

# Effect of preharvest calcium spraying on ripening and chilling injury in 'Hass' (*Persea americana* Mill.) avocado

El calcio asperjado en precosecha en la maduración y daño por frío en aguacate 'Hass' (*Persea americana* Mill.)

Alejandro F. Barrientos-Priego<sup>1</sup>; María Teresa Martínez-Damián<sup>1\*</sup>; Haidel Vargas-Madríz<sup>1</sup>; Martha Olivia Lázaro-Dzul<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia, Posgrado de Horticultura. Carretera México- Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

teremd13@gmail.com, tel.: (595) 101 95 86 (\*Corresponding author)

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Posgrado en Fitosanidad, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

## Abstract

Exporting avocado involves a number of postharvest problems because the fruit has a limited shelf life and marked sensitivity to development of chilling injury when using low temperatures to prolong its useful life. There are measures to alleviate the problem, such as infiltration of calcium ions; therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of preharvest spraying of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , at 0.3 and 0.5 %, on the postharvest physiology of cv. Hass fruits stored at 5 °C and room temperature for five weeks. The sprayings were performed in the aerial part every six weeks until harvest, totaling six applications. The variables evaluated were: ethylene production, respiration rate, calcium concentration in the exocarp and mesocarp, firmness, polyphenol oxidase activity, weight loss and chilling injury. It was found that  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , at 0.3 and 0.5 %, decreased the respiratory rate and ethylene production during storage at room temperature and under chilling conditions. An Increase in the calcium concentration in the exocarp (0.085 %) was observed when 0.5 %  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  was sprayed, as compared to the control (0.08 %). In the mesocarp, concentrations of 0.081 % were reached by spraying  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  at 0.3 % and 0.084 % with calcium at 0.5 %, values higher than those of the control (0.078 %). In general, the  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sprayings decreased weight loss, polyphenol oxidase activity and chilling injury.

**Keywords:** *Persea americana* Mill.,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , postharvest, chilling, quality.

## Resumen

La exportación de aguacate implica una serie de problemas postcosecha debido a que el fruto tiene vida de anaquel limitada, así como marcada sensibilidad al desarrollo de daños por frío al usar temperaturas bajas para prolongar su vida útil. Existen coadyuvantes que permiten aminorar el problema, como la infiltración de iones de calcio; por ello, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar aspersiones precosecha de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  a 0.3 y 0.5 % en la fisiología postcosecha de frutos del cv. Hass almacenados en 5 °C y temperatura ambiente por cinco semanas. Las aspersiones se realizaron en la parte aérea cada seis semanas hasta la cosecha, sumando seis aplicaciones. Las variables evaluadas fueron: producción de etileno, tasa de respiración, concentración de calcio en exocarpio y mesocarpio, firmeza, actividad de polifenoloxidasas, pérdidas de peso y daños por frío. Se encontró que el  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , a 0.3 y 0.5 %, disminuyó la tasa respiratoria, así como la producción de etileno durante el almacenamiento a temperatura ambiente y en frío. Se observó incremento de la concentración de calcio en el exocarpio (0.085 %) cuando se asperjó 0.5 % de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , en comparación del testigo (0.08 %). En mesocarpio se alcanzaron concentraciones de 0.081 % al asperjar  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  al 0.3 % y 0.084 % con calcio al 0.5 %; valores superiores al testigo (0.078 %). En general, las aspersiones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  disminuyeron la pérdida de peso, la actividad de la polifenoloxidasas y el daño por frío.

**Palabras clave:** *Persea americana* Mill.,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , postcosecha, refrigeración, calidad.



## Introduction

Mexican avocado is of great importance for the international market as evidenced by the fact that exports are increasing each year. For the period 2013-2014, 557,719 t from a total production of 1'467,837 t were exported (Flores, 2014); however, exporting involves a number of postharvest problems because the fruit has a limited shelf life. Therefore, it is necessary to extend the storage period for exports by using techniques such as chilling, but never below 0 °C, taking into account storage conditions that do not cause chilling injury and that also preserve its qualities as fresh fruit for prolonged periods (Osuna-García & Beltrán, 2003; Solís-Fraire et al., 1998).

In particular, fruits of tropical or subtropical origin suffer chilling injury even at temperatures well above the freezing point (Cerdas-Araya, Montero-Calderón, & Díaz-Cordero, 2006; Hofman, Vuthapanich, Whiley, Klieber, & Simos, 2002; Lyons, Raison, & Graham, 1979; McKersie & Leshem, 1994). Currently, chilling is the main method used for the preservation and transport of fresh fruit and vegetables (Kader, 2002). In avocado the main constraint on using chilling is the appearance of chilling injury (Cerdas-Araya et al., 2006; Hofman et al., 2002; López-López & Cajuste-Bontemps, 1999; Pesis, Ampunpong, Shusiri, & Hewett, 1994; Salveit & Morris, 1990).

The most widely accepted hypothesis to explain chilling injury was developed by Ferguson, Volz, and Woolf (1999), Lyons (1973) and Whiley (1990), who suggest the existence of irreversible changes in the physical properties of the membrane as a primary response to low temperature; this change occurs at a characteristic temperature for each species or plant tissue defined. Consequently, physiological, metabolic and biochemical dysfunction occurs causing changes in the activities of membrane-associated enzymes and membrane permeability, reduced ATP levels and ion output, loss of compartmentalization and lack of metabolic balance (Parkin, Marangoni, Jackman, Yada, & Stanley, 1989). For their part, Penter, Snijder, Stassen, and Schafer (2000), Raison and Orr (1990) and Thompson (2010) mentioned that other primary events that cause chilling injury are: increased calcium in the cytosol, a decrease in the rate of cyclosis, changes in the cytoskeletal structure and conformational change in some key regulatory proteins (enzymes).

It has been stated that the effects of chilling injury in avocado fruits are at membrane level as a result of prolonged exposure to chilling temperature. This may cause physico-chemical changes in membranes resulting in decompartmentalization and leading to enzyme-substrate (polyphenol oxidase-phenols) contact, which promote darkening reactions (Espinosa-

## Introducción

El aguacate mexicano es de gran importancia para el mercado internacional, ya que las exportaciones se están incrementando cada año. Para el periodo 2013-2014 se exportaron 557,719 t de una producción de 1'467,837 t (Flores, 2014); sin embargo, la exportación implica una serie de problemas poscosecha debido a que el fruto tiene vida de anaquel limitada. Por lo tanto, es necesario prolongar el periodo de almacenamiento para su exportación mediante el uso de técnicas como la refrigeración, pero nunca inferior a 0 °C; lo anterior considerando las condiciones de almacenamiento que no causen daño por frío, así como la conservación de sus cualidades como fruta fresca por periodos prolongados (Osuna-García & Beltrán, 2003; Solís-Fraire et al., 1998).

Particularmente, los frutos de origen tropical o subtropical sufren daños por frío, aún a temperaturas muy por arriba del punto de congelación (Cerdas-Araya, Montero-Calderón, & Díaz-Cordero, 2006; Hofman, Vuthapanich, Whiley, Klieber, & Simos, 2002; Lyons, Raison, & Graham, 1979; McKersie & Leshem, 1994). Actualmente, la refrigeración constituye el principal método empleado para la conservación y transporte de productos hortofrutícolas en estado fresco (Kader, 2002). En aguacate la principal limitante para aplicar refrigeración es la aparición de daños por frío o *chilling injury* (Cerdas-Araya et al., 2006; Hofman et al., 2002; López-López & Cajuste-Bontemps, 1999; Pesis, Ampunpong, Shusiri, & Hewett, 1994; Salveit & Morris, 1990).

La hipótesis más aceptada para explicar los daños por frío fue originada por Ferguson, Volz, y Woolf (1999), Lyons (1973) y Whiley (1990), quienes plantean la existencia de cambios irreversibles en las propiedades físicas de la membrana como respuesta primaria a la temperatura baja; este cambio ocurre a una temperatura característica para cada especie o tejido vegetal definido. Como consecuencia se presenta disfunción fisiológica, metabólica y bioquímica originando cambios en actividades de enzimas asociadas a membranas, permeabilidad de membranas, reducción en los niveles de ATP, salida de iones, pérdida de compartimentación y falta de balance metabólico (Parkin, Marangoni, Jackman, Yada, & Stanley, 1989). Por su parte, Penter, Snijder, Stassen, y Schafer (2000), Raison y Orr (1990) y Thompson (2010) mencionaron que otros eventos primarios que causan daño por frío son: incremento de calcio en el citosol, disminución en la velocidad de ciclosis, alteración en la estructura citoesquelética y cambio de conformación en algunas proteínas (enzimas) reguladoras clave.

Se ha señalado que los efectos del daño por frío en frutos de aguacate son a nivel de membrana, como consecuencia de una exposición prolongada

Cruz, Valle-Guadarrama, Ybarra-Moncada, & Martínez-Damián, 2014; Marques, Fleuriet, & Macheix, 1995; Whiley, 1990), with the main symptom in avocado fruits being the black spot on the skin and pulp (Espinosa-Cruz et al., 2014; McCollum & McDonald, 1991; Penter et al., 2000).

It has been found that maintaining adequate calcium levels in the fruit influences the transfer of extracellular signals within intracellular biochemical reactions; this helps to maintain the integrity of the membrane and the structure and function of the cell wall (Ferguson, 1984; Ferguson, Volz, Harker, Watkins, & Brookfield, 1995; Penter et al., 2000; Thompson, 2010; Whiley, 1990). Calcium concentrations in the fluid-free spaces may slow fruit ripening causing localized deficiencies, resulting in a lower respiration rate, ethylene production and softening rate of the fruits. Penter et al. (2000), Swarts (1984), Thompson (2010) and Whiley (1990) report that the deficiency of this element causes postharvest disorders in avocado; however, it has been found that an adequate calcium level helps maintain separation between the polyphenol oxidase enzyme and the phenolic substrate located in the vacuole of the avocado mesocarp (Bower & Cutting, 1988; Hofman et al., 2002).

