

EFECTO DEL CHOQUE TÉRMICO SOBRE LA FISIOLOGÍA Y EL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS DE LA CORTEZA DE LULO (*Solanum quitoense* L.)

Edith Rubio Morales* y Patricia Restrepo Sánchez

Aprobado: Mayo 8/2000

Keywords: Fruits, browning, chilling injury, lulo, proteins, electrophoresis, PPO, heat shock.

RESUMEN

El lulo es un fruto tropical exótico, de exquisito aroma y sabor, que posee un corto período de maduración y es frágil ante tratamientos de conservación como refrigeración, choques de CO₂, fuertes choques térmicos; como principal síntoma de su deterioro se produce pardeamiento. Este pardeamiento es debido principalmente a la acción de polifenoloxidases (PFO) sobre los fenoles endógenos.

El objetivo del presente estudio es correlacionar el comportamiento fisiológico del lulo mediante la medida cromatográfica de la intensidad respiratoria con los cambios que sufren las isoformas de proteínas con actividad de PFO durante la maduración de los frutos a temperatura ambiente, en refrigeración a 4°C y sometidos a choque térmico previo a la refrigeración a 4°C y llevados a maduración complementaria.

El lulo, madurado a temperatura ambiente (18°C), presenta características de un fruto climatérico, con un máximo res-

piratorio a los 7 días de almacenamiento; esto concuerda con el comportamiento electroforético, en el que muestra que las proteínas con actividad de PFO aumentan su intensidad a medida que transcurre el proceso de maduración y aparecen nuevas isoformas en el posclimaterio. Para el fruto refrigerado a 4°C, el máximo respiratorio se pospone en 14 días, pero se produce un evidente daño por frío. La PFO muestra también un comportamiento alterado. Los frutos con choque térmico presentan un climaterio a los 21 días, con niveles normales de respiración; durante el proceso de maduración aparecen nuevas isoformas de PFO y la intensidad de las bandas es máxima en el climaterio, disminuyendo con la senescencia. Este tratamiento retarda el deterioro general del fruto, lo cual tiene una importante incidencia en la conservación y por tanto en el valor agregado de la comercialización del lulo.

ABSTRACT

Lulo is a fruit spell to develop injuries, such as browning of the peel, or physical damage in the skin. Its short period of ripening, the rapid apell of senescence and its fragility to treatments which have been

* Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

studied with the purpose of extending the fruit useful life, such as CO₂ shocks. Strong heat shocks and cold storage that produce as first signal browning, which has to be inhibited. The browning is caused mainly by the action of polyphenoloxidases (PPO) on endogenous phenols of the fruits.

This work studies the correlation between the physiological behavior of the lulo and the changes that suffers the isoforms of proteins with PPO activity during the ripening at room temperature, refrigerated material and fruit exposed to heat shock previous to refrigeration at 4°C and then taken to complementary ripening.

Normally ripened lulo, shows characteristics of climacteric fruit, with a maximum respiratory at the 7th day of storage and senescence at the 28th day. This data agrees with the electrophoretic spell, where an increase in the intensity of proteins with PPO activity is displayed. While the process of ripening takes place, and new isoforms appear in post-climacterium. In senescence the bands decrease their intensity. For the fruit refrigerated at 4°C the maximum respiratory rate is postponed in 14 days, however an abnormal increase of intensity and the deterioration of the fruit is produced. This evidence the injury due to cold storage. PPO also shows an altered behavior, because a number of intense bands appears as soon as the fruit is taken to complementary ripening. The fruits with heat shock shows a climacteric at 21 days, with normal levels of respiration. During the ripening process it appears new isoforms of PPO. The intensity of the bands is maximum at climacterium. Decreasing with senescence.

This treatment delays the general damage of the fruit which has a great impact in the preservation and hence the commercialization of lulo.

