



Facultad de
Ciencias Agrarias
y Forestales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Trabajo de Tesis Doctoral para optar por el Doctorado de la Facultad de
Ciencias Agrarias y Forestales

"Respuesta antioxidante y hormonal al estrés por alta radiación solar en frutos de manzana"



Ing. Agr. M Sc. Graciela María Colavita

Director
Dr. Pedro Marcos Civello

Co-director
Dr. Juan José Guiamet

2021

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctorado de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata

"Respuesta antioxidante y hormonal al estrés por alta radiación solar en frutos de manzana"

Tesista

Ing. Agr. M.Sc. Graciela María Colavita

(Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, UNComahue)

Director

Dr. Pedro Marcos Civello

(Facultad Ciencias Exactas, UNLP; Instituto de Fisiología Vegetal, CONICET-UNLP)

Co-director

Dr. Juan José Guiamet

(Facultad Ciencias Naturales y Museo y Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP; Instituto de Fisiología Vegetal, CONICET-UNLP)

Jurado de tesis

Fecha de presentación: diciembre, 2021

***Un barco en un puerto está a salvo, pero no es
para eso para lo que se construye un barco
(Grace Hopper)***

**A mis adorados
padres, esposo e hijos**

AGRADECIMIENTOS

Siempre me decías ...'ça arrive, enfin ça arrive'..., hoy Patricia (Garriz) te traigo a este momento, tal vez como un raro homenaje. Y si, sucede, se arriba y sólo queda agradecer.....

En este instante emotivamente vienen a mi memoria muchas personas que durante estos años me apoyaron, alentaron, desafiaron y ayudaron. Mi profundo agradecimiento a mi director el Dr. Pedro Marcos Civello, excelente investigador que estuvo atento y dispuesto a guiar y colaborar en mi formación.

Les agradezco a mis padres, los primeros motivadores en que me interese en el estudio de los procesos de la naturaleza. Le agradezco infinitamente a mamá porque con su inconmensurable amor me apoyo en todo cuanto pudo.

A mi querido esposo y mis cuatro hijos, esta es la oportunidad de expresarle la gratitud que tengo hacia ellos porque siempre me acompañaron y estimularon para seguir adelante con este proyecto. Profundamente agradecida reconozco que sin el apoyo de toda mi familia hoy no estaría escribiendo estas frases.

Le agradezco a mi amiga y colega Ing. Agr. Laura Vita con quien trabajamos todos los días codo a codo para hacer crecer la cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue. Mi gratitud a la Ing. Agr. Nazarena Spera (mi Polli) que junto a Laura siempre estuvieron a mi lado apoyando, estimulando y ayudándome en el campo y laboratorio. A la Ing Agr. Valeria Blackhall y a todo el equipo de Fisiología Vegetal, mis colegas y compañeros en esta maravillosa actividad que es la investigación.

Agradezco a las instituciones del estado, en las cuales se hace mucho con muy poco, donde realicé este doctorado: Universidad Nacional de La Plata, Universidad Nacional del Comahue e Instituto de Biotecnología Agropecuaria del Comahue Centro dependiente de CITAAC (CONICET- UNComahue).

Mi gratitud a todos los docentes del doctorado y a todos los que estuvieron por poquito que sea, para mí fue un montón.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE

Portada	I
Agradecimientos	V
Índice	VI
Abreviaturas	XI
Resumen	XIII
Abstract	XVI
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. El cultivo de la manzana en Argentina	2
1.1. Relevancia económica	2
1.2. Características geográficas y agroclimáticas de las regiones productora	3
1.3. Características generales del fruto y de diferentes variedades de manzana	5
2. Fisiopatía daño por sol en manzana	7
2.1. Incidencia del asoleado en la producción frutícola	8
2.2. Desarrollo de los síntomas de daño por sol	9
2.3. Tipos de daño por sol en frutos	10
2.4. Factores abióticos que promueven el daño por sol en frutos	12
3. Estrés oxidativo en vegetales	13
3.1. Especies reactivas de oxígeno	14
3.2. Acción de las EROs sobre las biomoléculas	16
3.3. Sistemas de defensa antioxidante	18
3.4. Estrés oxidativo debido a elevada radiación solar y altas temperaturas	23
3.4.1. Efecto de elevada radiación solar	23
3.4.2. Efecto de altas temperaturas	25
4. Hormonas vegetales relacionadas a la respuesta al estrés oxidativo	26
4.1. Poliaminas	27
4.1.1. Regulación interna de poliaminas	28
4.1.2. Rol de las poliaminas en estrés abiótico	30
4.2. Ácido abscísico (ABA)	32
4.2.1. Regulación interna de ABA	32
4.2.2. Rol del ABA en estrés oxidativo	34
4.3. Etileno	35
4.3.1. Regulación interna del etileno	36

4.3.2. Rol del etileno en estrés oxidativo	37
Fundamentos de la elección del tema	39
Hipótesis	41
Objetivo general	41
Objetivos específicos	42
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	43
1. Localización, período de estudio y datos agrometeorológicos de los lugares donde se realizaron los trabajos experimentales	43
2. Cuantificación y determinación de condiciones de estrés	45
2.1. Radiación global	45
2.2. Radiación fotosintéticamente activa (PAR).	45
2.3. Temperatura ambiente	45
2.4. Temperatura superficial de hoja y fruto	45
3. Material vegetal	46
3.1. Nivel de síntoma de estrés por alta radiación solar en frutos	47
4. Variables de respuesta	47
4.1. Determinaciones fisiológicas	47
4.1.1. Integridad de membranas	47
4.1.2. Contenido relativo de agua	48
4.1.3. Rendimiento cuántico máximo de fotosistema II (PSII)	48
4.2. Determinaciones químicas y bioquímicas	49
4.2.1. Concentración de clorofilas	49
4.2.2. Concentración de carotenos	50
4.2.3. Peroxidación de lípidos	50
4.2.4. Capacidad antioxidante	51
4.2.5. Antocianinas monoméricas totales	52
4.2.6. Polifenoles totales	53
4.2.7. Determinaciones enzimáticas	53
4.2.7.1. Preparación del extracto proteico	53
4.2.7.2. Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	54
4.2.7.3. Actividad de catalasa (CAT)	54
4.2.7.4. Actividad de glutatión reductasa (GR)	55
4.2.7.5. Actividad de ascorbato peróxidasa (APX)	55
4.2.8. Determinación de hormonas vegetales	55

4.2.8.1. Concentración ácido abscísico	55
4.2.8.2. Concentración de poliaminas	56
4.2.8.3. Emisión de etileno	57
5. Análisis estadístico	58
<i>CAPÍTULO 1: Variación del sistema antioxidante, poliaminas, ABA y etileno en piel de manzanas que presentan distintos grados de daño por sol</i>	60
INTRODUCCIÓN	61
1.1. MATERIALES Y MÉTODOS	65
1.1.1. Sitio de estudio y condiciones climáticas	65
1.1.2. Material vegetal	66
1.1.3. Determinaciones de variables de respuesta	67
1.1.3.1. Incidencia de fisiopatía daño por sol	67
1.1.3.2. Variables bioquímicas	68
1.1.4. Análisis estadístico	68
1.2. RESULTADOS	69
1.2.1. Incidencia de daño por sol	69
1.2.2. Indicadores de estrés oxidativo	70
1.2.3. Variación en compuestos antioxidantes	71
1.2.4. Diferencias en la actividad de enzimas antioxidantes	72
1.2.5. Niveles de las hormonas relacionadas con la respuesta a estrés	74
1.2.5.1. Poliaminas	74
1.2.5.2. Ácido abscísico y etileno	76
1.3. DISCUSIÓN	77
CONCLUSIÓN	82
<i>CAPÍTULO 2: Evolución de la respuesta antioxidante y hormonal en manzanas expuestas a estrés por elevada radiación solar y temperatura</i>	83
INTRODUCCIÓN	84
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS	88
2.1.1. Sitio de estudio y condiciones climáticas	88
2.1.2. Material vegetal y sistema experimental	88
2.1.3. Determinaciones de variables de respuesta fisiológicas y bioquímicas	90
2.1.4. Análisis estadístico	91
2.2. RESULTADOS	91

2.2.1. Parámetros de temperatura y radiación	91
2.2.2. Variaciones en los indicadores de estrés fotoquímico y oxidativo	93
2.2.3. Evolución de la actividad de enzimas antioxidantes	95
2.2.4. Cambios en las concentraciones de hormonas relacionadas con la respuesta a estrés	98
2.3. DISCUSIÓN	100
CONCLUSIÓN	105
CAPÍTULO 3: <i>Caracterización de variedades de manzana según la respuesta de sus frutos al estrés por alta radiación solar y temperatura</i>	107
INTRODUCCIÓN	108
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS	111
3.1.1. Sitio de estudio y condiciones climáticas	111
3.1.2. Material vegetal y sistema experimental	111
3.1.3. Determinaciones de variables de respuesta	113
3.1.4. Análisis estadístico	114
3.2. RESULTADOS	115
3.2.1. Cambios fisiológicos y bioquímicos en tejidos de frutos expuestos a estrés por elevada radiación solar y temperaturas	115
3.2.1.1. Variables Fisiológicas	115
3.2.1.2. Variables Bioquímicas	116
3.2.2. Selección de variables con mayor potencial descriptivo de la reacción de los tejidos de los frutos de manzana a estrés por elevada radiación solar	123
3.2.3. Agrupamiento de cultivares de manzana por similitud en la reacción de los tejidos de los frutos al estrés por elevada radiación solar	125
3.3. DISCUSIÓN	126
CONCLUSIÓN	132
CAPÍTULO 4: <i>Efecto de ABA exógeno sobre las defensas antioxidante, calidad de frutos y fisiología de manzanos cultivados bajo elevada radiación solar y temperatura</i>	134
INTRODUCCIÓN	135
4.1. MATERIALES Y MÉTODOS	137
4.1.1. Sitio de estudio y condiciones climáticas	137
4.1.2. Material vegetal y sistema experimental	137
4.1.3. Determinaciones de variables de respuesta	138
4.1.3.1. Parámetros evaluados en frutos	138

4.1.3.2. Parámetros evaluados para aspectos vegetativos	141
4.1.4. Análisis estadístico	142
4.2. RESULTADOS	143
4.2.1. Estado oxidativo y fisiológico de los tejidos de piel de frutos	143
4.2.2. Calidad de frutos	145
4.2.3. Estado oxidativo y fisiológico de los tejidos de hojas	147
4.3. DISCUSIÓN	151
CONCLUSIÓN	153
CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS	155
BIBLIOGRAFÍA	158
Publicaciones derivadas de esta tesis	187
En actas de congresos	187
En revistas científicas	187

ABREVIATURAS

ABA: Acido abscísico
AC: Análisis de Conglomerados
ACC: ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico
ACP: Análisis de Componentes Principales
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ANOVA: Análisis de la varianza
APX: Ascorbato peroxidasa
AsA: ácido ascórbico
CRA: contenido relativo de agua
DHAR: Dehidroascorbato reductasa
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ERO: Especie reactiva de oxígeno
Fv/Fm: Eficiencia cuántica máxima del PSII
g: Gramo
GLM: Modelo linealmente generalizado
GR: Glutación reductasa
GSH: glutación reducido
h: Horas
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
ha: Hectáreas
HO[•]: Radical hidroxilo
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución o high performance liquid chromatography
HR: Humedad relativa
kDa: Kilodalton
Kg: kilogramo
MDA: malondialdehido
MDHAR: Monodehidroascorbato reductasa
1-MCP: 1-metilciclopropeno
mg: Miligramo
min: Minuto
ml: Mililitro
mm: Milímetro
mM: Milimol
μM: MicroMolar
ng: Nanogramo
nm: Nanomoles
O₂: Oxígeno
O₂H[•]: Radical perhidroxilo
O₂⁻: Anión superóxido
¹O₂: Oxígeno singulete
p/p: peso/peso

p/v: Peso/volumen
PAR: Radiación fotosintéticamente activa
PAs: Poliaminas
Ppm: Partes por millón
PSII: fotosistema 2
Put: Putrescina; 1,4-diaminobutano
PVPP: Polivinilpirrolidona
RNA: Ácido ribonucleico
rpm: Revoluciones por minuto
rRNA: RNA ribosómico
SAM: S-adenosilmetionina
SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SOD: Superóxido dismutasa
Spd: Espermidina; triamina 1,8 diamino-4-ozaoctano
Spm: Espermina; tetramino 1,12-diamino 4,9-diazadodecano
SS: Sólidos Solubles
TBARs: especies reactivas al ácido tiobarbiturico
tn: Tonelada
TSF: temperatura superficial de fruto
USDA: del inglés, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV: Ultravioleta
v/v: volumen/ volumen
var: Variedad
W m⁻²: Watt/metro cuadrado
µl: Microlitro

RESUMEN

La manzana es la fruta que ocupa el cuarto lugar en volumen consumido anualmente en el mundo. Desde hace décadas, la producción y consumo de manzanas se han incrementado, en respuesta a una mayor demanda, que a su vez aumenta continuamente los estándares de calidad.