There are some methods to increase calcium levels in both preharvest and postharvest; therefore, the aim of this research was to evaluate the effect of preharvest  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  sprayings on postharvest physiology of 'Hass' avocado fruits stored at 5 °C and room temperature.

## Materials and methods

Hass avocado fruits harvested from an orchard located in Coatepec Harinas, State of Mexico, owned by the Fundación Salvador Sánchez Colín- CICTAMEX, S.C., were used in this experiment. The orchard is located between coordinates 99° 46' 38" WL and 18° 46' 38" NL, at 2,240 masl. The climate is C(w)w, temperate subhumid with summer rains, and a mean annual temperature and rainfall of 16 °C and 1,100 mm respectively (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2009; Solís-Fraire et al., 1998).

Foliar sprayings of calcium nitrate at 0, 0.3 and 0.5 % (w:v), with Atlox (0.5 mL·L<sup>-1</sup>) added to them as adherent, were applied to six 5-year-old trees per treatment, each tree being an experimental unit. Treatments were applied to drip point with a high-pressure sprayer, using 5 L per tree. A completely randomized design was used in the field, with the experimental unit being a tree. Spraying began on May 4, 2001, when the fruit measured from 2 to 3 cm; spraying was subsequently performed every six weeks until December (six applications).

en temperatura de refrigeración. Lo anterior puede provocar modificaciones físico-químicas de membranas causando descompartmentalización y conduciendo al contacto enzima-sustrato (polifenoloxidasas-fenoles), que promueven reacciones de oscurecimiento (Espinosa-Cruz, Valle-Guadarrama, Ybarra-Moncada, & Martínez-Damián, 2014; Marques, Fleuriet, & Macheix, 1995; Whiley, 1990), siendo el principal síntoma en frutos de aguacate la mancha negra en la cáscara y la pulpa (Espinosa-Cruz et al., 2014; McCollum & McDonald, 1991; Penter et al., 2000).

Se ha observado que mantener niveles adecuados de calcio en el fruto influye en la transferencia de señales extracelulares dentro de reacciones bioquímicas intracelulares; esto ayuda a mantener la integridad de la membrana y la estructura y función de la pared celular (Ferguson, 1984; Ferguson, Volz, Harker, Watkins, & Brookfield, 1995; Penter et al., 2000; Thompson, 2010; Whiley, 1990). Las concentraciones de calcio en los espacios libres de fluido pueden declinar la maduración del fruto provocando deficiencias localizadas, lo que repercute en menor tasa de respiración, producción de etileno y velocidad de ablandamiento de los frutos. Penter et al. (2000), Swarts (1984), Thompson (2010) y Whiley (1990) reportan que la deficiencia de este elemento ocasiona desórdenes postcosecha en aguacate; sin embargo, se ha encontrado que un nivel adecuado de calcio ayuda a mantener la separación entre la enzima polifenoloxidasa y el sustrato fenólico localizado en la vacuola del mesocarpio de aguacate (Bower & Cutting, 1988; Hofman et al., 2002).

Existen algunos métodos para incrementar las concentraciones de calcio tanto en precosecha como en postcosecha; por ello, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de aspersiones precosecha de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en la fisiología postcosecha de frutos de aguacate 'Hass' almacenados en 5 °C y temperatura ambiente.

## Materiales y métodos

Los frutos utilizados para esta investigación fueron del cv. Hass, obtenidos de una huerta ubicada en Coatepec Harinas, Edo. de México, perteneciente a la Fundación Salvador Sánchez Colín- CICTAMEX, S.C. Dicha huerta se localiza entre las coordenadas 99° 46' 38" de latitud oeste y 18° 46' 38" latitud norte, a 2,240 msnm. El clima es C(w)w, templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 16 °C y precipitación media de 1,100 mm anuales (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2009; Solís-Fraire et al., 1998).

Se realizaron aspersiones foliares de nitrato de calcio a 0, 0.3 y 0.5 % (p:v), adicionándoles Atlox (0.5 mL·L<sup>-1</sup>) como adherente, por tratamiento a seis árboles de 5 años de

On February 22, 2002, the fruits were harvested and then transferred to the laboratory. The fruits collected from the six trees per treatment were grouped together and stored at room temperature (22 °C) and 65 % relative humidity, and at 5 °C and 85 % RH, for five weeks. Fruits stored at room temperature were evaluated for 10 days in some variables and in others at 0, 3, 6 and 9 days. In the case of the fruits subjected to chilling (5 °C), evaluations were conducted at three and five weeks. After each preservation period the fruits were exposed to room temperature (22 °C) to evaluate the ripening process at 0, 2 and 4 days.

Ethylene and CO<sub>2</sub> were quantified by gas chromatography using the static method. Three fruits per replicate were placed in an airtight container of known volume for an hour; subsequently 7 mL of headspace were taken with a hypodermic syringe and placed in a 7-mL vacutainer (vacuum); as the control, vacutainers without a sample were used. Then 1 mL of vacutainer space was taken and injected into a Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph, equipped with a PLOT fused-silica packed column with a PoraPLOT Q stationary phase (27.5 cm in length, 0.32 mm in internal diameter, 0.45 mm in external diameter and 10 µm in particle thickness), fitted with a flame ionization detector (FID) and a thermal conductivity one. The temperature of the oven, injector and detector was 80, 150 and 150 °C, respectively. As reference pattern, 10 mg·L<sup>-1</sup> ethylene (INFRA) and 500 mg·L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> (INFRA) were injected. The carrier gas in the chromatograph was helium with a flow of 32.3 mL·min<sup>-1</sup>. The concentration of each component was expressed in mg·L<sup>-1</sup>.

For calcium determination, exocarp and mesocarp were taken from the middle part of the fruit. The samples were dried in a forced-air oven for 72 h at 70 °C, then ground. Next, 0.5 g of dry sample were placed in a 30-mL micro Kjeldahl flask to which 10 mL of absolute nitric acid, 2 mL of absolute perchloric acid and 1 mL of absolute sulfuric acid were added, after which digestion was performed for 5 h at 450 °C. Ten mL of distilled water were added to the sample obtained from the digestion; it was filtered and filled to 50 mL. The extract obtained was placed in jars, from which 1 mL was taken, to which 1 mL of lanthanum oxide plus 8 mL of distilled water were added (Chapman & Pratt, 1979). The calcium evaluation was carried out by atomic absorption spectrophotometry on a Varian SpectrAA 220 FS spectrophotometer, using a Westinghouse WL 22610A hollow cathode tube lamp. The equipment operated at 1,500 °C (flame), and an air-acetylene mixture was used for combustion. The result was expressed as a percentage.

Firmness was evaluated in the equatorial part, for which part of the fruit skin was removed, with a Compact Gauge (Cole Palmer) digital penetrometer mounted on

edad, siendo cada árbol una unidad experimental. Los tratamientos se aplicaron a punto de goteo con un aspersor de alta presión, utilizando 5 L por árbol. En campo se empleó un diseño completamente al azar, siendo la unidad experimental un árbol. Las aspersiones iniciaron el 4 de mayo de 2001, cuando el fruto medía de 2 a 3 cm, realizando estas cada seis semanas hasta diciembre (seis aplicaciones).

El 22 de febrero de 2002 se realizó la cosecha y los frutos se trasladaron al laboratorio. Los frutos de los seis árboles por tratamiento se unieron y almacenaron a temperatura ambiente (22 °C) y 65 % de humedad relativa, y en 5 °C y 85 % de humedad relativa, por cinco semanas. Los frutos almacenados en temperatura ambiente se evaluaron durante 10 días en algunas variables y en otras a los 0, 3, 6 y 9 días. Para el caso de los frutos en refrigeración (5 °C), se realizaron evaluaciones a las tres y cinco semanas. Después de cada periodo de conservación los frutos se expusieron a temperatura ambiente (22 °C) para evaluar el proceso de maduración a los 0, 2 y 4 días.

El etileno y CO<sub>2</sub> se cuantificaron por cromatografía de gases con el método estático. En un recipiente hermético de volumen conocido se colocaron tres frutos por repetición durante una hora; posteriormente se tomaron 7 mL del espacio de cabeza con una jeringa hipodérmica y se colocaron en un vacutainer de 7 mL (al vacío), como blanco se utilizaron vacutainers sin muestra. Se tomó 1 mL del espacio del vacutainer y se inyectó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Serie II, equipado con columna empacada de sílica fundida (Plot) y fase estacionaria Poraplot Q de 27.5 cm de largo, 0.32 mm de diámetro interno, 0.45 mm de diámetro externo y 10 µm de grosor de la partícula, provisto de un detector de ionización de flama (FID) y otro de conductividad térmica. La temperatura del horno, inyector y detector fue de 80, 150 y 150 °C, respectivamente. Como patrón de referencia se inyectaron etileno (INFRA) 10 mg·L<sup>-1</sup> y CO<sub>2</sub> (INFRA) 500 mg·L<sup>-1</sup>. En el cromatógrafo el gas de arrastre fue helio con flujo de 32.3 mL·min<sup>-1</sup>. La concentración de cada componente se expresó en mg·L<sup>-1</sup>.