INTRODUCCIÓN

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), pertenece a la familia de las solanáceas, es una de las doce especies de la sección Lasiocarpa del género *Solanum*. Crece en regiones húmedas con rango de temperatura entre 16 a 24°C (zona cafetera), siendo la temperatura óptima 17-18°C. (1). Es una de las especies exóticas que se han estudiado dentro del Proyecto de frutas tropicales del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por poseer exquisito aroma y sabor, además de tener gran potencial para competir en los mercados internacionales. Según estudios de la Comunidad Económica Europea (hoy Unión Europea), ésta es una de las frutas andinas con mayor posibilidad de exportación hacia ese continente. Su jugo es muy apetecido, conocido en América Latina y Estados Unidos (2).

En estos estudios se ha mostrado que el fruto es uno de los más susceptibles a sufrir lesiones tales como pardeamiento de la corteza y ablandamiento de la pulpa debido a magulladuras o heridas en su piel. Su corto período de maduración y rápida aparición de la senescencia, además de su fragilidad ante los tratamientos que se han estudiado con el fin de prolongar el tiempo de vida del fruto, como choques con CO₂ (3), fuertes choques térmicos y almacenamiento en frío por debajo de 7°C que es su temperatura crítica (2), producen pérdidas debidas principalmente a que como primer síntoma -de todos los tipos de estrés y es-

pecialmente de los daños por frío— se produce pardeamiento de la corteza y de la pulpa, lo cual le hace perder calidad y disminuir su demanda por parte de los consumidores. Este pardeamiento se debe probablemente a la acción de la polifenoloxidasa sobre los monofenoles y polifenoles presentes en el fruto (4), (5), que los transforman en quinonas. Luego estas quinonas polimerizan y forman pigmentos de color café, melaninas que confieren sabor y color desagradables a los frutos, semillas y jugos (7).

Una metodología que se ha reportado para la inhibición de los daños por frío es el uso de los choques térmicos, los cuales consisten en tratamientos de calentamiento de los frutos a altas temperaturas ($20-55^{\circ}\text{C}$), durante dos minutos a 48 horas, antes de ser sometidos a la refrigeración. Por otra parte, se ha demostrado en algunos tejidos vegetales, que cambios mínimos en la temperatura celular producen cambios conformacionales en varias proteínas reguladoras, generalmente con actividad enzimática, que pueden ser suficientes para dañar el sitio activo y su funcionamiento. Además, se ha determinado que el choque térmico produce un incremento de proteínas solubles, más por la aparición de proteínas por síntesis de *novo*, que por degradación de proteínas ya presentes. Aunque el choque térmico activa la síntesis de algunas proteínas, también puede conducir a una inactivación irreversible de otras (7).

El objetivo de este estudio es conocer la variación del perfil electroforético de las proteínas con actividad de PFO, presentes en la corteza de lulo, cuando se aplica choque térmico con el fin de inhibir los daños por frío.

PARTE EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se realiza un ensayo de almacenamiento refrigerado para conocer el comportamiento de la enzima durante la lesión por frío, y un tratamiento de choque térmico con el fin de inhibirla. Adicionalmente se realiza un ensayo de almacenamiento del fruto a temperatura ambiente para estudiar un testigo madurado en condiciones de Santafé de Bogotá ($16^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $75\% \pm 4$ HR). Se colocan tres cámaras previamente sanitizadas y con frutos preseleccionados por madurez (entre 2 y 5% de color amarillo en la corteza). La muestra con choque térmico recibe un tratamiento previo a la refrigeración, aplicándole calentamiento a 27°C , por 24 horas; luego se almacena simultáneamente con el testigo refrigerado a 4°C durante 2 semanas y posteriormente se dejan a temperatura ambiente durante otras 2 semanas, con el fin de conseguir la maduración complementaria.

El seguimiento se realiza en la corteza de los frutos de cada uno de los tratamientos estudiados y durante todo el período de almacenamiento, debido a que en ella es donde primero se evidencian los síntomas de pardeamiento del fruto y porque la apariencia y el color de la corteza son las características sensoriales que determinan la decisión de compra del consumidor. Este seguimiento consiste en:

- Evaluación de la actividad metabólica de los frutos por la medida de la intensidad respiratoria (IR), por cromatografía de gases.

