONCLUSIONES

Los cultivares Cascada y Gardeners Delight presentan distinta susceptibilidad al agrietado. El empleo de solución de riego con elevada conductividad eléctrica disminuye el porcentaje de agrietado, peso y tamaño final del fruto. Sin embargo, ni el peso y el tamaño se presentan como factores determinantes en la resistencia del agrietado.

Los estudios sobre las fluctuaciones diarias de crecimiento indican que el agrietado tiene lugar no por un sobrepaso del límite máximo de extensión del fruto, sino por un debilitamiento o fatiga del material debido a los sucesivos ciclos de expansión-contracción del fruto en la etapa final de la maduración.

La piel del cultivar tolerante Cascada presenta caracteres morfológicos y propiedades mecánicas diferentes a las del cultivar susceptible Gardeners Delight. Por un lado, un mayor grosor de cutícula y grado de invaginación de la misma en la epidermis, así como la forma ligeramente redondeada de las células epidérmicas parecen ser caracteres que confieren resistencia al material. Por otro, la epidermis de los frutos del cultivar tolerante Cascada ofrece necesita de un mayor esfuerzo para propagar una grieta ya iniciada en el tejido y muestra una mayor resistencia a la deformación con respecto a la epidermis de frutos de Gardeners. En estadio verde maduro, la epidermis presenta un grosor de cutícula mayor que en estadio rojo maduro y células más pequeñas y redondeadas, y ofrece una mayor resistencia a propagar una grieta ya iniciada en el tejido. La salinidad potencia los caracteres morfológicos asociados a la resistencia al agrietado, ya que aumenta el grosor de la cutícula, disminuye el tamaño de las células epidérmicas y favorece la forma redondeada de éstas. La salinidad también influye en las propiedades mecánicas de la epidermis, confiriéndole mayor resistencia a la deformación, si bien el modo en que actúa es diferente en cada cultivar.

Cutícula y cutina aislada de frutos de tomate presentan propiedades mecánicas diferentes. Así, la cutícula ofrece mayor resistencia a la deformación, alcanzando una menor deformación frente a un esfuerzo aplicado con respecto a la cutina. Aun siendo la cutina el componente mayoritario de la cutícula, son los compuestos polisacáridos los que le confieren tal rigidez a la cutícula. La hidratación y la presencia de agua en la cutícula actúan sobre los polisacáridos, disminuyendo los valores de módulo elástico y restando por tanto rigidez a la cutícula.