La interacción medio ambiente-metabolismo es determinante de la composición, anatomía, morfología y desarrollo de los tejidos del fruto. Por lo tanto, el rendimiento y la calidad están influenciados por el clima imperante en la región donde se desarrolla el cultivo. En la mayoría de las zonas productoras de manzanas del mundo (entre ellas los valles del norte de la Patagonia) se registran elevada radiación solar y temperatura. La tensión que generan estos factores ambientales sobre el metabolismo de los tejidos del fruto induce un desorden fisiológico de tipo oxidativo denominado 'daño por sol'. Esta fisiopatía se produce en la cara de los frutos expuesta al sol y es considerada uno de los problemas más importante en huertos de manzano, llegando a alcanzar incidencias superiores al 40% de la producción dependiendo de la región y variedad evaluada.

Debido al impacto del estrés generado por la elevada radiación solar y temperatura en la productividad del cultivo de manzanas, se propuso esta temática. El objetivo fue estudiar la respuesta antioxidante, el desarrollo de pigmentos y cambios hormonales, que presentan los frutos de variedades de manzana con diferente susceptibilidad al daño por sol, cultivadas bajo estrés por alta radiación solar.

Los parámetros ambientales estudiados fueron radiación solar y temperatura. La temperatura se midió con diferentes tipos de sensores según el grado de precisión necesario (termómetros de mercurio, termómetro de infrarrojos láser y termocúplas tipo T). Los datos de radiación global se obtuvieron a través de la Red Agrometeorológica INTA Alto Valle y la radiación fotosintéticamente activa se midió con un ceptómetro. El impacto de los factores de estrés fue determinado sobre los frutos de cuatro variedades de manzanas (*Malus domestica* Borkh) rojas y dos verdes-amarillas, mediante técnicas bioquímicas (espectrofotometría, espectrometría de masa, HPLC, y cromatografía de gases), fisiológicas (conductimetría, fluorescencia de la clorofila, analizadores de gas infrarrojos, refractometría óptica, colorimetría) y mediciones de variables vegetativas y de calidad de frutos.

Los resultados indicaron que los tejidos de manzanas que están sometidos a estrés por elevada radiación y temperatura generaron síntomas de daño por sol, lo que afectó al 22% de los frutos la var. Red Delicious y al 34% en el caso de Granny Smith.

El estrés generado en los tejidos expuestos al sol produjo disminución del contenido relativo de agua y reducción de los procesos de disipación de energía. Este último aspecto quedó evidenciado por disminución de la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II y degradación de clorofilas. En las variedades rojas también se registró disminución en la concentración de antocianinas, las cuales actúan como filtro natural de la radiación solar. Por otra parte, se registró aumento del estrés oxidativo evidenciado por un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de peróxidos lipídicos de membranas celulares. En respuesta a la pérdida de homeostasis, los tejidos expuestos aumentaron la capacidad antioxidante, coincidiendo con una mayor concentración de polifenoles totales. En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reductasa (GR) incrementó en todas las variedades. La actividad de ascorbato peroxidasa (APX) solamente aumentó en las variedades rojas y se mantuvo constante en las verdes-amarillas. La respuesta de síntesis de hormonas frente a la exposición a elevada radiación solar fue diferente según la variedad estudiada. En las variedades rojas se registró un aumento significativo de poliaminas y etileno, mientras que no se observaron cambios en el contenido de ácido abscísico (ABA). Inversamente, las variedades verdes-amarillas reaccionaron incrementando el contenido de ABA, sin modificar la concentración de poliaminas ni la emisión de etileno.

Mediante el análisis de componentes principales se seleccionaron estadísticamente las variables más explicativas de la respuesta de los tejidos al estrés por elevada radiación y temperatura. Estas variables fueron introducidas en un análisis de conglomerados el que determinó que las variedades de manzanas rojas presentaron mayor capacidad de adaptación a la alta intensidad solar y temperatura. Esta característica se asoció a una mayor capacidad de sintetizar sustancias antioxidantes como polifenoles y antocianinas, presentar mayor actividad de las enzimas SOD y GR y a un incremento en la concentración de hormonas involucradas en los mecanismos para reducir el estrés.

La respuesta de los tejidos a los factores estresantes fue diferente cuando los mismos actuaron paulatinamente a lo largo del desarrollo de los frutos, o de modo

repentino en condiciones simuladas experimentalmente. Mientras que en el primer caso el fotosistema II permaneció activo, en el segundo caso la exposición brusca provocó una pérdida total de la integridad a los 50 minutos de tratamiento. En ese mismo lapso de tiempo, se observó la desactivación de la enzima catalasa. El estrés repentino redujo la actividad de GR, afectando la eliminación del peróxido de hidrógeno catalizado por APX en el ciclo ascorbato-glutati6n. La concentraci6n de poliaminas aument6 r6pidamente frente a la imposici6n de estr6s, pero no se observaron cambios significativos en los niveles de ABA y etileno en los 170 min que dur6 el estudio.

Se determin6 que la aplicaci6n ex6gena de ABA pre-cosecha no redujo la incidencia de da1o por sol, pero atenu6 el da1o oxidativo y aument6 la s6ntesis de antocianinas en las manzanas Red Delicious. Esto es un factor de aumento de calidad de frutos dado que la variedad Red Delicious tiene piel roja. No obstante, la aplicaci6n de ABA disminuy6 la fotos6ntesis afectando el 6rea foliar espec6fica de los 6rboles.

Los resultados obtenidos sugieren que ser6a relevante continuar investigando la interacci6n metab6lico-ambiental y la regulaci6n hormonal en procesos oxidativos generados por estr6s por elevada radiaci6n solar. Esto contribuir6a a incrementar el conocimiento necesario para lograr herramientas de aplicaci6n agron6mica que permitan mitigar el da1o por sol en frutos.

ABSTRACT

Apples are currently the fourth most widely consumed fruit in the world. Over time, apple production has been increasing in response to higher demand, driving in turn a steady increase in quality standards.

The environment-metabolism interaction determines fruit composition, anatomy, morphology and tissue development. Therefore, yield and quality are influenced by the prevailing climate in the region where the crop is grown. Most apple-growing areas of the world (including the northern valleys of Patagonia) experience high solar radiation and temperature. The stress generated by these environmental factors on the metabolism of fruit tissues induces an oxidative physiological disorder called 'sunburn'. This physiopathology occurs on the side of the fruit exposed to the sun and is considered one of the most important problems in apple orchards, reaching an incidence upwards of 40%, depending on the region and variety evaluated.

Given the considerable impact of high solar radiation and temperature on apple crop productivity, the objective of this thesis was to study the antioxidant response, pigment development, and hormonal changes in the fruit of apple varieties with different susceptibility to sunburn damage, grown under high solar radiation stress.

The environmental parameters studied were solar radiation and temperature. Temperature was measured with different types of sensors (mercury or laser infrared thermometers, type T thermocouples) according to the degree of precision required. Global radiation data were obtained through the Agrometeorological Network INTA Alto Valle and photosynthetically active radiation was measured with a ceptometer. The impact of stress factors was determined on the fruit of four red and two green-yellow apple varieties (*Malus domestica* Borkh) using biochemical (spectrophotometry, mass spectrometry, HPLC, gas chromatography) and physiological (conductimetry, chlorophyll fluorescence, infrared gas analysis, optical refractometry, colorimetry.) techniques, and through measurements of vegetative variables and fruit quality.

The studies carried out indicated that apple tissues subjected to high radiation and temperature stress generated symptoms of sunburn damage, which affected 22% of Red Delicious and 34% of Granny Smith fruit.

The stress generated in the tissues exposed to the sun produced a decrease in relative water content and a reduction in energy dissipation processes, as evidenced by a decrease in the maximum quantum efficiency of photosystem II and chlorophyll

degradation. The red varieties also showed a decrease in the concentration of anthocyanins, which are antioxidant substances that act as pigments and natural filter of solar radiation.

These conditions triggered oxidative stress in the fruit, with a significant increase in cell membrane lipid peroxidation. In response to the loss of homeostasis, the exposed tissues enhanced their antioxidant capacity, as reflected by increased total polyphenol concentrations. The analysis of antioxidant enzymes showed that the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) were increased in all fruit varieties, while that of ascorbate peroxidase (APX) was increased only in the red, but remained constant in the green-yellow, varieties. Fruit hormone synthesis responses to high solar radiation exposure differed according to the variety studied. Red varieties showed a significant increase in polyamines and ethylene, but no changes in abscisic acid (ABA) levels. Conversely, the green-yellow varieties reacted by increasing ABA contents, with polyamine concentration and ethylene emission remaining unaffected.

After statistical selection of the most explanatory variables of tissue response to high radiation and temperature stress, cluster analysis determined that red apple varieties showed a greater capacity to adapt to high solar intensity and temperature. This characteristic was associated with a greater capacity to synthesize antioxidant substances such as polyphenols and anthocyanins, higher antioxidant activity of both SOD and GR, and increased potential for synthesis of hormones involved in stress resistance mechanisms.

In apple tissue response to stressors were different, depending on whether these acted gradually throughout fruit development or were suddenly imposed experimentally. In the first case, photosystem II remained active; in the second, sudden stress exposure caused total loss of integrity after 50 minutes of treatment. Within this time frame, catalase (CAT) enzyme deactivation was observed. Sudden stress reduced also GR activity, affecting APX-catalyzed hydrogen peroxide removal through the ascorbate-glutathione cycle. The concentration of polyamines increased rapidly under sudden stress conditions, but no significant changes in ABA and ethylene levels were observed over the 170 min duration of the study.

Finally, we observed that pre-harvest ABA application did not reduce sunburn incidence, but it attenuated oxidative damage and increased anthocyanin synthesis in Red Delicious apples, a quality-enhancing factor in this red-skin variety. However, ABA

application also led to decreased photosynthesis, affecting the specific leaf area of the trees. The results obtained in this thesis suggest that it would be relevant to continue investigating the impact of metabolic-environmental interactions and hormonal regulation on oxidative processes generated by high solar radiation stress, with the goal of designing more effective approaches to mitigate sun damage in fruits.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La manzana es la fruta que ocupa el cuarto lugar en volumen consumido anualmente, luego del tomate, la banana y la sandía (Mendoza, 2021). La producción y consumo de manzana no ha dejado de crecer en los últimos años. En el año 2018 la producción mundial registró un volumen de 77 millones de toneladas (Dansa, 2018).

Debido a una evolución sociocultural mundial, en la actualidad, los consumidores de manzanas tienden a preferir frutos que presenten elevados estándares de calidad (Musacchi y Serra, 2018). Dentro de los factores ambientales en los que se desarrolla el cultivo, el clima imperante afecta los atributos del fruto. En las regiones del mundo en las que se registran elevadas temperaturas y radiación solar los frutos frecuentemente presentan un desorden fisiológico denominado daño por sol, provocando pérdida de calidad y problemas para la aceptación del mercado (Racsco y Schrader, 2012). Esta afección es considerada uno de los problemas más importantes en huertos de manzano, llegando a alcanzar incidencias de más de un 40% dependiendo de la región y de la variedad (Yuri, 2001).

En condiciones de campo se observan situaciones en las que la radiación incidente, UV-B, UV-A, infrarrojas e inclusive las del espectro visible, alcanzan niveles que producen daño en los tejidos vegetales. Cuando la energía radiante incidente supera la capacidad de los mecanismos de disipación se produce un exceso de energía de excitación y calentamiento del órgano que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), cuya acumulación genera una situación desfavorable conocida como “estrés oxidativo” (Foyer y Harbinson, 1994; Müller y col., 2001). En condiciones normales los organismos aeróbicos están continuamente formando EROs, pero cuando se imponen condiciones que favorecen el estrés oxidativo se establece un desbalance que resulta en un exceso de producción de estas especies causando destrucción de lípidos, pigmentos, proteínas y ácidos nucleicos (Buchanan y col., 2015; Demidchik, 2015) generando en los tejidos síntomas visibles como el daño por sol (Racsco y Schrader, 2012).