- Determinación de las isoformas de la PFO en la corteza de lulo, por electroforesis en condiciones nativas.

MEDIDA DE LA INTENSIDAD RESPIRATORIA

La intensidad respiratoria se realiza con el fin de determinar los cambios fisiológicos y metabólicos durante el período de almacenamiento del fruto sometido a los tres tratamientos (midiendo la respiración como CO_2 producido).

La técnica utilizada para la determinación de CO_2 producido por el fruto, es la cromatografía de gases, realizada en un equipo Hewlett Packard 5890, con columna empacada de Carbosieve S II (longitud: 3,0 m; diámetro interno: 3 mm, tamaño de partícula: 100/120), helio como gas de arrastre y detector de conductividad térmica. Las condiciones cromatográficas utilizadas son: temperatura del detector: 250°C; temperatura del inyector: 250°C; temperatura de la columna programada entre 50°C y 200°C a una velocidad de calentamiento: 32°C/min, flujo gas de arrastre: 30 ml/min, volumen de inyección 1 ml. La cuantificación se lleva a cabo mediante el uso de estándar externo (patrón certificado de AGA-FANO). El análisis se realiza cada tercer día (por duplicado), en cada una de las cámaras de almacenamiento.

La intensidad respiratoria se reporta como mg CO_2/Kg de fruta por hora.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Con el fin de estudiar si hay cambios en la actividad de la PFO durante la maduración, la lesión por frío y el tratamiento con choque térmico, se tratan las muestras de la siguiente forma: cada 7 días se toman muestras de corteza de lulo de cada cámara; se congelan en nitrógeno líquido,

y simultáneamente se cuantifica la proteína por el método microkjeldahl.

Extracción de la enzima

Las muestras congeladas se homogenizan con acetona a -20°C, se filtran, y en el filtrado se procede a extraer la proteína usando un buffer de tris-HCl 0,1 M pH 6,8 con CaCl_2 0,1 M. Luego se precipita la proteína con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%, se centrifuga a 12,000 gravedades, se dializa hasta fin de SO_4^- y Cl^- (8) y a los extractos procedentes de corteza se les determina la cantidad de proteína. Parte del extracto se liofiliza para realizar la determinación electroforética de la PFO.

Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida:

- Se realizan electroforesis en condiciones nativas, de cada uno de los extractos obtenidos, en las siguientes condiciones: equipo Bio-Rad mini protean two cell, concentración de acrilamida 10%. Cantidad de proteína aplicada: 40 µg, disuelta en buffer de muestra (Laemmli: 4 ml de agua destilada + 1 ml de buffer Tris 0,5 M, pH 6,8 + 2 ml de glicerol + 0,2 ml de azul de bromo fenol -solución al 0,05%).

- Buffer de corrida Tris-glicina pH 8,3 (solución 5X : 5g de Tris + 43,2g de glicina disueltos en 600 ml de agua).

- Voltaje de corrida 200 voltios.

Una vez realizada la corrida, el gel se sumerge en solución buffer 0,1 M de fosfatos pH 6,8 saturada con L-Dopa (sustrato elegido) y termostatada a 37°C; después de 30 minutos aparecen las bandas que poseen actividad de polifenoloxidasa (8).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Comportamiento fisiológico del lulo durante la maduración y el almacenamiento