Las diferencias en cuanto al comportamiento mecánico de la cutícula de ambos cultivares y la ausencia de éstas cuando se compara con la cutina, indica que son los compuestos polisacáridicos los responsables de la distinta respuesta al agrietado. Dado que ni la proporción, ni la orientación molecular ni la naturaleza de éstos parece ser diferente, podría pensarse que las diferencias en cuanto a los polisacáridos de estos dos cultivares estarían en el modo en que interactúan con la cutícula y en cómo ésta se invagina en la epidermis.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Adams P.** 1991. Effects of increasing the salinity of the nutrient solution with major nutrients or sodium chloride on the yield, quality and composition of tomatoes grown in rockwool. *Journal of Horticulture Science* **66**: 201-207.
- 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., Moreshet S., Yao C. y Stanghellini, C.** 1999. Cuticular cracking in bell pepper fruit: II. Effects of fruit water relations and fruit expansion. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. **74**(1): 1-5.
- An P., Iananaga S., Lux A., Li X.J., Eneji A.E., Zhu N.W.** 2005. Interactive effects of salinity and relative humidity on two tomato cultivars differing in salt tolerance. *Journal of plant nutrition* **28**: 459-473.
- 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.** 2002a. 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.
- Andrews J., Adams S.R., Burton, K.S. y Edmondson R.N.** 2002b. Partial purification of tomato fruit peroxidase and its effect on the mechanical properties of tomato fruit skin. *Journal of Experimental Botany* **53**(379): 2393-2399.
- 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.
- Auerswald, H., Schwarz, D., Kornelson, C., Krumbein, A., y Bruckner, B.** 1999. Sensory analysis, sugar and acid content of tomato at different EC values of the nutrient solution. *Scientia Horticulturae* **82**: 227-242.
- 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. Russetting 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.
- Bargel H. y Neinhuis, C.** 2005. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1049-1060.
- Bargel H. y Neinhuis C.** 2004. Altered tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit cuticle biomechanics of a pleiotropic non ripening mutant. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**, 61-75.
- 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.
- Beecher, G. R.** 1998. Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **218**: 98-100.
- Berenguer JJ., Escobar I. y Cuartero J.** 2002. Greenhouse cultivation of cherry tomatoes in Spain. International Symposium on Cherry Tomatoes. Santorini, Greece.
- Bolarin M. C., Fernandez F. G., Cruz V., y Cuartero J.** 1991. Salinity Tolerance in 4 Wild Tomato Species Using Vegetative Yield Salinity Response Curves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**: 286-290.
- 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 function. *Scanning electron microscopy*. 213-223 Part. 3.
- Carpita, N.C. y Gibeaut D.M.** 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* **3**: 1-30.
- 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. En: Nuez, F. (ed.). El cultivo del tomate. Madrid:Mundiprensa. P. 189-225.
- 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.
- Considine J.A. y Knox R.B.** 1979. Development and histochemistry of the cells, cell walls, and cuticle of the dermal system of fruit of the grape *Vitis vinifera* L. *Protoplasma* **99**: 347-365.
- Coret J. y Chamel A.** 1993. Influence of some non-ionic surfactans on water sorption by isolated tomato fruit cuticles in relation to cuticular penetration of glyphosate, *Pestic Sci* **38**: 27-32.
- Cornish P.S.** 1992. Use of high electrical conductivity of nutrient solution to improve the quality of salad tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) grown in hydroponic culture. *Aust. J. Expt. Agr.* **32**: 513-520.
- 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.
- Cosgrove D.J.** 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiology* **125**: 131-134.
- 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-&.
- Courtney T.H.** 1990. Mechanical behaviour of materials. New York, Singapore: McGraw-Hill 220-262.
- Cruz V., Cuartero, J., Bolarin, M.C. y Romero, M.** 1990. Evaluation of characters for ascertaining salt stress responses in *Lycopersicon* species. *Journal of American Society Horticulture Science* **155**: 1000-1003.
- 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.
- Cuartero J. y Fernandez-Munoz R.** 1999. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae* **78**: 83-125.
- Cuartero J., Bolarin M. C., Asins M. J., y Moreno V.** 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1045-1058.
- Davis J.M., Sanders D.C., Nelson P.V., Lengnick L. y Sperry W.J.** 2003. Boron improves growth, yield, quality and nutrient content of tomato. *Journal of American and Horticultural Science* **128**: 441-446.
- 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.
- Dickinson D.B. y McCollum, J.P.** 1964. The effect of calcium on cracking in tomato fruit. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **84**: 485-490.

- Dominguez E.** 2000. Mejora genética de la fertilidad del polen de tomate a bajas temperaturas: aprovechamiento de la selección gametofítica. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Dominguez E. y Heredia A.** 1999. Water hydration in cutinized cell walls: a physico-chemical analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* **146**: 168-176.
- Dorais M., Demers D.A., Papadopoulos A.P. y Van Ieperen W.** 2004. Greenhouse tomato fruit cuticle cracking. *Horticultural Reviews* **30**(5): 163-184.
- Dorais M., Papadopoulos, A.P. y Gosselin A.** 2001. Greenhouse tomato fruit quality. *Horticulture Review* **26**: 239-319.
- Edwards H.G.M., Farwell D.W. y Webster D.** 1997. FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres. *Spectrochimica Acta part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **53** (13): 2383-2392.
- 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.
- Ehret D. L.** 1986. The Effects of Salinity on Dry-Matter Partitioning and Fruit-Growth in Tomatoes Grown in Nutrient Film Culture. *Journal of Horticultural Science* **61**: 361-367.
- Ehret D. L. y Ho L. C.** 1986. Effects of Osmotic Potential in Nutrient Solution on Diurnal Growth of Tomato Fruit. *Journal of Experimental Botany* **37**: 1294-1302.
- 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.** 1977. Anatomy of seed plants (2^{ed}). John Wiley & Sons, Nueva York, Estados Unidos.
- Espelie K.E., Franceschi V.R. y Kolattukudy P.E.** 1986. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato-tuber tissue. *Plant Physiology* **81** (2): 487-492.
- 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.
- Fang X., iu F., Yan B., Wang H., Mort A.J. y Stark R.E.** 2001. NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters. *Phytochemistry* **57**: 1035-1042.
- FAO/FAOSTAT.** Bases de datos estadísticos de la FAO. 2006. <http://faostat.fao.org>.
- Ferrer M.A., Munoz R. y Barcelo A.R.** 1991. A biochemical and cytochemical study of the cuticle-associated peroxidases in *Lupinus*. *Annals of Botany* **67** (6): 561-568.
- Fischer S., Schenzel K., Fisher K. y Diepenbrock W.** 2005. Applications of FT Raman Spectroscopy and Micro Spectroscopy characterizin cellulose and cellulosic biomaterials. *Macromolecule Symposium* **223**: 41-56.