Los organismos vivientes han desarrollado mecanismos protectores que hasta determinado límite son capaces de minimizar los efectos de las EROs. Estos procesos involucran generación de componentes antioxidantes de tipo enzimático y no enzimáticos que regulan la presencia de EROs en las células (Bowler y col., 1992; Foyer y Shigeoka, 2011). El efecto del estrés abiótico sobre los distintos mecanismos

antioxidantes ha sido particularmente estudiado en plantas cultivadas (Pastori y Foyer, 2002; Gill y Tuteja, 2010; You y Chan, 2015). En vegetales sometidos a estrés oxidativo, sumado a la activación del sistema antioxidante, interviene una red coordinada de hormonas como las poliaminas, el ácido abscísico (ABA) y el etileno que modulan las rutas asociadas a las respuestas antioxidantes (Mittler y col., 2011; Suzuki y col., 2012; Bartoli y col., 2013).

En los valles del norte de la Patagonia, se produce el 80% de la manzana argentina, entre el 24 al 50 % de los frutos, dependiendo de la variedad, no se pueden comercializar debido a afecciones debidas a elevada radiación solar y temperatura, ocasionando una importante pérdida económica (Colavita, 2008). Las nuevas variedades de frutos de manzanas requeridas por el mercado y las prácticas culturales que acompañan a las pautas de reconversión frutícola han contribuido a que este problema se incremente (Yuri, 2001; Raffo Benegas y Rodriguez, 2007; Lal y Sahu, 2017). Por otra parte las predicciones mundiales respecto al clima indican un aumento de temperatura de 3-5°C para los próximos 50-100 años, en un contexto de presión creciente sobre la productividad alimentaria (Atkinson y Urwin, 2012).

En los últimos años, trabajando en el equipo de investigación en fisiología vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Comahue y el instituto CITAAC de CONICET hemos comenzado con estudios respecto al sistema antioxidante en manzana. Por otra parte, son incipientes los conocimientos a nivel mundial sobre la posible participación de hormonas en mecanismos biológicos relacionados con la fisiopatía de daño por sol. Por lo tanto, quedan todavía aspectos para profundizar en los mecanismos antioxidantes y avanzar en dilucidar la intervención de hormonas como una respuesta de los frutos de manzanas sometidos a condiciones de estrés por elevada radiación solar y temperatura.

1. El cultivo de la manzana en Argentina

1.1. Relevancia económica

La producción anual de manzana es de aproximadamente 563.000 tn representa el 15% del total de la producción nacional de fruta (Dansa, 2018). Los principales productores mundiales de manzana se encuentran en el hemisferio norte, lo que posiciona a Argentina en situación relevante debido a su carácter de productor en

contra-estación. El volumen exportado durante el año 2019 fue cercano a 100.000 tn (Anuario Estadístico SENASA, 2019).

La cadena de valor de manzana comprende la producción primaria, el empaque, la conservación en frío para consumo en fresco y la industrialización. La fruta de menor calidad o descarte se utiliza para la elaboración de jugo, sidra, deshidratado y conserva. La producción de manzana para exportación en fresco es el 25%, mientras que el mercado interno consume el 30% (Colamarino, 2010), el consumo anual por habitante es de 6 a 7,7 kg. El resto de la producción (41%) se destina para industrialización, volumen que supera el nivel promedio en los principales países productores del hemisferio sur (25%, según datos de USDA). El alto porcentaje de fruta destinada a industria refleja problemas por ineficiencia en la producción tanto en cantidad como calidad y mermas en la rentabilidad de la actividad frutícola nacional, debido a que el precio de la fruta destinada a la industria es considerablemente menor que la fruta para consumo en fresco (Storti, 2016).

La fruticultura es la principal actividad agropecuaria de la región de los valles del norte patagónico, donde tiene una larga tradición (sus inicios se remontan a principios del siglo XX), contribuye significativamente a la generación de valor agregado y una elevada absorción de mano de obra (Artola, 2019). Según la Cámara Argentina de Fruticultores Integrados existen 4.000 productores de frutos de pepita, 260 establecimientos de acondicionamiento y empaque, 220 establecimientos frigoríficos, y 11 empresas que elaboran jugo concentrado. El complejo genera 50.000 puestos de trabajo directos y 15.000 indirectos y tiene gran relevancia en la estructura socioeconómica de las provincias de Neuquén y Río Negro (Cámara Argentina de Fruticultores Integrados, 2020).

1.2. Características geográficas y agroclimáticas de las regiones productora

El 90% de la producción de manzana se concentra en las regiones del Alto Valle de Río Negro y Neuquén y una pequeña proporción se cultiva en el Valle Medio de Río Negro (Storti, 2016). La primera región constituye una unidad económico-productiva que representa 50.000 hectáreas, 85% en Río Negro y 15% en Neuquén (Figura 1). Orográficamente, se posiciona en el valle formado por la confluencia de los ríos Neuquén y Limay que dan origen al río Negro. Este valle en forma de Y, se encuentra limitado en ambos lados por barrancas de formación sedimentaria y se

extiende a lo largo de 65 km junto al río Neuquén, 50 km a lo largo del Limay y 120 km aguas abajo conteniendo el curso del Río Negro (Toranzo, 2016).

Los suelos son típicos de desierto con baja meteorización y de origen coluvial. Presentan texturas no muy pesadas, entre arenosos y franco limoso, escasos en materia orgánica, con velocidad de infiltración media a alta y con un perfil profundo, sin gran desarrollo edáfico (Toranzo, 2016).

La provisión de agua a las plantaciones es por intervención del hombre mediante un sistema integral de riego. La obra principal tiene cabecera sobre el río Neuquén en el dique Ingeniero Ballester inaugurado en 1916. Desde el dique parte un canal principal que recorre 130 km de largo, que atraviesa las provincias de Neuquén y Río Negro y distribuye el agua mediante una extensa red de canales a nivel primario, secundario y terciario. El sistema de riego se encuentra en permanente funcionamiento, excepto en los meses de invierno (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015).

La región del Alto Valle se caracteriza por tener una temperatura media anual de 15°C. En enero la temperatura máxima media es de 31,1°C. Durante el mes de julio la temperatura media es de 8,6°C con una máxima media de 13,1°C. La región tiene una marcada amplitud térmica propia de su carácter continental. La precipitación media anual es de 197,7 mm (Rodríguez y Muñoz, 2006). Los vientos predominantes son de los cuadrantes oeste y sudoeste, con mayor frecuencia en primavera-verano. Su intensidad obliga a la utilización de cortinas rompevientos, para la cual se utilizan tradicionalmente diferentes especies de álamos (Toranzo, 2016).

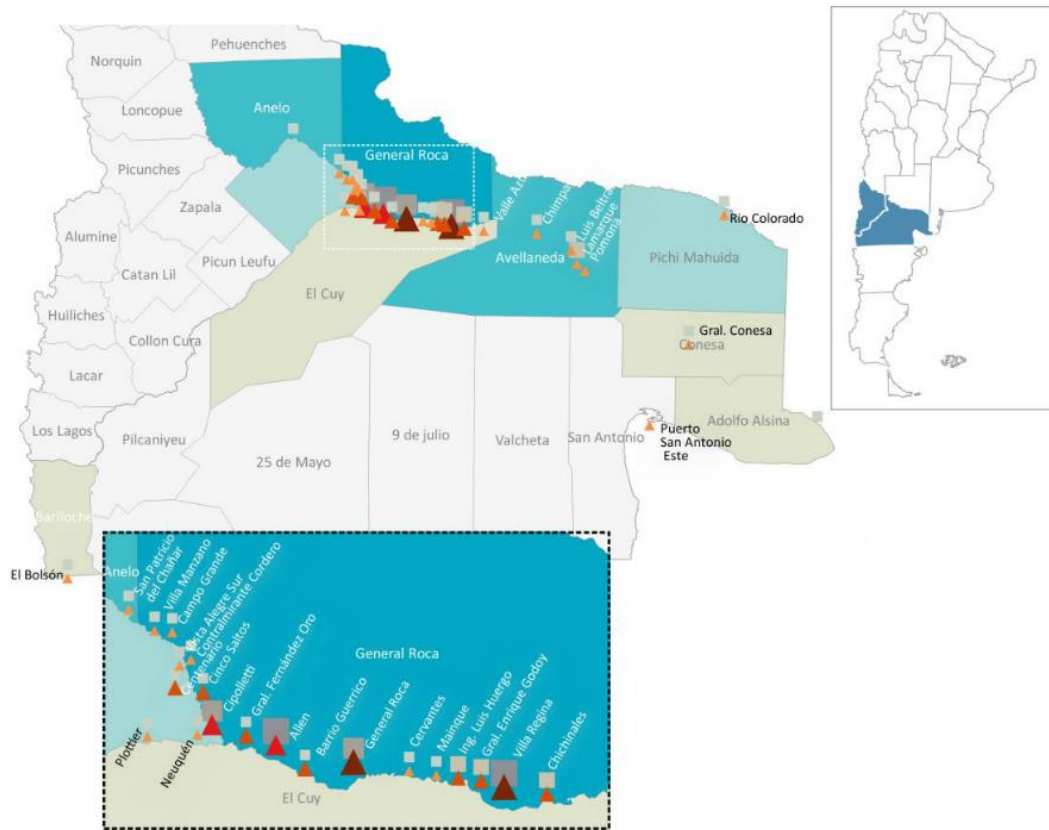


Figura 1. Zonas productoras de frutales de pepita en Rio Negro y Neuquén. (Extraído de Storti, 2016).

La región se caracteriza por tener altos valores de radiación global alcanzando máximos de 1260 Wm^{-2} . El fotoperíodo tiene su valor máximo en diciembre con 15,9 h y disminuye paulatinamente hasta junio, con un valor de 10,4 h (Rodríguez y Muñoz, 2006).

1.3. Características generales del fruto y de diferentes variedades de manzana

El fruto de manzana se clasifica como un tipo de fruta especial, llamada "pomo". Este tipo de fruto tiene forma de globos elipsoides-obovoides y sus tamaños varían por sobre los 5 cm de diámetro. El color depende del cultivar y puede ser rojo, verde, amarillo o bicolor, mostrando rayas o rubores rojos sobre un fondo amarillo o verde. La porción comestible de la fruta deriva del engrosamiento del receptáculo soldado al ovario ínfero (Hypanthium), no del ovario como en la mayoría de las otras frutas. En las frutas de manzana, las semillas son relativamente pequeñas, marrones y

desarrolladas en 5 cavidades con dos semillas cada una. Dependiendo de los cultivares, las manzanas alcanzan la madurez en 80-180 días después de la floración (Jackson, 2003).

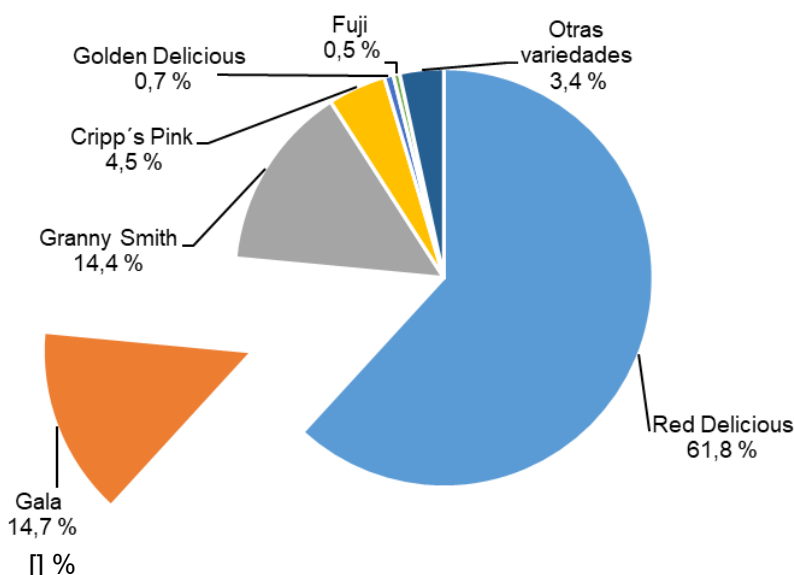


Figura 2. Superficie implantada de manzana por variedad en el norte de la Patagonia (SENASA, 2015).