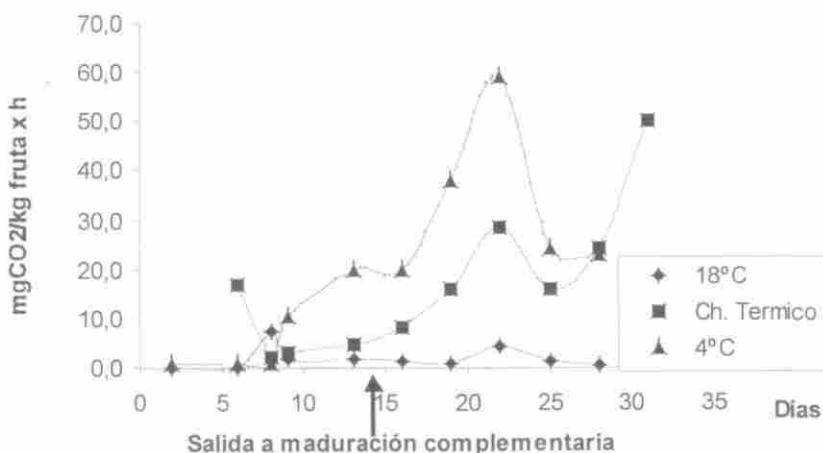
Los resultados del comportamiento fisiológico del lulo se muestran en la gráfica 1. Cuando el fruto se almacena a temperatura ambiente (18°C) la intensidad respiratoria (IR) tiene un comportamiento característico de fruto climatérico, observando el máximo respiratorio a los siete días. Luego se presenta una reducción gradual en la respiración hasta llegar a un período de estabilidad (días 10 a 20), denominado período de senescencia, que se caracteriza por el deterioro de los parámetros sensoriales del fruto y padeamiento de la pulpa. Finalmente, en el día 22 hay un aumento de la IR, que indica la presencia de alteraciones fisiológicas y

fúngicas; este aumento es indicio de que el fruto está próximo a la muerte.

En los frutos que estuvieron almacenados en refrigeración se observa que la respiración se mantiene constante y baja en su intensidad durante la primera semana. En la segunda semana de almacenamiento en refrigeración se detecta un rápido y anormal aumento de la intensidad respiratoria, lo cual es indicio del comienzo de los desórdenes metabólicos sufridos en el fruto debido a la baja temperatura.

Los frutos sometidos a choque térmico, previo a la refrigeración, muestran inicialmente un alto nivel en el índice respiratorio, debido probablemente al estrés producido por el aumento de temperatura. Una vez los frutos se adaptan a la temperatura de refrigeración (siete días), muestran un leve aumento en la respiración en el día 12, inferior al sufrido du-

Gráfica 1. Curvas de respiración de lulo.

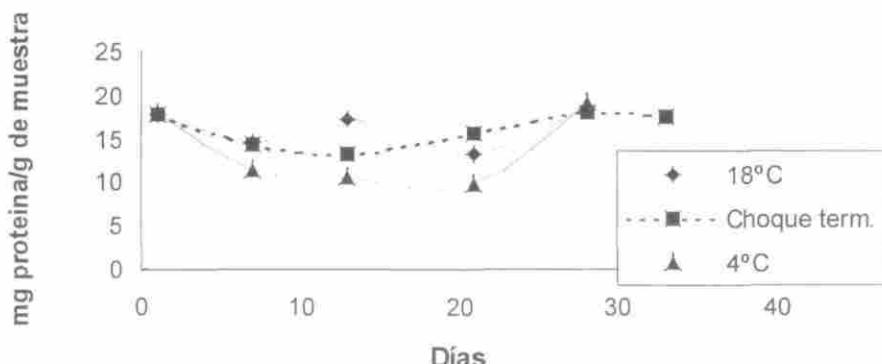


rante el mismo periodo de tiempo, por los frutos testigo, refrigerados. Al salir a la maduración complementaria se observa que el aumento en el índice de respiración a temperatura ambiente es menor que el de los frutos refrigerados (día 22), lo cual indica una disminución en las alteraciones metabólicas producidas por el frío,

Análisis del cambio proteico durante la maduración

El comportamiento del contenido proteico de los frutos, frente a los diferentes tipos de tratamiento (bajas temperaturas, choque térmico) durante el almacenamiento, se muestra en la gráfica 2.