Para la determinación del calcio se tomó exocarpio y mesocarpio de la parte media del fruto. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado durante 72 h a 70 °C, posteriormente se molieron. En un matraz microkjeldahl de 30 mL se colocaron 0.5 g de muestra seca y se le adicionaron 10 mL de ácido nítrico absoluto, 2 mL de ácido perclórico absoluto y 1 mL de ácido sulfúrico absoluto, enseguida se efectuó una digestión durante 5 h a 450 °C. A la muestra que se obtuvo de la digestión se le adicionaron 10 mL de agua destilada, se filtró y aforó a 50 mL. El extracto obtenido se colocó en frascos, de ahí se tomó 1 mL y se le adicionó 1 mL de óxido de lantano más 8 mL de agua destilada (Chapman & Pratt, 1979). La evaluación del calcio se realizó por espectrofotometría



a hand press, recording the maximum force exerted in Newtons (N), which was reached during penetration of the strut in the fruit. The daily cumulative weight loss percentage was determined by the difference between the initial and final weight during the time of the experiment.

Polyphenol oxidase (PPO) activity was determined using the method described by Lamikanra (1995) from a 1-g sample frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , which was triturated in a frozen mortar, to which 5 mL of 100 mM Tris-HCl buffer at pH 7.1 with 1 % (w:v) polyvinyl pyrrolidone (PVP) were added. The extract was filtered in cheesecloth and then centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 minutes. The supernatant was used to determine PPO activity. The reaction consisted of dissolving 1 mL of 60 mM catechol in 100 mM Tris-HCl buffer at pH 7.1 plus 10  $\mu\text{L}$  of the supernatant. The absorbance change in 1 minute was determined in a Perkin Elmer LAMBDA 2 UV-VIS spectrophotometer. A unit of PPO activity was expressed as a one-unit change in absorbance per minute at 420 nm.

Chilling injury was determined using the method described by Chaplin, Wills and Graham (1982). From a representative portion of the mesocarp pulp, a paste was formed using a mortar; then 1 g of the paste was taken and placed in a test tube, to which 2 mL of absolute methanol, 2 mL of distilled water and 1.72 mL of chloroform were added. The mixture was homogenized and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 20 minutes. The upper layer (organic phase) contained the oxidized phenolic compounds. Color changes during the organic phase were evaluated by measuring absorbance at 340 nm.

The analysis of the variables was performed by means of an analysis of variance using a completely randomized experimental design with Tukey's range test ( $P \leq 0.05$ ), per evaluation day and among treatments, where the analysis of the fruits subjected to chilling and the environment were separated.

## Results and discussion

### Ethylene production

Both the control fruits and those treated with calcium stored at  $20^{\circ}\text{C}$  had an increase in ethylene production (Figure 1A), peaking on the sixth day of evaluation, with the control having the highest production ( $295.59 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). This could be because calcium is an ion involved in various physiological processes in fruits; it maintains membrane structure, delays senescence, maintains cell compartmentalization, inhibits respiration and regulates ethylene production (Cline & Hanson, 1992; Ferguson et al., 1995; Hofman et al., 2002; Saucedo-Hernández, Martínez-Damián, Colinas-León, Barrientos-Priego, & Aguilar-Melchor, 2005).

de absorción atómica en un espectrofotómetro Varian modelo SpectrAA 220 FS, utilizando una lámpara de cátodo hueco marca Westinghouse tipo WL 22610 A. El equipo funcionó a  $1,500^{\circ}\text{C}$  (flama), y la mezcla para la combustión fue acetileno-aire. El resultado se expresó en porcentaje.

La firmeza se evaluó en la parte ecuatorial, para lo cual se eliminó parte de la cáscara del fruto, con un penetrómetro digital Compact Gauge (Cole Palmer) montado en una prensa manual, registrándose la fuerza máxima, ejercida en newtons (N), que se alcanzó durante la penetración del puntal en el fruto. El porcentaje de pérdida de peso acumulado diario se determinó mediante la diferencia del peso inicial y final durante el tiempo del experimento.

La actividad de la polifenoloxidasas (PPO) se obtuvo mediante la metodología descrita por Lamikanra (1995) a partir de 1 g de muestra congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , la cual se trituró en un mortero congelado y se le añadieron 5 mL de buffer Tris-HCl 100 mM a pH 7.1 con 1 % (p:v) de polivinil pirrolidona (PVP). El extracto se filtró en manta de cielo, y posteriormente se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 10 minutos. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de la PPO. La reacción consistió en disolver 1 mL de catecol 60 mM en buffer Tris-HCl 100 mM a pH 7.1 más 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante. Se determinó el cambio de absorbancia en 1 minuto en un espectrofotómetro UV-VIS modelo Perkin Elmer LAMBDA 2. Una unidad de la actividad de la enzima se presentó como un cambio de una unidad de absorbancia por minuto a 420 nm.

El daño por frío se determinó con el método de Chaplin, Wills, y Graham (1982). A partir de una porción representativa de la pulpa del mesocarpio, con ayuda de un mortero se formó una pasta, se tomó 1 g y se colocó en un tubo de ensayo; a esto se le adicionaron 2 mL de metanol absoluto, 2 mL de agua destilada y 1.72 mL de cloroformo. La mezcla se homogenizó y se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 20 minutos. La capa superior (fase orgánica) contenía los compuestos fenólicos oxidados. Los cambios de color de la fase orgánica se evaluaron midiendo la absorbancia a 340 nm.

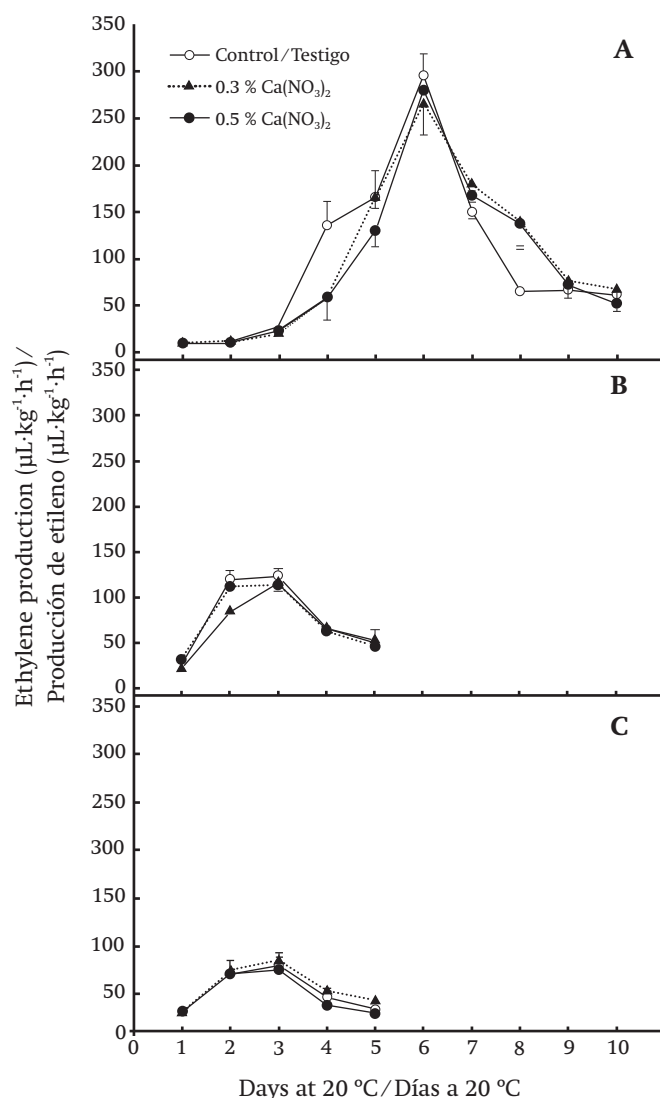
El análisis de las variables se realizó mediante un análisis de varianza utilizando un diseño experimental completamente al azar con comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), por día de evaluación y entre tratamientos, donde se separaron los análisis de los frutos sometidos a refrigeración y al ambiente.

## Resultados y discusión

### Producción de etileno

Tanto los frutos testigo como los tratados con calcio almacenados a  $20^{\circ}\text{C}$  presentaron un aumento en

In the fruits stored for three weeks, only on the second day of exposure to room temperature did those which received 0.3 and 0.5 % calcium nitrate sprayings show a lower value than the control (Figure 1B). In this regard, Tingwa and Young (1974) and Saucedo-Hernández et



**Figure 1.** Ethylene production of 'Hass' avocado fruits treated with six preharvest calcium nitrate sprayings every six weeks, stored at room temperature (A), chilled at 5 °C for three (B) and five weeks (C). After chilling, fruits ripened at 20 °C. Each point represents the mean of three observations  $\pm$  standard error.

**Figura 1.** Producción de etileno de frutos de aguacate 'Hass' tratados con seis aspersiones pre cosecha de nitrato de calcio cada seis semanas, almacenados en temperatura ambiente (A), en refrigeración a 5 °C por tres (B) y cinco semanas (C). Después de refrigeración, los frutos se maduraron a 20 °C. Cada punto representa la media de tres observaciones  $\pm$  error estándar.

la producción de etileno (Figura 1A), alcanzando su máximo al sexto día de evaluación, siendo el testigo el de mayor producción ( $295.59 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Lo anterior pudo ser debido a que el calcio es un ion que se relaciona con diversos procesos fisiológicos en los frutos, mantiene la estructura de las membranas, retarda la senescencia y mantiene la compartimentalización celular, inhibe la respiración y regula la producción de etileno (Cline & Hanson, 1992; Ferguson et al., 1995; Hofman et al., 2002; Saucedo-Hernández, Martínez-Damián, Colinas-León, Barrientos-Priego, & Aguilar-Melchor, 2005).