Las variedades de manzana domesticadas derivan de *Malus domestica* Borkh. o *Malus pumila* Mill. (Zohary y col., 2012). Existe gran variedad de manzanas cultivadas con fines comerciales. En los valles del norte de la Patagonia cultivadas son: Red Delicious y sus clones, seguida por Gala y sus clones, Granny Smith, Cripp's Pink, Golden Delicious, Fuji y otros cultivares de menor relevancia (Benítez, 2001; Dansa, 2018) (Figura 2).

Las características de los frutos de las diferentes variedades quedan detalladas en la Figura 3, que presenta las descripciones informadas por la Cámara Argentina de Fruticultores Integrados.

Manzana		
VARIEDAD	Características Generales	
	Top Red	<i>El tamaño de esta variedad es mediano y su sabor es dulce y suave. Tiene una piel rojiza con estrias y brillante.</i>
	Granny Smith	<i>Las Granny Smith son de tamaño mediano, y su sabor es ácido (amargo), pero crujientes y jugosas. Su piel es de color verde luminoso y ligeramente moteado.</i>
	Fuji	<i>La Fuji tiene pulpa crujiente y jugosa, con sabor muy dulce. Su piel varía de amarillo-verde con líneas rojas a un color rojo intenso y son de tamaño grande.</i>
	Gala	<i>Esta variedad se caracteriza por tener un tamaño mediano y sabor dulce. Su forma es de corazón y su piel es roja con fondo amarillo-anaranjado.</i>
	Red Delicious	<i>Esta es una de las variedades conocidas por su tamaño mediano a grande, y de sabor moderado, dulce y succulento. Su piel es de color rojo brillante (rubi).</i>
	Golden Delicious	<i>Crece hasta alcanzar un tamaño mediano a grande. Tienen sabor dulce muy refrescante. Su piel es amarilla verdosa con pequeños puntos oscuros que se llaman lenticelas.</i>
	Braeburn	<i>La variedad Braeburn son famosas por ser crujientes y aromáticas, con un sabor dulce y agrio, de tamaño mediano. Su piel es de un verde-oro con secciones rojas a un color rojo sólido.</i>
	Cripps Pink	<i>El tamaño de esta variedad varía de mediano a grande, con un sabor ácido penetrante y dulce. Su color es rosado intenso, con fondo verde claro.</i>

Figura 3. Características de los frutos de las principales variedades de manzana cultivadas en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Cámara Argentina de Fruticultores Integrados, 2020).

2. Fisiopatía daño por sol en manzana

Parafraseando a Curry y Arey (2010) la manzana doméstica podría considerarse una fruta "extrema" dado que tolera temperaturas superficiales que varían de -2 °C a principios de primavera hasta 50 °C en el calor del verano, y nuevamente a -0,5 °C durante almacenamiento refrigerado hasta por 12 meses. Si bien este fruto tiene alta

capacidad de adaptarse a condiciones extremas, esto implica en ciertos casos, la aparición de síntomas visuales que afectan su apariencia y calidad.

Frecuentemente, en la cara expuesta de los frutos que se desarrollan bajo condiciones de estrés por elevada radiación solar y altas temperaturas, se observa un desorden fisiológico denominado “daño por sol”, “asoleado”, o “golpe de sol”. Estos términos están asociados a su equivalente en inglés “sunburn” (Contreras y col., 2008; Racsko y Schrader, 2012). En la presente tesis se utilizará el término “daño por sol” (Figura 4).



Figura 4. Fruto de manzana var. Granny Smith con síntoma de daño por sol.

El daño en frutos es inicialmente es producido a nivel epidérmico y sub-epidérmico, con desmejoramiento de su apariencia. En la zona afectada luego se observan cambios en la madurez con posterior ablandamiento y final putrefacción, disminuyendo la posibilidad de almacenaje de los mismos (Singh y col., 2019).

2.1. Incidencia del asoleado en la producción frutícola

Las pérdidas de producción de manzanas por daño por sol son elevadas en las regiones frutícolas del mundo caracterizadas climáticamente por intensa radiación solar y altas temperaturas. Informes de Estados Unidos, Sudáfrica, Australia y Chile

cuantifican disminuciones de productividad de manzanas ocasionadas por daño por sol en valores que van desde el 10 al 50%, dependiendo de la variedad, edad de la planta y sistema de conducción (Schrader y col., 2004; Gindaba y Wand, 2005; Racsco y Schrader, 2012). Situaciones extremas como un evento de ola de calor en 2009 en el sureste de Australia resultó en pérdidas de rendimiento que llegó al 70% de la cosecha (Thomson y col., 2014). En el Alto Valle de Río Negro, trabajos realizados en la entrada de planta de empaque, según la variedad determinaron una incidencia de daño por sol en frutos de manzana de 25-55%, siendo la var. Fuji la más afectada (Colavita, 2008). Informes técnicos internos generados por empresas exportadoras y empacadoras de la región confirman que la magnitud de las pérdidas es del orden citado. Los valores presentados determinan una sustancial merma en la cantidad y calidad de fruta exportable y comercializable lo que implica una importante pérdida de ingresos para la región.

2.2. Desarrollo de los síntomas de daño por sol

En la cara expuesta al sol de los frutos que sufren daño por sol se presenta inicialmente una mancha blanca como producto de la fotooxidación de los pigmentos. La exposición a temperaturas superiores a los 40 °C genera, como primer síntoma, la decoloración en los tejidos epidérmicos de los frutos con pérdida de pigmentos, inclusive clorofila (Hodges, 2003). De esta manera, la zona afectada, queda menos protegida a las altas radiaciones. Si la exposición continúa, el síntoma progresa en una mancha bronceada en la región dañada hasta llegar a un color marrón oscuro que actúa como cuerpo negro elevando aún más la temperatura de esa zona del fruto (Figura 4). Estudios anatómicos e histoquímicos demuestran que las células epidérmicas comienzan rápidamente a comprimirse, el contenido celular colapsa, la cutícula se muestra partida y discontinua y se desarrolla un proceso de deshidratación (Preston y Johnson, 2007; Torres y col., 2013). Si la agresión prosigue, se observa material denso en las células subepidérmicas, posiblemente de origen fenólico, adelgazamiento de las paredes celulares, y los espacios intercelulares se ven llenos de sustancias pécticas. Los cambios en la coloración denotan severos daños a nivel celular, que culminan con la muerte de los tejidos perjudicados (Polito y col., 2002). El estadio final de un fruto asoleado es una gran zona necrótica, tanto a nivel de la epidermis como de la pulpa, y generalmente el fruto así dañado termina por caer del árbol. No obstante, los frutos que presentan estadios iniciales de daño por sol son

cosechados y llevados a cámaras refrigeradas de conservación. En estos frutos, se observa que luego de varias semanas aparecen manchas marrones debido a la aceleración de la senescencia de la zona lesionada. Esta afección se conoce como “escaldadura de sol” y se parece a la fisiopatía de postcosecha denominado “escaldadura superficial” pero a diferencia de ésta no se controla con la aplicación de antioxidantes como difenilamina (Mitcham, 2002).

2.3. Tipos de daño por sol en frutos

A principio de la década del 2000 se habían identificado dos tipos de daño por sol en frutos de manzana: uno relacionado con la necrosis de los tejidos y otro con síntomas de bronceado de la piel (Schrader y col., 2001). Luego, Felicetti y Schrader (2008a) describieron el daño por sol de tipo fotooxidativo (Figura 5).



Figura 5. Clasificación de los diferentes tipos de daño por sol. Adaptado de Schrader y col., 2008.

El daño por sol necrótico se manifiesta como una mancha marrón oscura o negra en la superficie de la cara expuesta al sol de la manzana. Este síntoma visual puede aparecer entre 1-4 días después de la exposición, momento en el cual las células del sector afectado colapsan (Figura 5). Por lo tanto, se registra daños en el plasmalema, reflejado en el aumento de la pérdida de electrolitos, lo que determina la muerte de las células (Schrader y col., 2001). El daño por sol necrótico ocurre cuando la temperatura de la superficie del fruto alcanza 52 ± 1 °C, durante al menos 10 min, y ocasiona muerte celular inducida por el calor (Figura 6). Este tipo de daño por sol

ocurre naturalmente a la luz del sol, pero puede ser inducido en laboratorio bajo condiciones de oscuridad sometiendo los frutos a una temperatura superficial de 52 ± 1 °C (Schrader y col., 2001).

En el daño por sol de tipo bronceado o amarronamiento, dependiendo de la intensidad del síntoma, se observa una mancha amarilla-marrón de forma circular (Racsko and Schrader, 2012) (Figura 5). La coloración es superficial y no penetra en el mesocarpio de la fruta. Desde el punto de vista de la integridad celular, se comprobó que es un evento subletal (Schrader y col., 2001). El daño por sol de tipo bronceado o amarronamiento ocurre cuando la temperatura superficial del fruto se encuentra entre 46-49 °C. Además del calor, la luz visible es necesaria para el desarrollo de los síntomas y no se produce cuando las manzanas son calentadas en la oscuridad (Schrader y col., 2001) (Figura 6).

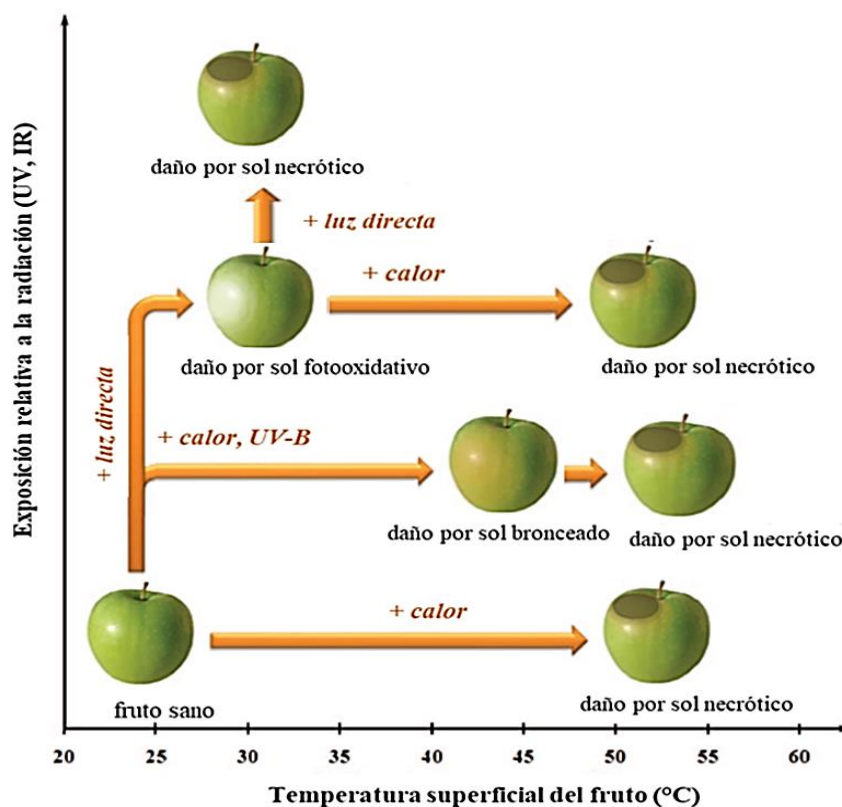


Figura 6. Condiciones para la formación de los tres tipos de daño por sol en frutos de manzana. Adaptado de Racsko y Schrader (2012).

El daño fotooxidativo se ha descrito como el resultado de la exposición repentina y directa a la luz de un fruto que estaba en la sombra. No es dependiente de una temperatura superficial o de UV-B. Los síntomas iniciales, de este tipo de daño por sol pueden desarrollarse con temperatura superficial por debajo de 31°C (temperatura del aire por debajo de 18°C). Se detecta como una zona blanca en la superficie de la fruta dentro de las 24 h de exposición al sol (Figura 5). Estudios de integridad de membrana y de microscopía electrónica indican que la muerte celular se ocasiona con foto-despigmentación. En frutos no aclimatados que estaban protegidos de la radiación UV-A y UV-B, el daño por sol fotooxidativo y necrótico ocurre igual. La radiación infrarroja (>700 nm) fue descartada como un factor de inducción. Se sugiere que la radiación visible y la producción de especies reactivas de oxígeno son factores de inducción de daño por sol fotooxidativo (Felicetti y Schrader, 2008a).