Gráfica 2. Cambios proteicos en corteza de lulo.



que señala que este máximo corresponde al máximo climatérico de los frutos tratados con choque térmico.

Todos los resultados analizados anteriormente muestran cómo el tratamiento de choque térmico, previo a la refrigeración a 4°C, además de inhibir los daños por frío aumenta el tiempo de vida del lulo en 15 días, puesto que se presenta un máximo climatérico a los 22 días de almacenamiento.

En el testigo, a temperatura ambiente, se observa que en el posclimaterio el fruto presenta el máximo contenido de proteínas, las cuales están involucradas en todos los procesos degradativos que sufre el lulo en este estado. Desde el inicio de la senescencia el contenido de proteína en corteza disminuye, probablemente porque éstas son degradadas por acción de proteasas. Posteriormente se presenta un leve aumento debido a que se está evaluando proteína procedente de microorganismos contaminantes.

Tabla 1. Movilidad electroforética de las isoformas de PFO de la corteza de lulo, durante la maduración. Temperatura ambiente (18°C), refrigeración (4°C) y pretratamiento con choque térmico.

Carril	Testigo a temperatura ambiente (18°C)	Testigo a 4°C										Choque térmico			
		1	2	3	4	5	11	12	13	14	6	7	8	9	10
Número															
Tiempo (días)	0	7	13	21	28	7	13	21	28	7	13	21	28	33	
Movilidad elect.	0	0,36	0,37	0,37	0,37	0,35	0,35	0,35	0,35	0,36	0,35	0,35	0,35	0,35	(-)
Intensidad	(-)	(+)	(++)	(++++)	(+++++)	(+)	(++++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+++++)	(+++++)	
						0,40	0,41		0,40				0,40		
						(+)	(++)		(++++)				(+++)		
								0,46		0,45			0,45		
								(+)		(+)			(+)		
Nº de bandas	0	1	1	2	3	1	3	1	1	1	1	3	1	0	

Intensidad de bandas: (-): no se detecta; (+): débil o mínima; (++) apreciable; (+++): intensa; (++++): muy intensa; (+++++) intensidad máxima detectada.

Cuando se analiza el comportamiento del fruto almacenado a 4°C, se observa que el contenido de proteína en corteza disminuye al ser refrigerado, pero una vez pasado el climaterio, aumenta. Esto podría ser originado por la descompartimentalización, fenómeno causado por el rompimiento de las membranas celulares y la lamela media, debido a las disrupciones metabólicas producidas por el frío o a que, como reporta Kadyrzhanova (10), un mecanismo de defensa de las plantas superiores es aumentar la concentración de proteínas solubles por síntesis *de novo*, la cual es menor que la degradación de éstas por efecto de las bajas temperaturas. Lo anterior es corroborado por el aumento anormal en la tasa respiratoria, haciéndose evidentes los daños metabólicos sufridos en el fruto.

Lo anterior permite afirmar que el máximo respiratorio no coincide con el máximo climatérico, sino que es un máximo anormal de actividad metabólica producido por la descompartimentalización de los componentes celulares cuya consecuencia es un acelerado deterioro de los frutos.

Al analizar el comportamiento proteico en los frutos sometidos a choque térmico, puede decirse que en la corteza el contenido de proteína disminuye, con relación al fruto madurado a temperatura ambiente, causado por la suma de los efectos térmicos. Una vez que los frutos son llevados a maduración complementaria a temperatura ambiente, los niveles de proteína aumentan levemente mostrando una estabilización en el metabolismo hasta cuando se alcanza el máximo climatérico donde el contenido proteico es máxi-

mo, dado los requerimientos biológicos y enzimáticos propios de este estado.

Cambio de la PFO en lulo durante la maduración a temperatura ambiente, de material refrigerado y del sometido a choque térmico, previo a la refrigeración.