- Flores P., Navarro J.M., Carvajal M., Cerda A. y Martínez V.** 2003. Tomato yield and quality as affected by nitrogen source and salinity. *Agronomie* **23**(3): 249-256.
- 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.
- Fry S.C.** 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell-walls of angiosperms. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **37**: 165-186.
- Fry S.C.** 1989. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth. A possible relationship. *Physiologia Plantarum* **75**(4): 532-536.
- García-Luis A., Duarte A.M.M., Porras 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.
- Giovannoni J.** 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 725-49.
- 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.
- Gormley T.R. y Maher M.J.** 1990. Tomato fruit quality: an interdisciplinary approach. *Prof. Hort.* **4**: 107-112.
- Graca J., Schreiber L., Rodriguez J. y Pereira H.** 2002. Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* **61**: 205-215.
- 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.
- Hatfield R.D., Wilson J.R. y Mertens D.R.** 1999. Composition of cell walls isolated from cell types of grain sorghum stems. *Journal of the science of food and agriculture* **79** (6): 891-899.
- 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.
- Hernandez 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.
- Ho L. y Hewitt J.** 1986. Fruit development, En *The Tomato Crop*. Atherton J.G. y Rudich J., eds (Chapman y Hall) 201-239.
- Hobson G.E.** 1965. Firmness of tomato fruit in relation to polygalacturonase activity. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **40**(1): 66-72.
- Hobson G.E.** 1988. Pre and post-harvest strategies in the production of high quality tomato fruit. *Appl. Agr. Res.* **3**: 282-287.
- 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 J.S. y Snapp** 2004. The effect of boron, calcium and surface moisture on shoulder check, a quality defect in fresh-market tomato. American Society of Horticultural Science. **129** (4).
- 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.
- Huang X.M., Huang H.B., Wang H.C.** 2005. Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Scientia Horticulturae* **104** (3): 249-263.
- Hunt G.M. y Baker E.A.** 1980. Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* **19**(5): 1415-1419.
- Jähn A., Schröder M.W., Fütting M., Schenzel K. y Diepenbrock W.** 2005. Characterization of alkali treated fibres by means of FT Raman spectroscopy and environmental scanning electron microscopy. *Spectrochimica Acta part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **58**: 2271-2279.
- Jakob H.F., Fengel D., Tschegg S.E. y Fratzl P.** 1995. The elementary cellulose fibril in *Picea abies*: Comparison of transmission electron microscopy, small-angle X-ray scattering, and wide-angle X-ray scattering results. *Macromolecules* **28**, 8782-8787.
- 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.
- Johnson, R. W., Dixon, M. A., y Lee, D. R.** 1992. Water Relations of the Tomato During Fruit-Growth. *Plant Cell and Environment* **15**: 947-953.
- 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.
- Keegstra K., Talmadge K.W., Bauer W.D. y Albershep P.** 1973. Structure of plant-cell walls 3. Model of walls of suspension-cultured sycamore cells based on interconnections of macromolecular components. *Plant Physiology* **51**(1): 188-196.