En los frutos almacenados por tres semanas, solamente el segundo día, de exposición a temperatura ambiente con 0.3 y 0.5 % de aspersiones de nitrato de calcio, presentó menor valor (Figura 1B). En este sentido, Tingwa y Young (1974) y Saucedo-Hernández et al. (2005) indicaron que el calcio reprime la producción de etileno en frutos de aguacate.

Para el caso de los frutos almacenados durante cinco semanas en refrigeración, los tres tratamientos presentaron su máximo de producción de etileno tres días después de ser trasladados a temperatura ambiente. Sin embargo, el tratamiento con 0.5 % de nitrato de calcio presentó menor valor de etileno (Figura 1C), y la aplicación de calcio al 0.3 % no mostró diferencia significativa con respecto del testigo.

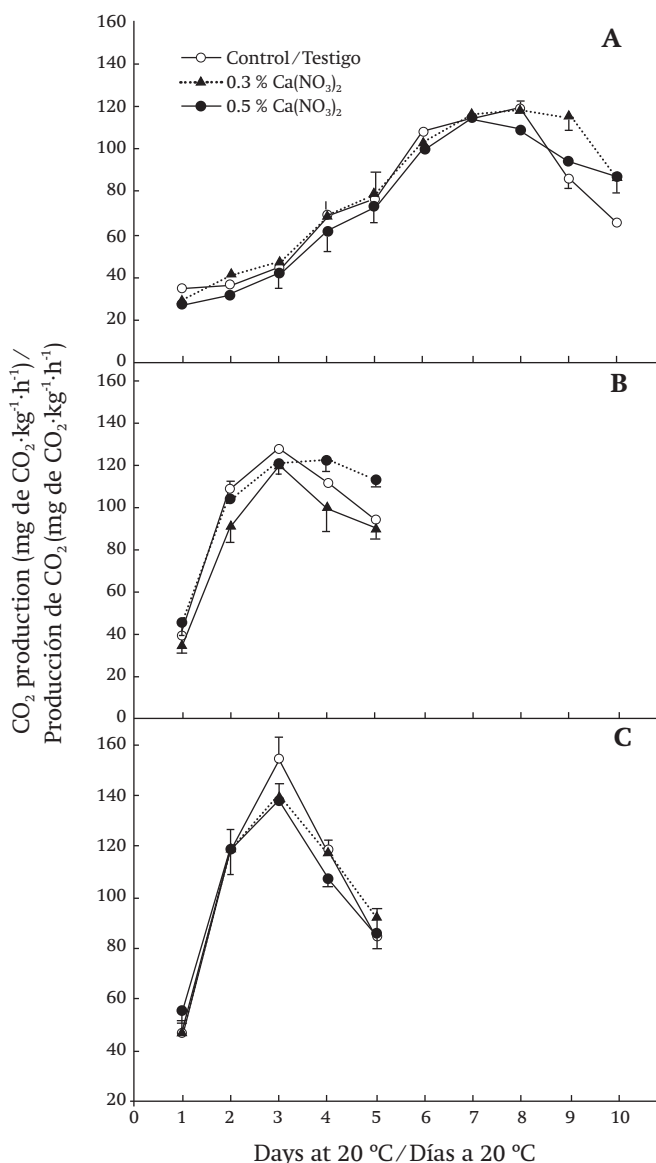
Poovaliah (1993) y Saucedo-Hernández et al. (2005) mencionan que la producción de  $\text{CO}_2$  y etileno es menor en frutas que han sido tratadas con calcio, en las cuales disminuyó el ablandamiento y mejoró la calidad de la fruta. Los frutos almacenados en refrigeración presentaron producción máxima de etileno tres días antes que los frutos almacenados a temperatura ambiente. Lo anterior puede ser explicado por el hecho de que las temperaturas bajas provocan estrés que impide que se forme etileno, pero no ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico); por ello, una vez que se saca el producto de refrigeración se forma el etileno más rápidamente (Saucedo-Hernández et al., 2005; Wang, 1982).

### Respiración

Los frutos testigo almacenados en temperatura ambiente presentaron su producción máxima de  $\text{CO}_2$  el día siete de evaluación, mostrando valores de  $118.66 \text{ mg de } \text{CO}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Los tratamientos con 0.3 % de calcio obtuvieron su producción máxima el día ocho con  $117.74 \text{ mg de } \text{CO}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , y los tratados con 0.5 % su máximo fue el día siete con  $114.48 \text{ mg de } \text{CO}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Figura 2A). Dichos valores fueron más bajos a los obtenidos por López-López y Cajuste-Bontemps (1999), quién al madurar frutos de aguacate cv. Hass, almacenados a 5 °C durante 28 días, obtuvo  $158 \text{ mg de } \text{CO}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  como valor máximo de climaterio.

al. (2005) indicated that calcium suppresses ethylene production in avocado fruits.

In the case of fruits stored under chilling conditions for five weeks, the three treatments showed maximum



**Figure 2.** CO<sub>2</sub> production of 'Hass' avocado fruits treated with six preharvest calcium nitrate spraying every six weeks, stored at room temperature (A), chilled at 5 °C for three (B) and five weeks (C). After chilling, fruits ripened at 20 °C. Each point represents the mean of three observations  $\pm$  standard error.

**Figura 2.** Producción de CO<sub>2</sub> de frutos de aguacate 'Hass' tratados con seis aspersiones precosecha de nitrato de calcio cada seis semanas, almacenados en temperatura ambiente (A), en refrigeración a 5 °C por tres (B) y cinco semanas (C). Después de refrigeración, los frutos se maduraron a 20 °C. Cada punto representa la media de tres observaciones  $\pm$  error estándar.

Por otra parte, el testigo y los tratados con 0.3 % de nitrato de calcio almacenados por tres semanas a 5 °C presentaron aumento en la producción de CO<sub>2</sub>, alcanzando su máximo a los tres días de ser transferidos a 20 °C; mientras que, los tratamientos con 0.5 % de nitrato de calcio alcanzaron su máximo cuatro días después de ser transferidos a temperatura ambiente (Figura 2B). Es muy conocido que el calcio retrasa la maduración, decrece la respiración de los frutos y la emisión de etileno, retardando levemente la elevación climatérica y reduciendo el máximo climaterio (Marcelle et al., 1989; Saucedo-Hernández et al., 2005). Además de lo anterior, el calcio retarda la senescencia debido al decremento de la actividad de las lipoxigenasas, el contenido de ACC y la emisión de etileno (Marcelle, 1991; Saucedo-Hernández et al., 2005).

Por otro lado, los tratamientos testigo también presentaron mayor daño por frío, lo cual puede ser asociado con mayor producción de CO<sub>2</sub>; ya que Cerdas-Araya et al. (2006), López-López y Cajuste-Bontemps (1999), Saucedo-Hernández et al. (2005) y Wang (1982) señalan que los incrementos en la respiración en frutos como plátanos, cítricos y aguacate se asocian con daños por frío, dados por una alteración irreversible en los procesos metabólicos.

Los resultados obtenidos de los frutos de aguacate 'Hass' almacenados por cinco semanas en refrigeración (5 °C) muestran que los tres tratamientos presentaron su respiración máxima a los tres días de ser trasladados a 20 °C, siendo el testigo el que mostró producción mayor de CO<sub>2</sub> (Figura 2C); observándose nuevamente un efecto favorable de la aplicación de calcio. Aunque los niveles alcanzados de CO<sub>2</sub> en 5 °C tienen mayor producción comparados con los almacenados a temperatura ambiente. Al respecto, varios investigadores han documentado respiración anómala durante o después de la exposición al frío de plantas sensibles, donde inicialmente incrementa la respiración al exponerse a temperatura baja para disminuir posteriormente. El aumento desmedido de respiración que se presenta una vez transferido el producto a temperaturas mayores (>15 °C) puede volver a su nivel normal o permanecer alto; lo anterior está sujeto al tiempo de exposición en temperatura crítica o menor (Lyons, 1973; Lyons & Breindenbach, 1987; Makino, Oshita, Kawagoe, & Tanaka, 2008; Monroy-Gutiérrez, Valle-Guadarrama, Espinosa-Solares, Martínez-Damián, & Pérez-López, 2013; Valle-Guadarrama et al., 2013).

### Contenido de calcio

El análisis de varianza detectó diferencias significativas en el contenido de calcio en el exocarpo de los frutos, siendo el tratamiento con 0.5 % el que presentó concentración mayor (0.085 % con base en el peso seco). López, Tirado, y Aguilar (1991) encontraron

ethylene production three days after being transferred to room temperature. However, the treatment with 0.5 % calcium nitrate had the lowest value (Figure 1C), and the application of 0.3 % calcium showed no significant difference relative to the control.

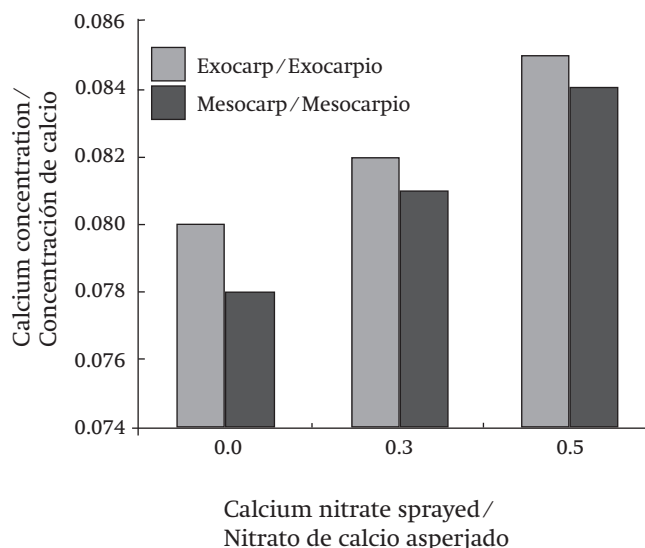
Poovaiah (1993) and Saucedo-Hernández et al. (2005) state that  $\text{CO}_2$  and ethylene production is lower in fruits which have been treated with calcium, which decreases fruit softening and improves fruit quality. Fruits stored under chilling conditions showed maximum ethylene production three days before fruits stored at room temperature. This can be explained by the fact that low temperatures cause stress that prevents the formation of ethylene, but not ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid); therefore, once the product is removed from chilling conditions, the ethylene forms faster (Saucedo-Hernández et al., 2005; Wang, 1982).