RESULTADOS ELECTROFORÉTICOS

Temperatura ambiente (18°C)

En la tabla 1 se indican los cambios, en intensidad y número, de las isoformas de PFO extraídas de la corteza del lulo, durante la maduración a los 0, 7, 13, 21 y 28 días de almacenamiento del fruto, sometido a los diferentes tratamientos de conservación.

Estos resultados muestran cómo, a medida que transcurre el tiempo de maduración, la intensidad de la banda, con movilidad electroforética 0,36 aumenta hasta llegar a un máximo el día 28, coincidiendo con la senescencia del fruto; a los 21 días aparece una nueva isoforma con movilidad 0,40 y a los 28 días una tercera, con movilidad 0,46, intensas; la aparición de estas dos nuevas isoformas en el periodo de senescencia puede deberse a que la degradación de las membranas celulares y de las sustancias pécticas de la corteza del fruto permiten la solubilización de estas dos isoformas, que durante el estado verde y maduro podrían estar ligadas a las membranas celulares y/u otros organelos del fruto, y que sólo comenzaron a solubilizarse una vez se inició la senescencia y la lisis celular, a los 21 días de almacenamiento.

Refrigeración (4°C)

Al observar los resultados electroforéticos en la segunda parte de la tabla, en donde aparecen las bandas de las isoformas extraídas de la corteza del lulo refrigerado a 4°C, se tiene que el mayor número de bandas y de mayor intensidad se obtiene a los 13 días de almacenamiento, lo que coincide con los resultados de IR, donde se presenta un primer máximo a los 13 días. Una vez se produce el posclimaterio, el número de bandas y su intensidad disminuyen, siendo mínimas en la senescencia (día 28).

El tratamiento refrigerado no altera el tipo de isoformas presentes en la corteza del fruto, pues en éste se presentan las mismas bandas mostradas por el testigo a 18°C, con movilidades electroforéticas de 0,35, 0,40 y 0,45; sólo varían su tiempo de aparición y su intensidad. Estas últimas variaciones pueden deberse a que la mayoría de las propiedades funcionales y estructurales de las proteínas son sensibles a los cambios de temperatura; esta sensibilidad térmica puede ser atribuida al cambio producido en los enlaces mantenidos entre la proteína y su medio ambiente, y que por tanto pueden alterar: su estructura secundaria y terciaria, la interacción entre la enzima y sus sustratos, sus cofactores y/o sus grupos prostéticos, las interacción proteínas-lípidos, la formación de oligómeros, las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas, etc., y, a nivel de membrana, las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína pueden ser alteradas también y producir disfunción dando lugar al encuentro de las enzimas con sus sustratos, lo que sucede particularmente en forma temprana en la PFO en la corteza de lulo sometido a refrigeración.

ción y haciendo, por tanto, que el síntoma más claro y que produce mayores pérdidas en el fruto sea la generación de pardeamiento. Estos argumentos coinciden con los reportados por Yong (11), quien afirma que "las enzimas son inhibidas reversiblemente por el frío debido a la alteración de sus enlaces hidrofóbicos".

La pérdida del número de isoformas en el posclimaterio (día 21) y la senescencia se deben muy probablemente a que las proteasas ejercen su acción de deterioro y degradan las isoformas con actividad de PFO, desapareciendo las bandas más livianas de movilidad 0,40 y 0,45.

Choque térmico

Los resultados de la electroforesis, en condiciones nativas, de los extractos de PFO de la corteza de lulo pretratado con choque térmico, se muestran en la tabla 1 para los días de almacenamiento 7, 13, 21, 28 y 33, respectivamente. Se observa cómo mientras el fruto se encontraba en los estados verde y preclimatérico sólo aparece una isoforma de movilidad 0,36, igual a la que aparece durante estos mismos períodos en los dos testigos, y el día 21 -coincidente con el máximo climatérico- (gráfica 1) aparecen tres bandas con movilidades de 0,35, 0,40 y 0,45 de mayor intensidad que las que aparecen en la senescencia (día 28) y en el día 13 de almacenamiento del testigo refrigerado (donde se evidencia el mayor daño por frío). El resultado anterior se debe probablemente a que la enzima se descompartimentaliza en forma tardía, porque el choque térmico previo a la refrigeración produce estabilización de los diferentes tipos de interacciones y enlaces de los lí-