- Kerstens S. y Verbelen J. P.** 2003. Cellulose orientation at the surface of the Arabidopsis seedling. Implications for the biomechanics in plant development. *Journal of Structural Biology* 144, 262-270.
- Kerstens S., Decraemer W.F. y Verbelen J.P.** 2001. Cell walls at the plant surface behave mechanically like fiber-reinforced composite materials. *Plant Physiology* 127, 381-385.
- Kerstiens G.** 1996a. Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* 47: 1813-1832.
- Kerstiens G.** 1996b. Plant cuticle: an integrated functional approach, BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Kolattukudy P.E.** 1981. Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Reviews of Plant Physiology* 32:539-567.
- Kolattukudy P.E.** 2001. Polyesters in higher plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71: 1-49.
- Koske T.J., Pallas J.E. y Jones J.B.** 1980. Influence of ground bed heating and cultivar on tomato fruit cracking. *HortScience* 15: 760-762.
- Kramer P.J. y Boyer J.S.** 1995. Water Relations of Plants. Academic Press, San Diego, CA.
- Krauss S., Schnitzler W. H., Grassmann J. y Voitke M.** 2006. The influence of different electrical conductivity values in a simplified recirculating soilless system on inner and outer fruit quality characteristics of tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 441-448.
- Kutschera U. y Schopfer P.** 1986. Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleoptiles. *Planta* 167: 527-535.
- Kutschera U.** 1989. Tissue stresses in growing plant organs. *Physiologia Plantarum* 77:157-163.
- Lagrimini M.L., Vaughn J., Erb A.W. y Miller S.A.** 1993. Peroxidase overproduction in tomato :wound induced polyphenol deposition and disease resistance. *Hortscience* 28, 218-221.
- Laguna L., Casado C. G. y Heredia A.** 1999. Flavonoid biosynthesis in tomato fruit cuticles after in vivo incorporation of H-3-phenylalanine precursor. *Physiologia Plantarum* 105, 491-498.
- 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.
- Lenzian 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.
- Leonardi C., Ambrosino P., Esposito F. y Fogliano V.** 2000. Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry* 48 (10): 4723-4727.
- 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.
- Lichtenegger H., Muller M., Paris O., Riekel C. y Fratzl P.** 1999. Imaging of the helical arrangement of cellulose fibrils in wood by synchrotron X-ray microdiffraction. *Journal of Applied Crystallography* 32, 1127-1133.

- 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.
- Lolle S.J. y Pruitt R.E.** 1999. Epidermal cell interactions: a case for local talk. *Trends in Plant Science* **4**: 14-20.
- Luque P. y Heredia A.** 1994. Glassy state in plant cuticles during growth. *Zeitschrift für Naturforschung* **49c**: 273-275.
- Luque P., Bruque S. y Heredia A.** 1995a. 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.** 1995b. A study of the hydration process of isolated cuticular membranes. *New Phytologist* **129**(2): 283-288.
- 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.
- Luza J.G., van Gorsel R., Polito V.S. y Kader A.A.** 1992. Chilling injury in peaches: a cytochemical and ultrastructural cell wall study. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **117**(1): 114-118.
- 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., Pesacrete T.C. y Hasenstein K.H.** 2001. Biochemical analysis of elastic and rigid cuticles of *Cirsium horridulum*. *Planta* **213**(6): 841-848.
- Mariani C. y Wolters-Arts M.** 2000. Complex Waxes. *Plant cell* **12**: 1795-1798.
- Maroto J.V., Lopez 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.
- Matas A.J. y Heredia A.** 1999. Molecular dynamics modellization and simulation of water diffusion through plant cutin. *Zeitschrift für Naturforschung* **54**: 896-902.
- Matas A.J., Cuartero J. and Heredia A.** 2004a. Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticles. *Thermochimica Acta*, 409, 165.
- Matas A.J., Cobb E.D., Barstch J.A., Paolillo D.J. y Niklas K.J.** 2004b. Biomechanics and anatomy of *Lycopersicon esculentum* fruit peels and enzyme-treated samples. *American Journal of Botany* **91**:352-360.
- Matas A.J., Lopez-Casado G., Cuartero J. y Heredia A.** 2005. Relative humidity and temperature modify the mechanical properties of isolated tomato fruit cuticles. *American Journal of Botany* **92**, 462-468.
- Matas A.J.** 2005. Estudio de los factores incidentes en el agrietado del fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tipo cereza: el papel de la cutícula del fruto. Tesis doctoral. Universidad de Málaga.
- 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.
- Mazliak P. y Pommier-Miard J.** 1963. *Fruits* **18**: 177
- McQueen-Mason S., Durachko D.M. y Cosgrove D.J.** 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**: 1425-1433.