### Respiration

Control fruits stored at room temperature had peak  $\text{CO}_2$  production on the seventh day of evaluation, showing values of  $118.66 \text{ mg of } \text{CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . The treatments with 0.3 % calcium obtained maximum production on day eight with  $117.74 \text{ mg of } \text{CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , and those treated with 0.5 % had their peak value on day seven with  $114.48 \text{ mg of } \text{CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Figura 2A). These values were lower than those obtained by López-López and Cajuste-Bontemps (1999), who when ripening Hass avocado fruits, previously stored at  $5^\circ \text{C}$  for 28 days, recorded  $158 \text{ mg of } \text{CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  as the climacteric maximum value.

For their part, control fruits and those treated with 0.3 % calcium nitrate stored for three weeks at  $5^\circ \text{C}$  had an increase in  $\text{CO}_2$  production, peaking three days after being transferred to  $20^\circ \text{C}$ , whereas treatments with 0.5 % calcium nitrate reached their maximum four days after being transferred to room temperature (Figure 2B). It is well known that calcium delays ripening and decreases fruit respiration and ethylene emission, slightly delaying the climacteric rise and lowering the climacteric maximum (Marcelle et al., 1989; Saucedo-Hernández et al., 2005). In addition to the above, calcium delays senescence by decreasing lipoxygenase activity, ACC content and ethylene emission (Marcelle, 1991; Saucedo-Hernández et al., 2005).

Control treatments also showed greater chilling injury, which may be associated with increased  $\text{CO}_2$  production, as Cerdas-Araya et al. (2006), López-López and Cajuste-Bontemps (1999), Saucedo-Hernández et al. (2005) and Wang (1982) indicate that increased respiration in fruits such as bananas, citrus and avocado is associated with chilling injury, given by an irreversible alteration in metabolic processes.



**Figure 3. Calcium concentration (% based on dry weight) in the exocarp and mesocarp of 'Hass' avocado, treated with six preharvest calcium nitrate sprayings every six weeks. Values with the same color bars do not statistically differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).**

**Figura 3. Concentración de calcio (% con base en peso seco) en el exocarpio y mesocarpio de aguacate 'Hass', tratados con seis aspersiones precosecha de nitrato de calcio cada seis semanas. Valores con la misma letra entre barras del mismo color no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).**

contenidos entre 0.189 y 0.227 % asperjando 0.5 % de nitrato de calcio 45 días antes de la cosecha; los cuales son muy altos comparados con los encontrados en la presente investigación (Figura 3). Esta diferencia puede ser debida a que el calcio es un nutrimento de baja movilidad en los tejidos vegetales (Herrera-Basurto et al., 2007; Hofman et al., 2002; Saucedo-Hernández et al., 2005; Swarts, 1984), siendo posible que al aplicar con anterioridad se haya incrementado su penetración en las hojas y su posterior traslocación hacia el fruto, como puede notarse más adelante en los resultados obtenidos.

Con respecto a la concentración de Ca en el mesocarpio, el análisis de varianza detectó diferencias significativas, siendo los tratamientos con 0.3 y 0.5 % (0.081 y 0.084 % de calcio) superiores al testigo (0.078 % de calcio). Dichos valores son superiores a los encontrados por Solís-Fraire et al. (1998), quienes obtuvieron de 0.019 a 0.036 % sin presentarse diferencias entre los tratamientos de 1, 2 y 3 % de nitrato de calcio. Sin embargo, López et al. (1991) encontraron concentraciones entre 0.166 y 0.210 %; datos similares a los que reportó Witney (1985), los cuales son altos comparados con los encontrados en este estudio.



Results from 'Hass' avocado fruits stored for five weeks under chilling conditions (5 °C) show that the three treatments had peak respiration three days after being transferred to 20 °C, with the control showing the highest CO<sub>2</sub> production (Figure 2C), again observing a favorable effect resulting from calcium application. However, the CO<sub>2</sub> levels reached at 5 °C have greater production compared to those stored at room temperature. In this regard, several researchers have documented anomalous respiration during or after exposure to chilling of cold-sensitive plants, where respiration initially increases when exposed to low temperature and thereafter decreases. The sharp increase in respiration that occurs once the product is transferred to higher temperatures (>15 °C) is not necessarily permanent, as the respiration level can return to its normal level or remain high; the above is subject to the exposure time at a critical or lower temperature (Lyons, 1973; Lyons & Breindenbach, 1987; Makino, Oshita, Kawagoe, & Tanaka, 2008; Monroy-Gutiérrez, Valle-Guadarrama, Espinosa-Solares, Martínez-Damián, & Pérez-López, 2013; Valle-Guadarrama et al., 2013).

### Calcium content

The analysis of variance detected significant differences in the calcium content of the fruit exocarp, with the 0.5 % treatment having the highest concentration (0.085 % based on dry weight). López, Tirado, and Aguilar (1991) found contents between 0.189 and 0.227 % by spraying 0.5 % calcium nitrate 45 days before harvest; these levels are very high compared with those found in the present study (Figure 3). This difference may be because calcium is a low-mobility nutrient in plant tissues (Herrera-Basurto et al., 2007; Hofman et al., 2002; Saucedo-Hernández et al., 2005; Swarts, 1984); it is thus possible that applying it earlier increased its penetration in the leaves and subsequent translocation to the fruit, as can be seen later in the results.

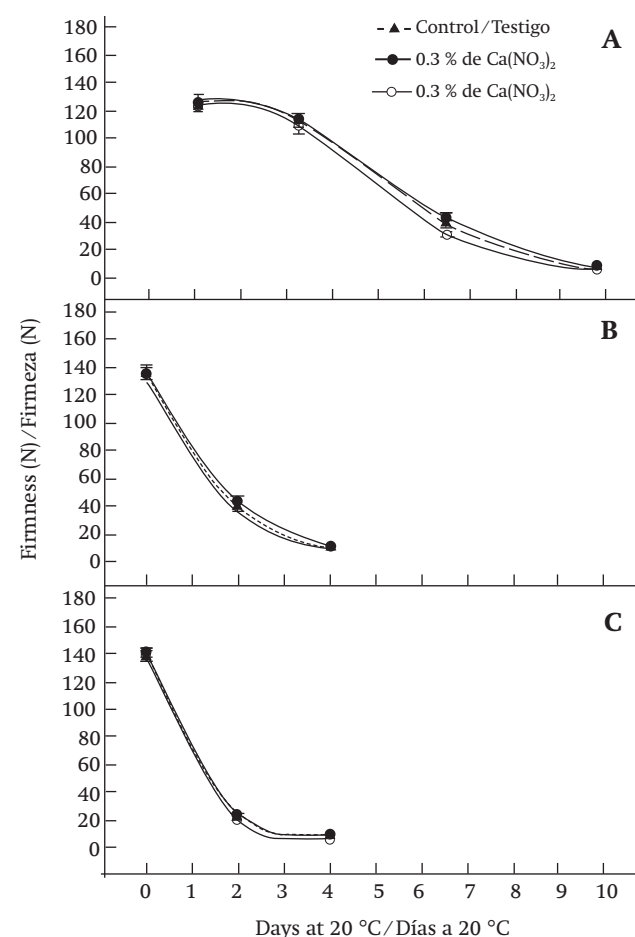
Regarding the Ca concentration in the mesocarp, the analysis of variance detected significant differences, with the 0.3 and 0.5 % treatments (0.081 and 0.084 % calcium) being superior to the control (0.078 % calcium). These values are higher than those found by Solís-Fraire et al. (1998), who obtained from 0.019 to 0.036 % without presenting differences among 1, 2 and 3 % calcium nitrate treatments. However, López et al. (1991) found concentrations between 0.166 and 0.210 %, data similar to those reported by Witney (1985), which are high compared with those found in this study.

### Firmness

When analyzing the firmness data by evaluation date in 'Hass' fruits stored at room temperature (Figure 4), differences among treatments were only found on

### Firmeza

Al analizar los datos de firmeza por fecha de evaluación en los frutos de 'Hass' almacenados a temperatura ambiente (Figura 4), solamente se encontraron diferencias en el día seis de evaluación; donde los tratamientos con calcio presentaron mayor firmeza con respecto al testigo. A pesar de que se ha señalado que aplicaciones de calcio en precosecha inducen a obtener menor daño en frutos almacenados, preservando



**Figure 4.** Firmness (N, newtons) of 'Hass' avocado fruits treated with six preharvest calcium nitrate sprayings every six weeks, stored at room temperature (A), chilled at 5 °C for three (B) and five weeks (C). After chilling, fruits ripened at 20 °C. Each point represents the mean of three observations  $\pm$  standard error.

**Figura 4.** Firmeza (N, newtons) de frutos de aguacate 'Hass' tratados con seis aspersiones precosecha de nitrato de calcio cada seis semanas, almacenados a temperatura ambiente (A), en refrigeración a 5 °C por tres (B) y cinco semanas (C). Después de refrigeración, los frutos se maduraron a 20 °C. Cada punto representa la media de tres observaciones  $\pm$  error estándar.