pidos y las proteínas, impidiendo de esta forma la lisis de membranas celulares y subcelulares producidas por los daños a bajas temperaturas o por la senescencia, retardando el deterioro general y en particular el pardeamiento en el fruto en 14 días, con respecto al testigo madurado en condiciones normales.

CONCLUSIONES

El desarrollo y aplicación del método de la medida de la movilidad electroforética de las bandas con actividad de PFO en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas y en presencia de L-Dopa muestran en este trabajo que es una técnica semicuantitativa económica, rápida y efectiva para conocer el comportamiento de las isoformas solubles de la enzima.

El lulo refrigerado a 4°C muestra evidentes daños por frío, mientras que el fruto sometido a choque térmico (27°C-24 h), previo a la refrigeración a la misma temperatura, prolonga su vida útil en 14 días cuando es comparado con el madurado a temperatura ambiente.

El choque térmico, a 27°C durante 24 horas, previo a la refrigeración y a la maduración complementaria, produce disminución en la actividad de las isoformas con actividad de la PFO en el lulo, en corteza, cuando se compara con frutos refrigerados a la misma temperatura. Este tratamiento permite disminuir el pardeamiento en el 100% y prolongar el tiempo de vida del fruto en un mínimo de 14 días.

BIBLIOGRAFÍA

1. Camargo, C. y Romero, V. (1988). Contribución al estudio de maduración post-cosecha del lulo. Trabajo de grado. Santafé de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
2. Valvuena, N. y Castro, S. (1993). El estudio del comportamiento del lulo (*Solanum quitoense* L.) a bajas temperaturas y la influencia de choque térmico sobre los daños por frío. Trabajo de grado. Santafé de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
3. Tolosa, C. y Piña, L. H. (1994). Estudio del comportamiento del lulo a bajas temperaturas y la influencia del CO₂ sobre daños por frío en el fruto. Trabajo de grado. Santafé de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química.
4. Ibáñez, D. y Cortés, H. (1990). Estudio preliminar de la influencia de bajas temperaturas sobre algunas características del lulo. Trabajo de grado. Santafé de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
5. Noy, O. y Pérez G. (1994). Estudio del efecto conjunto de choques de CO₂ y un absorbedor de etileno sobre los daños por frío en el lulo. Trabajo de grado. Santafé de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
6. Barman, T. (1991). Enzymes Handbook. Vol. I. Springer-Verlag. 2nd. ed. New York, pp. 217-225.

7. Robinson, D. S., Eskin, N. A. M. Editores. (1991). *Oxidative enzymes in foods*. Departament of Foods and Nutrition, Faculty of Human Ecology. University of Manitoba. Winnipeg. Canadá. R3T. 2N2, pp. 217-225.
8. Rubio, E. (1999). Estudio del cambio de actividad de Polifenoloxidasa, PFO, durante el proceso de maduración del lulo (*Solanum quitoense L.*). Tesis de Maestría en Química, San-tafé de Bogotá, Universidad Nacio-nal de Colombia.
9. Domínguez, E., Vendrell, M. y Lu-devid, D. (1992). Differential protein accumulation in banana fruit during ripening, *Plant Phisiology*, pp. 157-162.
10. Kadyrzhanova, D. K., Vlachonos-sios, K. E., Ververidis, P. y Dilley, D. R. (1998). Molecular cloning of a novel heat induced chilling tolerance related c-DNA in tomato fruit by use of m-RNA differential display. *Plant Molecular Biology*. 36, 6.
11. Chien Yi Yong. (1990). *Chilling injury of crops*, CRC press: Bocatón, Fl.