- 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.
- Mitchell J.P., Shennan C., Grattan S.R. y May D.M.** 1991. Tomato fruit yields and quality under water deficit and salinity. *Journal of American Society and Horticultural Science* **116**: 215-221.
- Mizrabi Y., Taleisnik E., Kagan-Zur V., Offenbach R., Matan E. y Golan R.** 1988. A saline irrigation regime for improving tomato fruit quality without reducing yield. *Journal of American Society and Horticultural Science* **113**: 202-205.
- Mizrabi, Y.** 1982. Effect of Salinity on Tomato Fruit Ripening. *Plant Physiology* **69**: 966-970.
- 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 M., Czihak C., Vogl G., Fratzl P., Schober H. y Riekel C.** 1998. Direct observation of microfibril arrangement in a single native cellulose fiber by microbeam small-angle X-ray scattering. *Macromolecules* **31**, 3953-3957.
- Munns R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* **25**: 239-250.
- 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.
- Musel G., Schindler T., Bergfeld R., Ruel K., Jacquet G., Lapierre C., Speth V. y Schopfer P.** 1997. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta* **201** (2): 146-159.
- Niklas K.J.** 1992. Plant biomechanics. University of Chicago press, Chicago, Illinois, USA.
- 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.

- Pagaldy L. y Ruiz 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.
- Passioura J.B.** 1994. The physical chemistry of the primary cell wall: implications for the control of expansion rate. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1675-1682.
- 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.K. y Spooner D.M.** 2005. New species of wild tomatoes (Solanum section Lycopersicon: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany* **30** (2): 424-434.
- Petersen K.K., Willumsen J. y Kaack K.** 1998. Composition and taste of tomatoes as affected by increased salinity and different salinity sources. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **73**: 205-215.
- Petracek P.D. y Bukovac M.J.** 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiology* **109**: 675-679.
- Plaut Z., Grava A., Yehezkel, C. y Matan E.** 2004. How do salinity and water stress affect transport of water, assimilates and ions to tomato fruits?. *Physiologia plantarum* **122**: 429-442.
- Powers W.L. y Bolle, W.B.** 1947. Control of cracking of fruit by rain. *Science* **105**: 334-335.
- Quiroga M., Guerrero C., Botella M.A., Barcelo A., Amaya I., Medina M.I., Alonso F.J., de Forchetti S.M., Tigier H. y Valpuesta V.** 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* **22** (4): 1119-1127.
- Redgwell R.J., Fischer M., Kendal E. y MacRae E.A.** 1997. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* **203**: 174-181.
- Reina-Sanchez A., Romero-Aranda R., y Cuartero J.** 2005. Plant water uptake and water use efficiency of greenhouse tomato cultivars irrigated with saline water. *Agricultural Water Management* **78**: 54-66.
- Reinders G. y Thier, H.P.** 1999. Non-starch polysaccharides of tomatoes I. Characterizing pectins and hemicelluloses. *European Food Research and Technology* **209**, 43-46.
- Reynard G.B.** 1951. Inherited resistance to radial cracks in tomato fruits. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **58**: 231-244.
- 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.
- Roberts E., Kutchan T. y Kolattukudy P.E.** 1988. Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its mRNA in suberizing potato tubers and tomato fruits. *Plant Molecular Biology* **11**, 15-26.
- Rodriguez F.** 1989. Principles of polymer systems, Hemisphere Publishing Corporation, New York.
- Roelofsen P.A.** 1959. The plant cell wall. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Romero-Aranda R., Soria T., y Cuartero J.** 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science* **160**: 265-272.