2.4. Factores abióticos que promueven el daño por sol en frutos

Numerosos estudios se han focalizado en establecer los factores predisponentes al daño por sol, así radiación solar elevada y temperatura son los factores directos responsables de esta fisiopatía en el fruto de manzana (Racsco y Schrader, 2012; Naschitz y col., 2015; Muñoz y Munné-Bosch, 2018; Morales-Quintana y col., 2020). Además, existen factores indirectos que pueden interactuar e influir en la aparición y magnitud de los síntomas. Entre ellos se destacan la susceptibilidad de cada cultivar, el estado de desarrollo y ubicación del fruto, la forma del árbol y el sistema de conducción, la orientación de las filas, y las condiciones hídricas y climáticas como la humedad relativa y el viento (Wünsche y col., 2004; Lal y Sahu, 2017; Musacchi y Serra, 2018).

El daño por sol es prevalente en plantaciones en alta densidad con plantas pequeñas o con ramificaciones abiertas, lo que provoca una mayor exposición de la fruta y una gran entrada de luz en el interior de la planta. Los frutales con portainjertos enanizantes generan poco follaje en la planta y por ende la exposición excesiva de frutas a la luz, lo que provoca que sean más vulnerables al daño por sol. En el hemisferio sur, el mayor porcentaje de fruta con daño por sol se encuentra en el cuadrante norte y oeste de la canopia (Racsco y Schrader, 2012).

Los factores directamente relacionados con el desarrollo de daño por sol (elevada radiación solar y temperatura) pueden ser incrementados por los aspectos

indirectos que promueven condiciones de estrés oxidativo en los órganos expuestos del vegetal.

3. Estrés oxidativo en vegetales

Los organismos aeróbicos producen EROs que se originan durante procesos metabólicos que involucran mecanismos de oxido-reducción, tales como la fotosíntesis y la respiración. En condiciones óptimas ambientales las EROs son rápidamente metabolizadas y no causan daño celular (Asada y col., 2000; Foyer y Shigeoka, 2011). Sin embargo, la reducción del oxígeno no está exenta de riesgos. El oxígeno molecular es un aceptor final de electrones idóneo porque su elevada afinidad hacia ellos proporciona una gran fuerza directriz termodinámica (Buchanan y col., 2015). La transferencia de cuatro electrones a la molécula de oxígeno da lugar a productos inocuos (dos moléculas de agua), pero su reducción parcial origina compuestos peligrosos. Concretamente, la transferencia de un único electrón al oxígeno genera el anión superóxido y la transferencia de dos electrones origina peróxido (Mittler, 2002a). Estas especies y, particularmente sus productos de reacción, son dañinos para las biomoléculas celulares. Se ha estimado que aproximadamente el 1% de O₂ consumido por las plantas es transformado en EROs (Sharma y col., 2012).

El término "estrés oxidativo" hace referencia a un desequilibrio entre la promoción y la remoción de EROs produciendo como consecuencia daño en la maquinaria bioquímica de la célula (Azcón-Bieto y Talón, 2003). En efecto, la producción de EROs en situaciones de estrés aumenta notablemente ocasionando que los sistemas bioquímicos que usualmente detoxifican y reparan el deterioro de los componentes celulares resulten a su vez dañados. Surge entonces un desbalance en favor de la producción de EROs que atacan y destruyen lípidos, pigmentos, proteínas e inclusive ácidos nucleicos (Suzuki y Mittler, 2006).

Existe un amplio espectro de factores causantes de estrés oxidativo en vegetales, tanto de origen biótico (patógenos y senescencia) como abiótico (temperaturas extremas, elevada radiación solar, polución, herbicidas, anegamiento, sequía, salinidad y frío entre otros) (Suzuki y col., 2014).

3.1. Especies reactivas de oxígeno

Las EROs son formas parcialmente reducidas de oxígeno diatómico atmosférico (O_2). Estos compuestos son formados normalmente en los organismos aeróbicos durante las reacciones redox, tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos (Buchanan y col., 2015) (Tabla 1).

Tabla 1. Estructura molecular y fuente de producción de las especies reactivas de oxígeno. Extraído de Buchanan y col. (2015).

Compuesto	Notación Shorthand	Fuente
Oxígeno molecular (estado basal triplete)	$O_2; {}^3\Sigma$	Manera más común de oxígeno gaseoso
Oxígeno singulete (primer estado de excitación)	${}^1O_2; {}^1\Delta$	Radiación UV, fotoinhibición, reacción de transferencia de e^- en el fotosistema II (cloroplastos)
Anión superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Reacción de transferencia de e^- en mitocondrias, reacción de Mehler en cloroplastos (reducción de O_2 por el centro hierro-sulfuroso F_x del fotosistema I), fotorespiración glioxisomal, actividad peroxisomal, membrana plasmática, oxidación de paraquat, fijación de nitrógeno, defensa contra patógenos, reacción del O_3 y OH^- en el apoplasto.
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Fotorespiración, β -oxidación, descomposición de $O_2^{\bullet-}$ inducida por protones, defensa contra patógenos.
Radical hidroxilo	HO^\bullet	Descomposición de O_3 en presencia de protones en el apoplasto, defensa contra patógenos.
Radical perhidroxilo	HO_2^\bullet	Reacción del O_3 y OH^- en el apoplasto
Ozono	O_3	Descargas eléctricas y radiación UV en la estratosfera, reacciones que involucran combustión de productos fósiles, radiación UV en la troposfera.

El anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) se forma cuando el O_2 atrapa un electrón adicional; éste es un intermediario de un gran número de reacciones bioquímicas donde participan enzimas del tipo oxidasas, tales como xantina oxidasa y aquellas que utilizan la citocromo P450 oxidasa. Normalmente el $O_2^{\bullet-}$ es de corta vida y se convierte en H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa-SOD (Bowler y col., 1992). El H_2O_2 puede atravesar las membranas biológicas y aunque es relativamente poco reactivo, a partir de éste y en presencia de metales de transición reducidos, genera radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}) y de radical hidroxilo (HO^{\bullet}), este último, es uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza (Bowler y col., 1992; Mittler, 2002; Macedo-Márquez, 2012). Por lo tanto, las distintas EROs resultan de la excitación del oxígeno formando oxígeno singulete (1O_2) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar, respectivamente $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} y HO_2^{\bullet} (Benezer-benezer y col., 2008) (Figura 7).

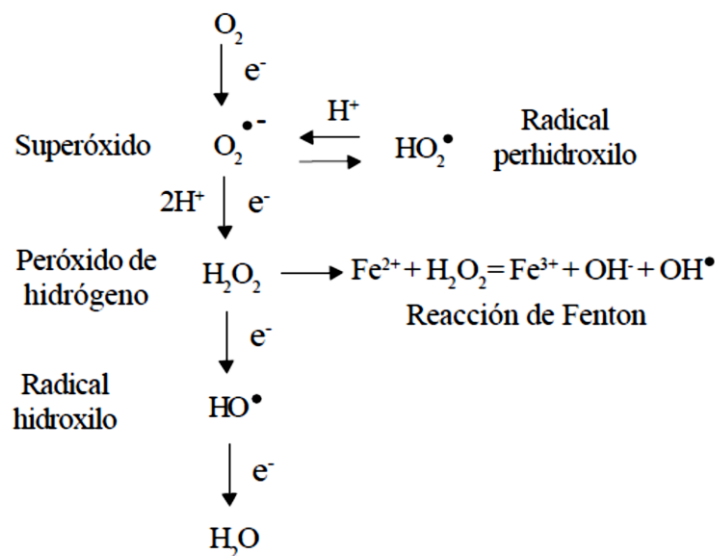


Figura 7. Química de la reducción secuencial del oxígeno molecular y generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Benezer-benezer y col., 2008).

Como ya se dijo anteriormente, aún en condiciones óptimas para el desarrollo de la planta, se generan EROs como consecuencia de reacciones del metabolismo celular relacionadas con el transporte de electrones (fotosíntesis, respiración, fotorespiración, β -oxidación de ácidos grasos). En la fotosíntesis por ejemplo, la reducción del oxígeno por el PS I (reacción de Mehler) da como resultado la formación de radicales superóxido (Toivonen y Hodges, 2011). Bajo condiciones normales el

ritmo de producción de EROs en las células es baja ($240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^{\bullet-}$) y una concentración de $0,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 en el cloroplasto es considerada como un nivel estable y no tóxico. En situaciones de estrés que rompen la homeostasis celular, el ritmo de formación de EROs en la célula aumenta hasta $720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^{\bullet-}$ y la concentración de H_2O_2 en el cloroplasto aumenta hasta $15 \mu\text{M}$ (Mittler, 2002a).

3.2. Acción de las EROs sobre las biomoléculas

Las EROs juegan un papel dual en el metabolismo dependiendo de su concentración en la planta (Sharma y col., 2012). En bajas concentraciones actúan como mensajeros secundarios, señalizando la activación de diferentes procesos de respuesta a condiciones de estrés. Por lo tanto la modulación fina de bajos niveles de EROs puede ser usada por la célula para monitorear el estado interno de estrés (Mittler y col., 2011; Sharma y col., 2012; Suzuki y col., 2012). En cambio, en elevadas concentraciones, las EROs causan daño en proteínas, lípidos, carbohidratos, ADN y pueden finalmente producir la muerte celular (Muñoz y Munné-Bosch, 2018). El balance de EROs en una célula estará determinado por el equilibrio entre la producción y la remoción de éstas y puede cambiar drásticamente dependiendo de las condiciones fisiológicas de la planta y de la integración de diferentes estímulos ambientales, metabólicos y bioquímicos (Suzuki y Mittler, 2006).

Si no se eliminan eficientemente, las EROs producen modificaciones estructurales de proteínas, activando y acelerando la degradación proteolítica, con lo que se altera el metabolismo celular. Pueden ocurrir varias formas de oxidación de proteínas que incluyen la formación de carbonilos proteicos, el ataque de ciertos aminoácidos (por ejemplo, la formación de 2-oxohistidina a partir de histidina; sulfóxido de metionina a partir de metionina) y la oxidación de los grupos sulfhidrilos (Buchanan y col., 2015).

El efecto de los radicales libres en el ADN, se debe a la oxidación y modificación química de las bases nitrogenadas. Esto puede originar mutaciones puntuales que, si no son corregidas y corresponden a regiones codificantes, pueden conducir a estructuras de proteínas modificadas ocasionando disfunción enzimática.

Los lípidos vegetales incluyen una amplia gama de compuestos, tales como ácidos grasos, fosfolípidos, ceras y fitoesteroles en base a terpenos. De todos ellos los fosfolípidos son los componentes mayoritarios de las membranas biológicas y los

que regulan la fluidez de las membranas. A su vez, los ácidos grasos insaturados que forman parte de la composición de los fosfolípidos, son susceptibles a los ataques de radicales libres hidroxilos, generando peróxidos de lípidos. La peroxidación de los ácidos grasos insaturados altera su estructura y función, haciéndolos más hidrofílicos, dañando así el comportamiento normal de la membrana, por ejemplo, aumentando su permeabilidad. Los peróxidos de ácidos grasos y sus metabolitos son poderosos inhibidores de algunas enzimas, por lo cual los procesos dentro del plasmalema y dentro de la célula pueden ser modificados (Gill y Tuteja, 2010). En condiciones de estrés oxidativo, cuando el sistema de defensas y reparación resulta insuficiente, se produce dentro de la membrana celular una propagación en cadena de radicales libres causada por la peroxidación de lípidos. Los radicales libres de origen lipídico entran en contacto con otras moléculas de ácidos grasos poliinsaturados generando tanto como 10 a 100 nuevos hidroperóxidos de lípidos por cada reacción. Durante la reacción en cadena, el radical lipídico hidroperóxido extrae un átomo de hidrógeno y se convierte en un peróxido lipídico que, como producto de su catabolismo, produce una molécula de malondialdehído (Hodges y col., 1999). El proceso global de peroxidación lipídica incluye tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Figura 8). El inicio de la peroxidación lipídica, en una membrana comienza con la sustracción de un átomo de hidrógeno de un doble enlace de un ácido graso poliinsaturado, principalmente por HO•. En un ambiente aeróbico, el oxígeno se puede añadir al ácido graso en el radical para dar radicales hidroperóxidos. Una vez iniciado, se produce una reacción en cadena de peroxidación mediante la extracción de un átomo de hidrógeno a partir de cadenas adyacentes laterales de ácidos grasos insaturados. El hidroperóxido lipídico resultante puede descomponerse fácilmente en varias especies reactivas que incluyen MDA, alcanos y alcoholes. Un evento de iniciación individual tiene por lo tanto el potencial de generar múltiples moléculas de peróxido por una reacción en cadena. El proceso finaliza cuando los radicales peroxilo y peróxidos lipídicos se reducen totalmente reaccionando entre sí (Shewfelt y Purvis, 1995; Sharma y col., 2012).