**Table 1. Weight loss (%) per evaluation day in 'Hass' avocado fruits treated with six preharvest calcium nitrate sprayings, stored at 5 °C for three and five weeks, then left out to ripen at 20 °C.**

**Cuadro 1. Pérdida de peso (%) por día de evaluación en frutos de aguacate 'Hass' tratados con seis aspersiones precosecha de nitrato de calcio, almacenados a 5 °C por tres y cinco semanas, después puestos a madurar a 20 °C.**

Calcium nitrate concentration (%) / Concentración de nitrato de calcio (%)	Evaluation days (three weeks) / Días de evaluación (tres semanas)			Evaluation days (five weeks) / Días de evaluación (cinco semanas)		
	0	2	4	0	2	4
0.0	3.0 a <sup>z</sup>	6.0 a	8.9 a	5.9 a	9.3 a	11.8 a
0.3	2.6 ab	5.9 a	8.9 a	4.7 ab	8.0 a	10.4 a
0.5	2.1 b	5.8 a	8.9 a	4.2 b	8.0 a	10.6 a
CV (%)	28.4	19.8	15.7	24.7	19.4	17.9

<sup>z</sup>Means with the same letter in columns do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CV: coefficient of variation.

<sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CV: coeficiente de variación.

**Table 2. Polyphenol oxidase activity ( $U \cdot g^{-1}$  fresh weight) per evaluation day in 'Hass' avocado fruits treated with six preharvest calcium nitrate spraying every six weeks, stored at room temperature.**

**Cuadro 2. Actividad de polifenoloxidasas ( $U \cdot g^{-1}$  de peso fresco) por día de evaluación en frutos de aguacate 'Hass' tratados con seis aspersiones precosecha de nitrato de calcio cada seis semanas, almacenados en temperatura ambiente.**

Calcium nitrate concentration (%) / Concentración de nitrato de calcio (%)	Evaluation days / Días de evaluación			
	0	3	6	9
0.0	635.3 a <sup>z</sup>	653.2 a	201.6 a	274.9 a
0.3	561.8 a	579.8 a	128.2 ab	224.5 a
0.5	561.4 a	605.3 a	100.8 b	200.6 a
CV (%)	12.7	13.7	24.4	20.1

<sup>z</sup>Means with the same letter in columns do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CV: coefficient of variation.

<sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CV: coeficiente de variación.

the sixth day of evaluation, where the treatments with calcium had higher firmness compared to the control. Although it has been reported that preharvest calcium applications result in obtaining less damage in stored fruits, by preserving their external appearance and increasing fruit firmness (Cline & Hanson, 1992; Espinosa-Cruz et al., 2014; Saucedo-Hernández et al., 2005), no predominant effect on fruit firmness was found in the present study.

As for the fruits stored for three and five weeks at 5 °C, significant differences were found in fruit firmness on the fourth day of evaluation, with the 0.5 % calcium nitrate treatment having the most influence compared to the control (Figure 4), for these days. However, in the days prior to the evaluation there is no effect due to spraying. It has been pointed out that calcium affects

su apariencia externa e incrementando la firmeza del fruto (Cline & Hanson, 1992; Espinosa-Cruz et al., 2014; Saucedo-Hernández et al., 2005), en la presente investigación no se encontró algún efecto predominante al aumentar la firmeza del fruto.

En cuanto a los frutos almacenados durante tres y cinco semanas en 5 °C, se encontraron diferencias significativas en la firmeza de los frutos el cuarto día de evaluación, siendo el tratamiento de 0.5 % de nitrato de calcio el de mayor influencia comparado con el testigo (Figura 4), para tales días. Sin embargo, en días anteriores a la evaluación no existe algún efecto por parte de las aspersiones. Se ha señalado que el calcio afecta la maduración y firmeza en frutos de aguacate y manzana; lo anterior debido a que reduce los principales cambios asociados con el

ripening and firmness in avocado fruits and apple; this is because it reduces the main changes associated with the softening process, these being the loss of cell walls and the cohesion between cells, when forming part of the pectins of the middle lamella (Witney, 1985). However, this variable effect is inconspicuous.

### Weight loss

No differences among treatments were observed in fruits at room temperature. In fruits stored for three and five weeks under hilling conditions, and placed at 20 °C on day zero of the evaluation, the treatment with the least weight loss compared to the control was the one with 0.5 % calcium nitrate (Table 1). However, at later dates no differences among treatments, where the control had the highest weight loss, 11.8 %, were found. Weight loss increased as the evaluation dates passed by, since water loss in fruits increases with time, representing a decrease in commercial weight and therefore a reduction in its value (Espinosa-Cruz et al., 2014; Saucedo-Hernández et al., 2005; Wills, McGlasson, Graham, & Joyce, 1984).

### Polyphenol oxidase (PPO) activity

The main importance of oxidative enzymes is their action, which leads to economic losses in fresh fruits and vegetables because it causes darkening and loss of smell and nutritional quality (Espinosa-Cruz et al., 2014; Marques et al., 1995; Walker, 1995; Whiley, 1990). The darkening is caused by contact between the phenolic compounds found in different parts of the cell and oxidative enzymes localized in the cytoplasm (Hofman et al., 2002; Marques et al., 1995). The results of PPO activity of fruits stored at room temperature showed significant differences among treatments only on day

proceso de ablandamiento, siendo estos la pérdida de paredes celulares y la cohesión entre células, al formar parte de las pectinas de la lámina media (Witney, 1985). No obstante, en esta variable su efecto es poco notorio.

### Pérdida de peso

No se observaron diferencias entre tratamientos en los frutos a temperatura ambiente. En los frutos almacenados por tres y cinco semanas en refrigeración, y puestos en 20 °C en el día cero de evaluación, el tratamiento que presentó menor pérdida de peso con respecto al testigo fue el de 0.5 % de nitrato de calcio (Cuadro 1). Sin embargo, en fechas posteriores no se encontraron diferencias entre tratamientos, donde el testigo alcanzó un máximo de 11.8 % de pérdida. La pérdida de peso fue mayor al transcurrir las fechas de evaluación; ya que la pérdida de agua en los frutos aumenta con el tiempo, lo que representa descenso del peso comercial y, por tanto, disminución de su valor (Espinosa-Cruz et al., 2014; Saucedo-Hernández et al., 2005; Wills, McGlasson, Graham, & Joyce, 1984).

### Actividad de la enzima polifenoloxidas (PPO)

La importancia principal de las enzimas oxidativas es su acción, la cual conduce a pérdidas económicas en frutos frescos y hortalizas debido a que causa oscurecimiento, pérdida de olor y calidad nutricional (Espinosa-Cruz et al., 2014; Marques et al., 1995; Walker, 1995; Whiley, 1990). El oscurecimiento es originado por el contacto entre los compuestos fenólicos que se encuentran en diferentes partes de la célula y las enzimas oxidativas localizadas en el citoplasma (Hofman et al., 2002; Marques et al., 1995). Los resultados de la actividad de la PPO de los frutos almacenados en temperatura

**Table 3. Polyphenol oxidase activity (U·g<sup>-1</sup> fresh weight) per evaluation day in 'Hass' avocado fruits treated with six preharvest calcium nitrate sprayings every six weeks, stored at 5 °C for three and five weeks, then left out to ripen at 20 °C.**

**Cuadro 3. Actividad de polifenoloxidas (U·g<sup>-1</sup> de peso fresco) por día de evaluación en frutos de aguacate 'Hass' tratados con seis aspersiones pre cosecha de nitrato de calcio cada seis semanas, almacenados a 5 °C por tres y cinco semanas, después puestos a madurar a 20 °C.**

Calcium nitrate concentration (%) / Concentración de nitrato de calcio (%)	Evaluation days (three weeks) / Días de evaluación (tres semanas)			Evaluation days (five weeks) / Días de evaluación (cinco semanas)		
	0	2	4	0	2	4
0.0	558.4 a <sup>z</sup>	313.9 a	499.5 a	550.7 a	530.8 a	393.6 a
0.3	548.5 a	306.6 a	370.0 b	401.3 a	386.3 a	282.2 a
0.5	538.9 a	242.7 a	281.2 b	460.6 a	358.2 a	283.0 a
CV (%)	5.8	10.2	13.4	20.7	18.8	14.5

<sup>z</sup>Means with the same letter in columns do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CV: coefficient of variation.

<sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CV: coeficiente de variación.

**Table 4. Chilling injury measured as absorbance per evaluation day in 'Hass' avocado treated with six preharvest calcium nitrate sprayings every six weeks, stored at 5 °C for three and five weeks, then left out to ripen at 20 °C.**

**Cuadro 4. Daño por frío medido como absorbancia por día de evaluación en frutos de aguacate 'Hass' tratados con seis aspersiones precosecha de nitrato de calcio cada seis semanas, almacenados a 5 °C por tres y cinco semanas, después puestos a madurar a 20 °C.**

Calcium nitrate concentration (%) / Concentración de nitrato de calcio (%)	Evaluation days (three weeks) / Días de evaluación (tres semanas)			Evaluation days (five weeks) / Días de evaluación (cinco semanas)		
	0	2	4	0	2	4
0.0	1.3 a <sup>z</sup>	1.6 a	2.4 a	1.6 a	1.7 a	2.6 a
0.3	1.2 a	1.4 a	2.0 b	1.4 a	1.6 a	2.4 b
0.5	1.2 a	1.3 a	1.9 b	1.4 a	1.4 a	2.0 c
CV (%)	6.9	20.7	6.6	6.6	10.4	3.4

<sup>z</sup>Means with the same letter in columns do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CV: coefficient of variation.

<sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

CV: coeficiente de variación.

six, with the 0.5 % calcium treatment having the lowest PPO activity compared to the control (Table 2). The preharvest calcium sprayings increased the calcium percentage in the avocado pulp, decreasing PPO activity relative to the control; however, this only differs statistically on day six, so it is advisable to increase the concentrations applied to see if a more noticeable effect can be achieved.

In fruits stored under chilling conditions for three weeks, the analysis of variance detected statistical differences among treatments on the fourth day of evaluation, with the 0.3 and 0.5 % treatments having the lowest PPO activity, respectively (Table 3). In fruits stored under chilling for five weeks, no significant differences among treatments were detected. Samples with calcium had lower PPO activity levels because calcium reduces the oxidation and content of various phenolic compounds, which clearly delays fruit darkening. The role of calcium in maintaining good quality in avocado fruits, particularly after a chilling period, is reportedly because it maintains a separation between the polyphenol oxidase enzyme and the phenolic substrate located in the vacuole (Bower & Cutting, 1988; Saucedo-Hernández et al., 2005).

It was expected that fruits treated with six calcium nitrate sprayings and stored for five weeks would have higher PPO activity, as a result of longer exposure to low temperatures, but this was not the case. In this regard, there are different factors that can cause fruit darkening such as: physiological development related to ripening, some disorders that can occur during storage and various technological processes (Espinosa-Cruz et al., 2014; Hofman et al., 2002; Marques et al. 1995; Penter et al., 2000; Thompson,

ambiente mostraron diferencias significativas entre tratamientos solamente el día seis, siendo el tratamiento con 0.5 % de calcio el que presentó menor actividad de PPO en comparación con el testigo (Cuadro 2). Las aspersiones de calcio en precosecha incrementaron el porcentaje de calcio en la pulpa de aguacate disminuyendo la actividad de la PPO con respecto al testigo; sin embargo, esto solamente se distingue estadísticamente el día seis, por lo cual se sugiere tratar de incrementar las concentraciones aplicadas para ver si se puede lograr un efecto más notorio.

En los frutos almacenados en refrigeración por tres semanas, el análisis de varianza detectó diferencias estadísticas entre tratamientos el cuarto día de evaluación, siendo los tratamientos con 0.3 y 0.5 % los que presentaron menor actividad de PPO, respectivamente (Cuadro 3). En los frutos almacenados en refrigeración por cinco semanas, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Las muestras con calcio presentaron niveles menores de actividad de la enzima polifenoloxidasas; esto debido a que el calcio reduce la oxidación y contenido de diversos compuestos fenólicos, lo que evidentemente influye en el retraso del oscurecimiento de los frutos. Se ha señalado el papel del calcio para mantener frutos de aguacate de buena calidad, particularmente después de un periodo de refrigeración debido a que mantiene una separación entre la enzima polifenoloxidasas y el sustrato fenólico localizado en la vacuola (Bower & Cutting, 1988; Saucedo-Hernández et al., 2005).

Era de esperarse que los frutos tratados con seis aspersiones de nitrato de calcio almacenados por cinco semanas presentaran mayor actividad de la PPO, por



2010; Whiley, 1990). However, in this experiment the temperature used during chilling preservation of avocado and the exposure time did not result in physicochemical membrane changes that may cause decompartmentalization and lead to enzyme-substrate (polyphenol oxidase-phenols) contact; this is probably because control fruits did not have calcium deficiency or the concentrations used were insufficient.

### Chilling injury

This test was only able to detect, statistically, chilling injury on the fourth day of evaluation in fruits stored for three weeks at 5 °C; this was not the case at day two, with the 0.3 and 0.5 % calcium nitrate applications being the best treatments, showing lower absorbance levels (Table 4). In fruits stored under chilling for five weeks, on the fourth day of evaluation the best treatment was the 0.5 % spraying (Table 4). This increased absorbance as the days passed by was also observed by Espinosa-Cruz et al. (2014), Martínez-Damián (1990) and Saucedo-Hernández et al. (2005), and it appears to be related to softening, since in firm fruits chilling injuries are not detected with this technique, not until they are soft.

Some of the key events associated with chilling injury in fruits are: loss of membrane integrity, caused by lipid phase change, solute leakage and loss of intracellular compartmentalization. This was observed in fruits chilled and without calcium treatment; however, a higher level of chilling injury occurred in fruits that were not sprayed with calcium (Espinosa-Cruz et al., 2014; Saucedo-Hernández et al., 2005; Wang, 1982).

### Conclusions

Applications of calcium nitrate, at 0.3 and 0.5 %, in Hass avocado fruits decreased the respiratory pattern and ethylene production at room temperature and 5 °C; the treatments increased the calcium concentration in both the exocarp and the mesocarp. Moreover, the calcium decreased weight loss, polyphenol oxidase activity and the presence of chilling injury.

### *End of English version*

### References / Referencias

- Bower, J. P., & Cutting, J. G. (1988). Avocado fruit development and ripening physiology. *Horticultural Reviews*, 10, 229-271. Retrieved from [http://www.avocadosource.com/journals/horticulturalreviews/hortrev\\_1988\\_pg\\_229-271.pdf](http://www.avocadosource.com/journals/horticulturalreviews/hortrev_1988_pg_229-271.pdf)
- Cerdas-Araya, M. M., Montero-Calderón, M., & Díaz-Cordero, E. (2006). *Manual de manejo pre y poscosecha de aguacate (Persea americana)*. Costa Rica: Ministerio de agricultura y ganadería. Universidad de Costa Rica.

un mayor tiempo de exposición a bajas temperaturas; sin embargo, no fue así. Al respecto, existen diferentes factores que pueden ocasionar oscurecimiento de frutos como son: el desarrollo fisiológico relacionado con la maduración, algunos desórdenes que pueden ocurrir durante el almacenamiento y varios procesos tecnológicos (Espinosa-Cruz et al., 2014; Hofman et al., 2002; Marques et al. 1995; Penter et al., 2000; Thompson, 2010; Whiley, 1990). No obstante, en este experimento la temperatura empleada durante la frigoconservación de aguacate y el tiempo de exposición no ocasionaron modificaciones fisicoquímicas de membranas que pudieran causar descompartmentalización y conducir al contacto enzima-sustrato (polifenoloxidasas-fenoles); esto, probablemente, porque los frutos testigo no presentan deficiencia de calcio o las concentraciones empleadas no fueron suficientes.

### Daño por frío

Esta prueba solo alcanzó a detectar, estadísticamente, daños por frío el día cuatro de evaluación en los frutos almacenados por tres semanas a 5 °C; no así a los dos días, siendo 0.3 y 0.5 % de nitrato de calcio los mejores tratamientos, los cuales presentaron niveles menores de absorbancia (Cuadro 4). En los frutos almacenados por cinco semanas en refrigeración, el día cuatro de evaluación el mejor tratamiento fue la aspersión a 0.5 % (Cuadro 4). Este aumento de absorbancia al transcurrir los días fue observado también por Espinosa-Cruz et al. (2014), Martínez-Damián (1990) y Saucedo-Hernández et al. (2005), y al parecer se relaciona con el ablandamiento; ya que en frutos firmes no se detectan daños por frío con esta técnica, sino hasta que se encuentran blandos.

Algunos de los principales eventos asociados con daño por frío en frutos son: la pérdida de integridad de membranas, originada por el cambio de fase de los lípidos, el escape de solutos y la pérdida de compartimentalización intracelular. Esto se observó en los frutos refrigerados y sin tratamiento con calcio; sin embargo, se presentó mayor nivel de daño por frío en los frutos a los que no se asperjó calcio (Espinosa-Cruz et al., 2014; Saucedo-Hernández et al., 2005; Wang, 1982).

### Conclusiones

Las aplicaciones de nitrato de calcio, a 0.3 y 0.5 %, en frutos de aguacate cv. Hass disminuyeron el patrón respiratorio y la producción de etileno en temperatura ambiente y en 5 °C; lo anterior provocando aumento de la concentración de calcio tanto en exocarpio como mesocarpio. Por otra parte, el calcio disminuyó la pérdida de peso, la actividad de la polifenoloxidasas y la presencia de daños por frío.