- Rose J.K.C. y Bennett A.B.** 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* **4** (5): 1360-1385.
- Rose J.K.C., Catala C., Gonzalez-Carranza Z.H. y Roberts J.A.** 2003. Cell wall disassembly. En *The Plant Cell Wall*. Annual Plant Reviews, **8**(9): 264-323.
- 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.
- Sakiyama R. y Stevens M.A.** 1976. Organic acid accumulation in attached and detached tomato fruits. *Journal of American Society and Horticultural Science* **101**: 394-496.
- Saranga Y., Zamir D., Marani A., y Rudich J.** 1993. Breeding Tomatoes for Salt Tolerance - Variations in Ion Concentrations Associated with Response to Salinity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **118**: 405-408.
- 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.
- Seymour G.B. Colquhoun I.J, Dupont M.S., Parsley K.R. y Selvendran R.R.** 1990. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry* **29**(3): 725-731.
- Simon E.W.** 1978. The symptoms of calcium deficiency in plants. *New Phytol.* **80**: 1-40.
- Sonneveld C. y Van der Burg, A.M.M.** 1991. Sodium chloride salinity in fruit vegetable crops in soil-less culture. *Netherlands J. Agr. Sci.* **39**: 115-122.
- Soria T. y Cuartero J.** 1997. Tomato fruit yield and water consumption with salty water irrigation. *Acta Horticulturae* **458**:215-219.
- 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.
- Stark R.E. y Tian S.** 2006. The cutin biopolymer matrix. En *Biology of the plant cuticle*. Annual Plant Reviews, **23**(3):126-141.
- Stevens M.A.** 1979. Tomato quality: potencial for developing cultivars with improved flavor. *Acta Horticulturae* **93**: 317-329.
- Sturcova A., Davies G. R. y Eichhorn S. J.** (2005). Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers. *Biomacromolecules* **6**, 1055-1061.
- Talbott L.D. y Ray P.M.** 1992. Molecular-size and separability of pea cell-wall polysaccharides-implications for models of primary wall structure. *Plant Physiology* **98**(1): 357-368.
- Tegelaar E.W., Kerp H., Visscher P.A. y Schenk J.W. de Leeuw** 1991. *Paleobiology* **17**: 133-144.
- 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.
- Tucker G. A. y Brady C. J.** 1987. Silver Ions Interrupt Tomato Fruit Ripening. *Journal of Plant Physiology* **127**: 165-169.
- Van de Vooren J., Welles G.W.H. y Hayman G.** 1986. Glasshouse crop production. En *The Tomato Crop* (eds) J.G. Atherton y Rudich 581-623. Chapman & Hall, New York.
- Van Ieperen W.** 1996. Effects of different day and night salinity levels on vegetative growth, yield and quality of tomato. *Journal of Horticultural Science* **71**: 99-111.
- Verbelen J. P. y Kerstens S.** 2000. Polarization confocal microscopy and Congo Red fluorescence: a simple and rapid method to determine the mean cellulose fibril orientation in plants. *Journal of Microscopy-Oxford* **198**, 101-107.
- Verbelen J. P. y Stickens D.** 1995. In-Vivo Determination of Fibril Orientation in Plant-Cell Walls with Polarization Cslm. *Journal of Microscopy-Oxford* **177**, 1-6.
- Verbelen J.P., Vissenberg K., Kerstens S. y Le J.** 2001. Cell expansion in the epidermis: microtubules, cellulose orientation and wall loosening enzymes. *Journal of Plant Physiology* **158**, 537-543.
- Verkerke W. y Schols M.** 1992. The influence of EC level and specific nutrients on the firmness, taste and yield of tomato. *Glasshouse Crops Res. Stat., Naaldwijk* **37**.
- Verkerke W., Gieleesen C.J.M. y Engelaan-Hokken L.T.** 1991. Development of fruit firmness during growth period. *Glasshouse Crops Res. Stat., Naaldwijk* **35**.
- Villena J.F., Casado C. G., Luque P. y Heredia A.** 1996. Structural characteristics of a resistant biopolymer isolated from plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* **47**, 56.
- 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.
- Villena J.F., Domínguez E., Stewart D. y Heredia A.** 1999. Characterization and biosynthesis of non-degradable biopolymers in plant cuticles. *Planta* **208**: 181-187.
- Vincent J.F.V.** 1990. Structural biomaterials. London:Princeton University Press 244.
- 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.
- Walton T.J.** 1990. Waxes, cutin and suberin. *Methods Plant Biochememistry* **4**: 105-158.
- 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.
- 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.

Yang S. F. 1985. Biosynthesis and Action of Ethylene. *Hortscience* **20**: 41-45.

Young P.A. 1947. Cuticle cracks in tomato fruits. *Phytopathology* **37**(2): 143-145.

Zhang H.Z. y Blumwald, E. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature biotechnology* **19**: 765-768.

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