Se ha determinado que la peroxidación de fosfolípidos es el primer desorden observado en plantas que sufren estrés oxidativo. Así se produce en hojas una primera respuesta generando aumento en la permeabilidad de electrolitos, seguido por una caída en la fotosíntesis por destrucción de la estructura tilacoidal de los cloroplastos (Hodges y col., 2001). El aumento de pérdida de electrolitos, que proporciona una

estimación del grado de permeabilidad de la membrana, implica disminución en las propiedades de transporte del plasmalema, lo cual afecta tanto la composición del protoplasma como asimismo la del entorno celular. La ruptura de la integridad de la membrana celular es seguida por la ruptura de organelas tales como mitocondrias y cloroplastos (Racsco y Schrader, 2012).

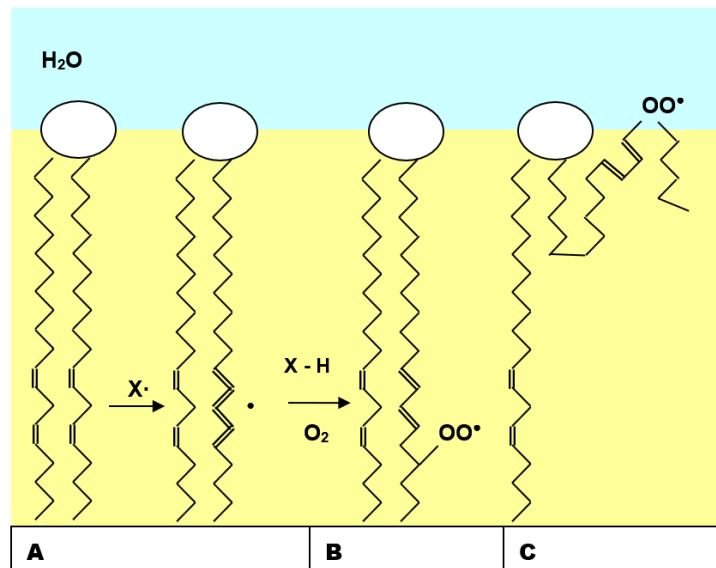


Figura 8. Peroxidación de lípidos de membrana. Se representa una sola fase de la bicapa lipídica. A) Iniciación del proceso de peroxidación por un radical oxidativo, X[•], a través de una sustracción de un hidrógeno bis-alílico, por eso forma un radical pentadienyl. B) Oxigenación para formar un radical peroxilo y un dieno conjugado. C) Movilización del radical peroxilo hacia a la interfase acuosa de la membrana. Adaptado de (Shewfelt y Purvis, 1995).

3.3. Sistemas de defensa antioxidante

El sistema de defensa frente a estrés oxidativo está constituido por componentes de tipo enzimático y metabolitos antioxidantes que protegen a las moléculas biológicas.

Las enzimas antioxidantes que intervienen en la respuesta de los vegetales a estrés oxidativo son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR). Estas enzimas no están distribuidas

uniformemente dentro de la célula y su contenido varía en los distintos compartimentos celulares (Tabla 2).

Tabla 2. Localización subcelular de las enzimas antioxidantes.

Enzima antioxidante	Abreviatura	Localización subcelular
Ascorbato peroxidasa	APX	Citosol, estroma de plastidios, membrana de plastidios, nódulos de raíces
Catalasas	CAT	Citosol, peroxisomas, glioxisomas
Dehidroascorbato reductasa	DAR	Citosol, estroma de plastidios, nódulos de raíces
Glutación reductasa	GR	Citosol, mitocondrias, estroma de plastidios, nódulos de raíces
Monodehidroascorbato reductasa	MDAR	Estroma de plastidios, nódulos de raíces
Superóxido dismutasa	Cu/Zn SOD	Citosol, peroxisomas, plastidios, nódulos de raíces
	Mn SOD	Mitocondrias
	Fe SOD	Plastidios

Los procesos enzimáticos de protección al estrés oxidativo se dan en primera instancia por la acción de SOD, presente en casi todos los compartimentos celulares, por el cual los aniones $O_2^{\bullet-}$ se eliminan con producción de H_2O_2 . Si bien el H_2O_2 en bajas concentraciones actúa como señalizador de estrés oxidativo, su acumulación en los tejidos tiene efectos tóxicos. La eliminación de H_2O_2 se produce por activación de vías metabólicas en las cuales participan otras enzimas como CAT y APX (Lu y col., 2014) (Figura 9). En los cloroplastos se ha encontrado operativa una vía que obtiene la energía para la reducción del H_2O_2 directamente del aparato fotosintético (Figura 9 a) y se ha denominado ciclo de Agua-agua (Asada, 2000). En el cloroplasto, en la mitocondria, en los peroxisomas y en el citoplasma, opera un mecanismo denominado ruta de Halliwell-Asada y que corresponde al ciclo del ascorbato-glutación (Figura 9 b). Esta vía implica la acción de las enzimas APX, MDAR, DAR y GR, que en su conjunto utilizan el poder reductor del $NADPH_2$ para eliminar el H_2O_2 . La amplia distribución de esta vía y la alta afinidad de la APX por el H_2O_2 sugieren que la misma

tiene un papel crucial en controlar el nivel de EROs en los compartimentos donde está presente (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

Otros mecanismos que actúan en la remoción de EROs incluyen a uno en el cual interviene la enzima glutatión peroxidasa (GPX), desarrollado en citosol, mitocondrias y plastidios (Figura 9 c), y otro que está constituido por la vía de las CAT en los peroxisomas (Figura 9 d). Las CAT no requieren un aporte de equivalentes de reducción, por lo tanto son independientes del estado redox de la célula e implica que su funcionamiento no se ve afectado por una situación de estrés oxidativo, al menos en forma directa por limitación de cofactores (Mittler, 2002; Muñoz y Munné-Bosch, 2018).

Además de los sistemas enzimáticos existe una variedad de metabolitos primarios y secundarios que pueden funcionar como antioxidantes. Los principales son el ácido ascórbico (AsA) y el glutatión reducido (GSH), debido a que existen enzimas específicas que los unen al metabolismo del peróxido, a la existencia de formas oxidadas relativamente estables y a que su conversión de formas oxidadas a reducidas se realiza mediante sistemas basados en enzimas de alta capacidad que dependen de los portadores de electrones clave, NAD(P)H₂. Tanto el ascorbato como el glutatión son antioxidantes abundantes y estables en potenciales redox apropiados (Foyer y Noctor, 2011; Noctor y col., 2011).

Asociado a la maquinaria enzimática antioxidante existen otras sustancias que actúan en defensa frente al estrés oxidativo en frutos, entre ellas encontramos a los fenoles y polifenoles (Benvenuti y col., 2004; Vieira y col., 2009; Sun y col., 2014). Químicamente son compuestos que tienen al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Existe una gran variedad de compuestos fenólicos; se incluyen los flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, isoflavonas y flavanoles), fenilpropanoides (derivados de ácidos hidroxycinámicos, como el cafeico, ferúlico y p-cumárico), estilbenoides (resveratrol y piceatanol) y derivados del ácido benzoico (ácidos gálico y elágico). Los flavonoides, formados por dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado, según el grado de hidrogenación y de la sustitución del heterociclo constituyen flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, proantocianidinas y flavanonas. Se encuentran generalmente glicosilados. Por otra parte, el grupo de los ácidos fenólicos, contiene un anillo aromático con diferentes grupos funcionales, y que pueden formar ésteres con los ácidos orgánicos. Otros compuestos de naturaleza polifenólica son estilbenos,

taninos, ligninas y lignanos. Algunas de las características de los vegetales, como color, astringencia y aroma son debidas a la presencia de compuestos de este tipo. El grado de hidroxilación y la posición de los hidroxilos en la molécula determina la actividad antioxidante de los polifenoles (Dai y Mumper, 2010).

Las antocianinas dan color a las flores y frutos, y actúan como antioxidantes naturales. Estudios realizados en *Arabidopsis* mediante mutantes deficientes en CAT permitieron identificar que cuando estas plantas eran expuestas a alta radiación lumínica se activaba un grupo de genes relacionados a la vía de regulación y biosíntesis de antocianinas (Vanderauwera y col., 2005). Investigaciones realizadas en manzanas han demostrado que la síntesis de antocianinas está ligada a factores de transcripción MdMYB1, MdMYB10, y MdMYBA, los cuales son inducidos por la presencia de luz (Li y col., 2012).

Durante la adaptación a estrés por alta radiación solar se producen cambios en la concentración de los pigmentos en los frutos (Felicetti y Schrader, 2009; Schrader y col., 2011). En manzana se ha determinado un aumento de antocianinas, lo cual sugiere que éstas cumplen una función protectora en la piel de los frutos sometidos a alta irradiancia (Merzlyak y Chivkunova, 2000; Merzlyak y col., 2008). En mutantes naturales de peras variedad 'Anjou', se observó que los tejidos de la piel del fruto del cultivar 'green Anjou' presentan menor capacidad de fotoprotección que el de 'red Anjou', lo cual sería debido a que las peras rojas poseen una alta concentración de antocianinas respecto de la variedad verde (Li y col., 2008).

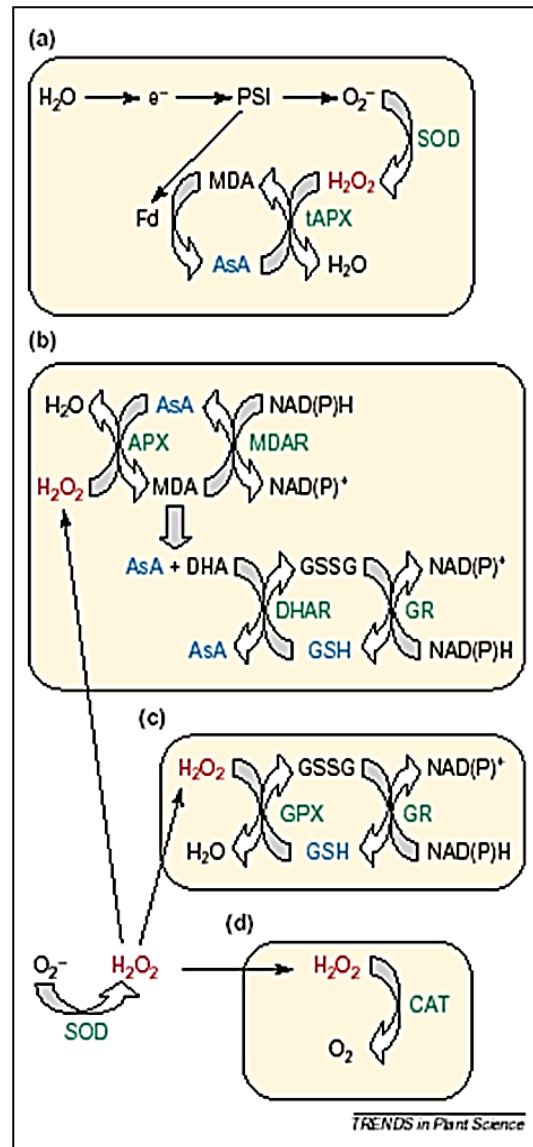


Figura 9. Vías de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en plantas. (a) Ciclo agua-agua. (b) Ciclo de Ascorbato-glutación. (c) Ciclo del glutatión peroxidasa (GPX). (d) Ciclo de la catalasa (CAT). La superóxido dismutasa actúa en la primera línea de defensa convirtiendo O_2^- en H_2O_2 . La ascorbato peroxidasa (APX), GPX y CAT luego detoxifican H_2O_2 . A diferencia de la CAT (d), la APX y GPX requieren ascorbato (AsA) y/o glutatión (GSH) regenerado cíclicamente (a-c). Estos ciclos necesitan electrones donados directamente del aparato fotosintético (a) o del NAD(P)H (b y c) como poder reductor. Las EROs están indicadas en rojo, los antioxidantes en azul y las enzimas secuestradoras de EROs en verde. Abreviaturas: DHA, dehidroascorbato; DHAR, DHA reductasa; Fd, ferredoxina; GR, glutatión reductasa; GSSG, glutatión oxidado; MDA, monodehidroascorbato; MDAR, MDA reductasa; PSI, fotosistema I. Extraído de: Mittler, 2002, Trends Plant Science 7:405-410.