### *Fin de la versión en español*

- Chaplin, G. R., Wills, R. B. H., & Graham, D. (1982). Objective measurement of chilling injury in the mesocarp of stored avocados. *HortScience*, 17(2), 238-239. Retrieved from [http://www.avocadosource.com/Journals/HortScience/HortSci\\_1982\\_17\\_PG\\_238-239.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/HortScience/HortSci_1982_17_PG_238-239.pdf)
- Chapman, H. D., & Pratt, P. F. (1979). *Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas* (pp. 67-70). Ciudad de México: Trillas. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=89467&indexSearch=ID>
- Cline, A. J., & Hanson, E. J. (1992). Relative humidity around apple fruit influences its accumulation of calcium. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(4), 542-546. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/117/4/542.short>
- Espinosa-Cruz, C. C., Valle-Guadarrama, S., Ybarra-Moncada, M. C., & Martínez-Damián, M. T. (2014). Comportamiento postcosecha de frutos de aguacate 'HASS' afectado por temperatura y atmósfera modificada con microperforado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(3), 235-242. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v37n3/v37n3a9.pdf>
- Ferguson, I. B. (1984). Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant, Cell & Environment*, 7(6), 477-489. doi: 10.1111/j.1365-3040.1984.tb01438.x
- Ferguson, I. B., Volz, R. K., Harker, F. R., Watkins, C. B., & Brookfield, P. L. (1995). Regulation of postharvest fruit physiology by calcium. *Acta Horticulture*, 398, 23-30. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.398.2
- Ferguson, I. B., Volz, R. K., & Woolf, A., (1999). Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3), 255-262. doi: 10.1016/S0925-5214(98)00089-1
- Flores, D. (2014). *Mexican avocado exports continue to grow*. GAIN Report Number: MX4079 (pp. 7). United States: USDA Foreign Agricultural Services.
- Herrera-Basurto, J., Martínez-Damián, M. T., Castillo-González, A. M., Barrientos-Priego, A. F., Colinas-León, M. T., Pérez-Mercado, C. A., & Aguilar-Melchor, J. J. (2007). Aspersiones de calcio en la concentración nutrimental de hoja, cáscara y fruto de aguacate 'HASS'. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 13(1), 21-27. Retrieved from [http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?id\\_articulo=46&id\\_revistas=1&id\\_revista\\_numero=3](http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?id_articulo=46&id_revistas=1&id_revista_numero=3)
- Hofman, P. J., Vuthapanich, S., Wilely, A. W., Klieber, A., & Simos, D. H. (2002). Tree yield and fruit mineral concentrations influence "Hass" avocado fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 113-123. doi: 10.1016/S0304-4238(01)00286-2
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2009). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. Coatepec Harinas, México: Author. Retrieved from <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/15/15021.pdf>
- Kader, A. A. (2002). Postharvest biology and technology: an overview. In: Kader, A. A. (Ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops* (Third edition, pp 39-47). Oakland, California, USA: University of California Agriculture and Natural Resources.
- Lamikanra, O. (1995). Enzymatic browning of muscadine grape products. In: Lee, C. L., & Whitaker, J. R. (Eds.) *Enzymatic Browning and its Prevention* (pp. 166-177). Washington D.C., USA: Ed. ACS.
- López, J. A., Tirado, T. J. L., & Aguilar, M. J. J. (1991). Efecto de aplicación foliar de  $\text{CaNO}_3$  (sic) en precosecha sobre la concentración de calcio, nitrógeno y potasio en el fruto de aguacate cv. Hass (pp. 141-148). México: Fundación Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas.
- López-López, L., & Cajuste-Bontemps, J. F. (1999). Comportamiento postcosecha de fruta de aguacate cv. hass con base en la altitud de producción y tipo de floración. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 365-371. Retrieved from [http://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4\\_p365.pdf](http://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4_p365.pdf)
- Lyons, J. M. (1973). Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 24, 445-466. doi: 10.1146/annurev.pp.24.060173.002305
- Lyons, J. M., & Breindebach, R. W. (1987). Chilling injury. In: Weichman, J. (Ed.), *Postharvest Physiology of Vegetables* (pp: 305-326). USA: Marcel Dekker.
- Lyons, J. M., Raison, J. K., & Graham, D. (1979). *Low temperature stress in crop plants: the role of the membrane* (pp. 565). New York, USA: Academic Press. doi: 10.1111/1365-3040.ep11604647
- Makino, Y., Oshita, S., Kawagoe, Y., & Tanaka, A. (2008). Simultaneous prediction of oxygen and carbon dioxide concentrations in a perforated pouch with light red tomato fruits by a mathematical model. *Transactions of the ASABE*, 51(2), 559-565. doi: 10.13031/2013.24355
- Marcelle, R. D. (1991). Relationships between mineral content, lipoxygenase activity, levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene emission in apple fruit flesh disks (cv. Jonagold) during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 1(2), 101-109. doi: 10.1016/0925-5214(91)90001-R
- Marcelle, R. D., Porrey, W., Deckers, T., Simon, P., Goffings, G., & Herregods, M. (1989). Relationship between fruit mineral composition and storage life of apples cv. Jonagold. *Acta Horticulturae*, 258, 373-378. doi: 10.17660/ActaHortic.1989.258.43
- Marques, A. L., Fleuriet, A., & Macheix, J. J. (1995). Fruit polyphenol oxidases: New data on an old problem. In: Lee, C. L., & Whitaker, J. R. (Eds.), *Enzymatic Browning and its Prevention* (pp. 90-104.). Washington D.C., USA: FAO. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9710955>
- Martínez-Damián, M. T. (1990). Efecto de diferentes temperaturas en el almacenamiento de frutos de aguacate cv Fuerte (pp. 159-168). México: CIC-FRUTICOLA-CICTAMEX. Coatepec Harinas.
- McCollum, T. G., & McDonald, R. E. (1991). Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indexes of

- chilling injury in grape fruit. *HortScience*, 26(9), 1191-1192. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/26/9/1191.short>
- McKersie, B. D., & Leshem, Y. Y. (1994). Chilling stress. In: McKersie, B. D., & Leshem, Y. Y. (Eds.), *Stress and coping in cultivated plants* (pp. 79-103). The Netherlands, Amsterdam: Kluwer Academic.
- Monroy-Gutiérrez, T., Valle-Guadarrama, S., Espinosa-Solares, T., Martínez-Damián, M. T., & Pérez-López, A. (2013). Effect of microperforation and temperature on quality of modified atmosphere packaged huitlacoche (*Ustilago maydis*). *CyTA – Journal of Food*, 11(4), 309-317. doi: 10.1080/19476337.2012.755712
- Osuna-García, J. A., & Beltran, J. A. (2003). *Temperatura de refrigeración y 1-metilciclopropileno (1-MCP) para prolongar el tiempo de almacenamiento del aguacate hass, en condiciones de Nayarit (México)* (pp. 240.). México: Congreso Mundial del Aguacate.
- Parkin, K. L., Marangoni, A., Jackman, R. L., Yada, R. Y., & Stanley, D. W. (1989). Chilling injury. A review of possible mechanisms. *Journal of Food Biochemistry*, 13(2), 127-153. doi: 10.1111/j.1745-4514.1989.tb00389.x
- Penter, M. G., Snijder, B., Stassen, P. J. C., & Schafer, E. (2000). The effect of growth inhibitors on fruit production in Hass avocado trees. Retrieved from [http://www.avocadosource.com/Journals/SAAGA/SAAGA\\_2000/SAAGA\\_2000\\_PG\\_046-051.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/SAAGA/SAAGA_2000/SAAGA_2000_PG_046-051.pdf)
- Pesis, E., Ampunpong, C. H., Shusiri, B., & Hewett, E. W. (1994). Enhancement of ethylene and CO<sub>2</sub> production in apple fruit following short-term exposure to high CO<sub>2</sub>. *Postharvest Biology and Technology*, 4(4), 309-317. doi: 10.1016/0925-5214(94)90042-6
- Poovaiah, B. W. (1993). Biochemical and molecular aspects of calcium action. *Acta Horticulturae*, 326, 139-147. doi: 10.17660/ActaHortic.1993.326.14
- Raison, J. K., & Orr, G. R. (1990). Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. In: Wang, C. Y. (Ed.), *Chilling Injury of Horticultural Crops* (pp. 145-164). Boca Raton Florida, USA: CRC Press.
- Salveit, M. E., & Morris, L. L. (1990). Overview on chilling injury of horticultural crops. In: Wang, C. Y. (Ed.), *Chilling injury of Horticultural Crops* (pp. 3-15). Boca Raton Florida, USA: CRC Press.
- Saucedo-Hernández, L., Martínez-Damián, M. T., Colinas-León, M. T., Barrientos-Priego, A. F., & Aguilar-Melchor, J. J. (2005). Aplicaciones foliares de nitrato de calcio en la maduración y daños por frío en aguacate 'fuerte'. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(1), 149-157. Retrieved from [http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?id\\_articulo=143&id\\_revistas=1&id\\_revista\\_numero=7](http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?id_articulo=143&id_revistas=1&id_revista_numero=7)
- Solis-Fraire, J. J., Barrientos-Priego, A. F., Pérez-Mercado, C. A., Rubí-Arriaga, M., Martínez-Damián, M. T., & Reyes-Alemán, J. C. (1998). Aplicaciones de nitrato de calcio, su efecto en el contenido nutrimental de hoja y mesocarpio en aguacate (*Persea americana* Mill) cv. Hass. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 4(2), 113-117. Retrieved from [http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?id\\_articulo=767&id\\_revistas=1&id\\_revista\\_numero=73](http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?id_articulo=767&id_revistas=1&id_revista_numero=73)
- Swarts, D. H. (1984). Post harvest problems of avocados, let's talk the same language. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 7, 15-19.
- Thompson, A. K. (2010). Harvest and Pre harvest factors. In: *Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables* (pp. 43-44). Wallingford, UK: CABI.
- Valle-Guadarrama, S., Morales-Cabrera, M., Peña-Valdivia, C. B., Mora-Rodríguez, B., Alia-Tejcal, I., Corrales-García, J., & Gómez-Cruz, A. (2013). Oxidative/fermentative behavior in the flesh of 'Hass' avocado fruits under natural and controlled atmosphere conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 272-282. doi: 10.1007/s11947-011-0747-8
- Walker, J. R. L. (1995). Enzymatic browning in fruits: its biochemistry and control. In: Lee, C. Y., & Whitaker, J. R. (Eds.), *Enzymatic Browning and its Prevention* (pp. 8-22). Washington D.C., USA: American Chemical Society.
- Wang, Y. C. (1982). Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *HortScience*, 17, 173-186.
- Whiley, A. (1990). Interpretación de la fenología y fisiología del palto para obtener mayores producciones. In: *Producción, postcosecha y comercialización de paltas. Curso Internacional* (pp. 1-25). Viña del Mar, Chile: Facultad de Agronomía-FAO. Universidad Católica de Valparaíso.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., & Joyce, D. (1984). *Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas posrecolección* (pp. 278). Zaragoza, España: Editorial Acirbia S. A.
- Witney, G. (1985). *Study of calcium budget of an avocado (Persea americana Mill.) orchard* (pp. 132). Pietermaritzburg, South Africa: University of Natal.