3.4. Estrés oxidativo debido a elevada radiación solar y altas temperaturas

3.4.1. Efecto de elevada radiación solar

La radiación solar en los vegetales es beneficiosa dado que dirige y está asociada a procesos metabólicos fundamentales para la vida. La mayor parte de la radiación que incide en un órgano vegetal es reemitida en forma de radiación infrarroja, otra parte es disipada por conducción, convección y por la evaporación de agua que acompaña a la transpiración. Una pequeña parte es acumulada como cambios en la temperatura del órgano, fundamentalmente en el agua que contiene. Por otro lado, una porción del espectro de la radiación electromagnética es absorbida por moléculas de pigmentos que quedan así activados y parte de la energía de activación es acumulada como energía química (fotosíntesis) o disipada como fluorescencia, fosforescencia, calor o transferencia a otros pigmentos (Taiz and Zeiger, 2006).

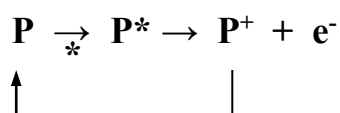
Cuando la energía radiante incidente es elevada y los mecanismos de disipación y control no son suficientemente efectivos se produce un exceso de energía de excitación y calentamiento del órgano. El exceso de energía de excitación lleva a una máxima excitación de las moléculas de clorofila y a la superproducción de electrones por la oxidación del agua, aumentando los niveles de H₂O₂ (Foyer y Shigeoka, 2011). La cantidad de exceso de energía de excitación que la planta experimenta depende también de factores ambientales y de desarrollo que determinan la cantidad de energía requerida por la planta para los procesos celulares. Enfermedades, estado hídrico y nutricional limitado y cambios rápidos en la temperatura pueden promover exceso de energía de excitación, inclusive en situaciones de iluminación que en condiciones adecuadas no provocarían problemas (Demmig-Adams y Adams, 1992).

Como resultado de los efectos directos que suceden cuando la radiación solar excede el nivel máximo característico para cada vegetal, se puede generar una situación desfavorable conocida como "estrés fotooxidativo" (Takahashi y Badger, 2011; Muñoz y Munné-Bosch, 2018). Esta denominación general comprende los daños que sufren los componentes celulares debido a un exceso de radiaciones UV, IR e inclusive de luz visible, que causan aumento de energía de excitación, afectan el equilibrio electrónico de las moléculas y provocan una elevación de la temperatura de los órganos expuestos.

La porción del espectro de alta energía UV-B provoca fundamentalmente mutaciones irreversibles en el material genético (Azcón-Bieto y Talón, 2003). La luz UV-B causa dimerización de las bases de timina, lesiones en el ADN y destrucción de la proteína D1 del fotosistema II, y además se ha observado aumento en la pérdida de electrolitos debido a peroxidación de lípidos. Se ha determinado que una exposición de las radiaciones UV también puede acarrear destrucción de las defensas antioxidantes del organismo, por lo que parte de la acción destructiva de la radiación UV resulta de mecanismos que involucran directa o indirectamente la generación de EROs (Schrader y col., 2008; Buchanan y col., 2015).

Los mecanismos más sensibles a fotooxidación en las plantas son los que están asociados y dirigidos por eventos que dependen de la luz. Uno de los problemas más serios que acarrea la utilización de la radiación fotosintéticamente activa como fuente de energía para realizar reacciones químicas, es que la alta reactividad de los estados excitados y radicales libres participantes en cualquier proceso fotoquímico hace probable que se produzcan transformaciones no deseadas (Szabó y col., 2005).

La especial constitución y precisa organización estructural del aparato fotosintético reduce considerablemente la frecuencia con que se producen procesos distintos de los que conducen a la disipación inocua de energía. Sin embargo, ocurren en cierto grado procesos alternativos que son fuente de EROs ocurren en cierto grado (Taiz y Zeiger, 2006). El origen de los procesos secundarios deletéreos reside esencialmente en desajustes entre las etapas individuales de la fotosíntesis. En primer lugar, debemos tener en cuenta que cualquiera de los constituyentes intrínsecos (no sustratos) que intervienen en la fotosíntesis experimenta un ciclo de cambios durante su intervención y que la capacidad para participar en un nuevo ciclo depende de que el constituyente haya terminado el anterior y vuelto al estado inicial. Así, por ejemplo, el ciclo del donador primario del centro de reacción en cualquiera de los dos fotosistemas es:



La única forma del donador primario que puede aceptar un excitón (fotón) que produzca su oxidación es P, de manera que si el excitón lo encuentra como P* o P+ debe seguir en la antena hasta encontrar otro P disponible o relajarse mediante una ruta alternativa. De forma paralela, si el aceptor primario está reducido, no puede

aceptar el electrón de P* en la reacción fotoquímica primaria y P* debe relajarse también por una ruta alternativa (Azcón-Bieto y Talón, 2003). En condiciones ambientales normales los procesos alternativos a la transformación de la energía solar en química se producen siempre, aunque en baja frecuencia permitiendo que funcionen los procesos de protección de la planta.

3.4.2. Efecto de altas temperaturas

Las plantas poseen una maquinaria química que les es propia y por tanto presentan sensibilidad a la temperatura, que junto con el agua y la luz constituyen los factores ambientales críticos para el desarrollo de los vegetales. Cada reacción enzimática, función metabólica y proceso fisiológico funciona a temperaturas óptimas. Las temperaturas en las cuales los procesos biológicos pueden llevarse adelante están generalmente limitadas por el punto de congelamiento del agua en el extremo inferior y la desnaturalización de las proteínas en el extremo superior (Taiz y Zeiger, 2006).

Actualmente está bien documentado que las temperaturas altas producen estrés oxidativo tanto en animales como en los diferentes órganos de una planta (Wahid y col., 2007; Hengari y col., 2014a). El estrés por temperaturas altas genera en los vegetales una mayor necesidad de eliminar EROs, se ha observado un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes en hojas y frutos (Ma y Cheng, 2004; Almeselmani y col., 2006).

El aumento de EROs por efecto de la temperatura por encima de los valores límites de tolerancia para cada especie, aumenta la oxidación de lípidos (Liu y Huang, 2000; Jiang y Huang, 2001), desnaturalización de proteínas y alteración en el patrón de expresión génica (Wahid y col., 2007). Estas perturbaciones producen pérdida de actividad de las enzimas, generan daños en la estructura celular e impiden las funciones de membrana (Azcón-Bieto y Talón, 2003; Buchanan y col., 2015).

Las membranas celulares son las primeras afectadas por el estrés por temperaturas elevadas; cuando estas superan 40 °C afectan la permeabilidad de las membranas por aumento en la peroxidación de los lípidos (Liu y Huang, 2000; Chaves-Barrantes y Gutiérrez-Soto, 2016).

El aumento progresivo de la temperatura hasta aproximadamente 40 °C, induce una mayor síntesis de proteínas. Sin embargo, cuando los tejidos de frutos y hojas

son expuestos a temperaturas superiores a los límites de tolerancia, el contenido de proteínas disminuye (Chaves-Barrantes y Gutiérrez-Soto, 2016). Con altas temperaturas no sólo se ve afectada la estructura de las proteínas por desnaturalización, sino que además disminuye la síntesis de proteínas del metabolismo normal y aumentada la transcripción y traducción de un nuevo grupo de proteínas denominadas de choque térmico (heat shock proteins) (Wünsche y col., 2004; Wahid y col., 2007). Esta respuesta es observada cuando las plantas son sometidas a temperaturas superiores en 5 °C a las condiciones óptimas de crecimiento (Buchanan y col., 2015).

El aumento de la temperatura provoca interrupción en las rutas metabólicas asociadas a la generación de energía y respiración. Las partes más sensibles al calor son los complejos del fotosistema II, aunque también se ven afectadas de manera adversa la Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa y otras enzimas del metabolismo del carbono. Se ha observado que el estrés por altas temperaturas provoca la disminución del contenido de clorofila y una reducción en la tasa fotosintética (Wahid y col., 2007).

Los frutos presentan baja transpiración, lo que incide en una escasa capacidad para disipar el calor. Esto hace que en condiciones de altas temperaturas la cara expuesta de los frutos sufra mayor estrés por calor y al prolongarse esta situación aparezcan alteraciones fisiológicas como el daño por sol (Schradler y col., 2008).

4. Hormonas vegetales relacionadas a la respuesta al estrés oxidativo

En entornos cambiantes, las plantas necesitan regular su crecimiento y desarrollo de tal manera de adaptarse a condiciones estresantes. Es creciente la cantidad de reportes científicos que demuestran que las EROs desempeñan un rol crucial en la activación de las vías de respuesta al estrés abiótico de las plantas (Sharma y col., 2012; You y Chan, 2015). Parte de estas vías están asociadas a una compleja red de interacción entre hormonas vegetales (Bartoli y col., 2013; Xia y col., 2015).

Las fitohormonas, un grupo diverso de moléculas de señalización que se encuentran en pequeñas cantidades en las células, son de importancia clave en el

desarrollo de las plantas y la plasticidad fenotípica. A menudo, la variación de sus concentraciones alteran rápidamente la expresión génica al inducir o prevenir la degradación de los reguladores transcripcionales a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Peleg y Blumwald, 2011). De esta manera, permiten la aclimatación de las plantas mediante la modificación del crecimiento, el desarrollo, las transiciones de fuente/sumidero y la asignación de nutrientes. La participación de las fitohormonas ABA, etileno y poliaminas se ha demostrado en diversas respuestas a estreses abióticos y bióticos (Iams et al., 2009; Calzadilla et al., 2014; Torres et al., 2017).

4.1. Poliaminas

En los últimos años el concepto de hormona vegetal ha comenzado a ampliarse a sustancias que no pertenecen a los cinco grupos de hormonas clásicos (auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico) (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Entre estas sustancias se encuentran las poliaminas, que son policationes de bajo peso molecular presentes en todos los seres vivos. Las poliaminas están en todos los compartimentos de la célula vegetal, incluido el núcleo, lo que indica su participación en diversos procesos fundamentales en la célula, como replicación, transcripción, traducción, estabilización de la membrana, modulación de la actividad enzimática, división y alargamiento celular, crecimiento y desarrollo de las plantas (Kaur-Sawhney et al., 2003; Kuznetsov y Shevyakova, 2007).

En las células vegetales las poliaminas más comunes son Putrescina (Put; 1,4-diaminobutano), Espermidina (Spd; triamina 1,8 diamino-4-ozaoctano) y Espermina (Spm; tetramino 1,12-diamino 4,9-diazadodecano) (Figura 10) (Bitrián et al., 2012).

La distribución de estos compuestos en los diferentes tejidos depende del estado de desarrollo, y en general es más abundante la Put respecto a la Spd y a la Spm. En plantas, las poliaminas se encuentran presentes desde un nivel micromolar hasta milimolar y aunque su concentración es mayor respecto a otras fitohormonas se las considera también reguladores de crecimiento, ya que juegan un papel fundamental en una amplia variedad de procesos (Handa y Mattoo, 2010). Otros investigadores, sin embargo, dudan en clasificarlas como fitohormonas debido precisamente a su alta concentración en los tejidos vegetales (Fujita y Shinozaki, 2015).

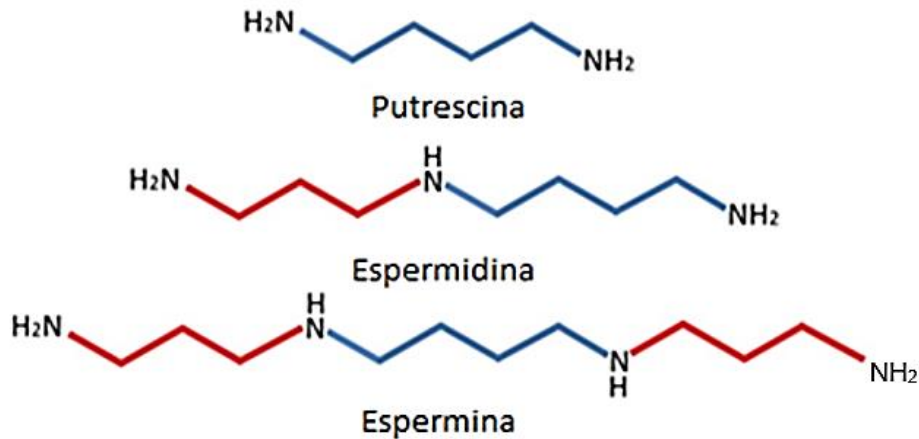


Figura 10. Estructura química de la putrescina, espermidina y espermina. Los grupos aminopropilos (en rojo) se unen a la cadena lineal de cuatro carbonos de la putrescina (en azul) para producir espermidina y espermina. Adaptado de Bitrián y col. (2012)

4.1.1. Regulación interna de poliaminas

La biosíntesis de las poliaminas se inicia con la descarboxilación de la ornitina para formar putrescina. Esta reacción es catalizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) (Figura 11). En plantas y algunos procariontes existe una ruta metabólica alternativa que se inicia con la descarboxilación de la arginina por una arginina descarboxilasa (ADC) para formar agmatina, que es hidrolizada por una agmatina-imino hidrolasa (AIH), dando lugar a N-carbamilputrescina, que finalmente es transformada en Put. A su vez, la ornitina y la arginina son interconvertibles entre sí; la ornitina se convierte en arginina a través de la vía de la citrulina, mientras que la arginina se convierte en ornitina por la acción de la actividad arginasa (Bitrián y col., 2012)

A partir de la Put, se producen la Spd y Spm mediante la adición de grupos aminopropilo por la acción de las enzimas espermidina sintasa (SPDS) y espermina sintasa (SPMS). Los grupos aminopropilo derivan de la metionina, la cual es convertida en primera instancia en S-adenosilmetionina (SAM) y luego descarboxilada en una reacción catalizada por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC). La

SAM es un precursor común para las rutas de biosíntesis tanto de las Poliaminas como del etileno y la SAMDC regula ambos procesos (Tiburcio y Alcázar, 2014).

Como sucede con todos los reguladores de crecimiento vegetal, la cantidad intracelular de poliaminas libres no sólo depende de su síntesis, sino que también se ve influenciada por otros procesos tales como la degradación, la conjugación y el transporte. El nivel de poliaminas libres es estrictamente regulado y, en general, suele variar en respuesta a condiciones de estrés ambiental o durante la transición entre diferentes poliaminas (Bitrián y col., 2012; Shelp y col., 2019). Las poliaminas son desaminadas a través de la acción de amino oxidasas. La cobre diamino oxidasa (DAO) oxida a la diamina putrescina a 4-aminobutanal concomitantemente con la liberación de NH_3 y H_2O_2 . La DAO participa en eventos fisiológicos importantes, que incluyen la biosíntesis de la lignina y de la pared celular, a través de productos de reacción, principalmente H_2O_2 . La poliamina oxidasa (PAO) es otra clase de amino oxidasa que se asocia a las paredes celulares y puede desaminar la Spd y Spm, utilizando flavin-adeninucleótido (FAD) como cofactor y O_2 como donador de electrones. El catabolismo de la Spd y Spm produce 4-aminobutanal o 3-aminopropil-4-aminobutanal, respectivamente, junto a 1,3-diaminopropano y H_2O_2 (Toumi y col., 2010).

En las células vegetales, las poliaminas se sintetizan en plastidios y en el citosol. Esta compartimentalización indica que existen transportadores que permiten la movilidad de las poliaminas entre los diferentes sitios celulares, y que este transporte tendría importancia en el rol fisiológico de las poliaminas (Fujita y Shinozaki, 2015). Las poliaminas se pueden encontrar como formas solubles o insolubles. Las formas solubles pueden estar libres o conjugadas en forma covalente a compuestos de bajo peso molecular como algunos fenoles, mientras que las formas insolubles pueden estar unidas en forma covalente a lípidos, proteínas o pared celular (Minocha y col., 2014). La translocación a distancia de las poliaminas se realiza a través del xilema y floema siendo transportadas con diferente facilidad en función a la cantidad de grupos nitrogenados en la molécula. La Put es fácilmente movilizada dentro del floema, mientras que el transporte de Spd y Spm es más limitado (Fariduddin y col., 2013).

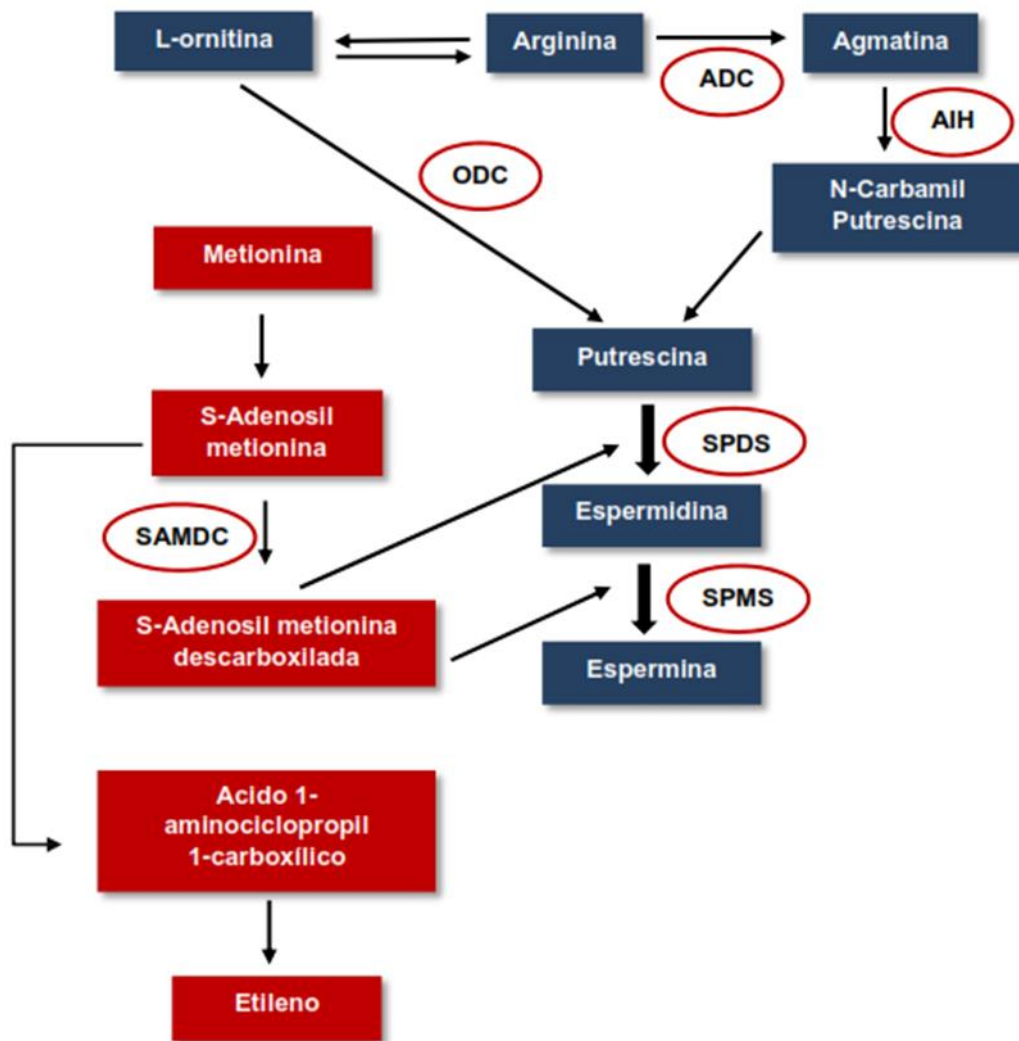


Figura 11. Biosíntesis de Putrescina, Espermidina y Espermina y su relación con la biosíntesis del etileno. Enzimas involucradas: ornitina descarboxilasa (ODC), arginina descarboxilasa (ADC), agmatina-imino hidrolasa (AIH), espermidina sintasa (SPDS), espermina sintasa (SPMS) y S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC). Extraído de Bitrián y col. (2012)

4.1.2. Rol de las poliaminas en estrés abiótico

La disponibilidad de inhibidores específicos de la biosíntesis de las poliaminas ha contribuido en la investigación de los mecanismos e interacciones de las mismas y del entendimiento de su papel fisiológico en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las poliaminas están involucradas en numerosos procesos del desarrollo

vegetal, incluyendo la división celular, embriogénesis, desarrollo de órganos reproductivos, crecimiento radical, tuberización, iniciación floral y senescencia de hojas (Kaur-Sawhney y col., 2003; Handa y Mattoo, 2010).

Más allá de la participación en el crecimiento y desarrollo de los vegetales, bajo diferentes condiciones de estrés abiótico tales como sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas, radiación UV, metales pesados y ozono, entre otros, se produce acumulación de poliaminas (Kuznetsov y Shevyakova, 2007; Calzadilla y col., 2014).

Los mecanismos por los cuales las poliaminas pueden atenuar los daños en diferentes situaciones de estrés se deben a su naturaleza policatiónica, que permite interacciones con macromoléculas como ADN, ARN, complejos transcripcionales y traduccionales, y posibilita estabilizar las estructuras de las membranas celulares (Minocha y col., 2014). Por ejemplo, en los cloroplastos, las poliaminas protegen a la membrana tilacoidal contra los efectos nocivos de condiciones estresantes y permiten mantener la función fotosintética (Calzadilla y col., 2014).

Por otra parte, las poliaminas actúan como moléculas señal en la ruta de respuesta al estrés abiótico mediante la interacción con el ABA y el óxido nítrico. Toumi y col. (2010) observaron que en condiciones de sequía el ABA promueve la acumulación de poliaminas en hojas de vid y, al mismo tiempo, induce la vía de oxidación en el apoplasto, lo que genera H_2O_2 . Éste, a su vez integra la vía de señalización para iniciar una respuesta frente al estrés hídrico.

Entre los compuestos antioxidantes que las plantas producen para atenuar los efectos nocivos de las EROs se han reportado las poliaminas. Estas sustancias actúan directamente como secuestradores de radicales libres o promoviendo la producción de enzimas antioxidantes (Kuznetsov y Shevyakova, 2007; Minocha y col., 2014).

En general, las investigaciones realizadas sobre el rol de las poliaminas durante condiciones de estrés en las plantas, indican un incremento de su contenido y una mejora de la tolerancia a las condiciones estresantes (Gill y Tuteja, 2010; Gupta y col., 2013). Sin embargo, existen investigaciones en las cuales el nivel de Poliaminas no estuvo relacionado con la respuesta adaptativa de las plantas a condiciones de estrés o inclusive mostró una correlación negativa. Las poliaminas en exceso pueden actuar como agentes pro-oxidantes siendo peligrosos para las células vegetales. Por lo tanto, es difícil establecer una relación directa y general entre los niveles de poliaminas, en especial en forma individual, y la tolerancia al estrés abiótico (Fariduddin y col., 2013; Pál y col., 2015). La interacción de las poliaminas, las EROs

y los antioxidantes es quizás uno de mecanismos fisiológicos y bioquímicos más complejos en las plantas (Minocha y col., 2014).

4.2. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una molécula pequeña de 15 átomos de carbono que pertenece a los metabolitos del grupo de los isoprenoides, tiene una configuración no plana y múltiples restos funcionales. Es una fitohormona que se puede encontrar en pequeñas cantidades en todos los tejidos vegetales, en algunos musgos, algas verdes, cianobacterias y varios hongos fitopatógenos (Zeevaart y Creelman, 1988; Azcón-Bieto y Talón, 2003). Está asociado a la regulación del desarrollo embrionario de la semilla, a la dormición de yemas, la inducción de síntesis de etileno y a las respuestas de la planta a una variedad de situaciones abióticas que producen estrés (Xiong y Zhu, 2003; Hong y col., 2013). La función más ampliamente estudiada del ABA es la de regular el equilibrio hídrico de las plantas y la tolerancia al estrés osmótico, pero también se ha reportado su participación en la respuesta a estrés térmico y por alta radiación lumínica (Galvez-Valdivieso y col., 2009; Boneh y col., 2012; Vishwakarma y col., 2017).

El ácido abscísico funciona en plantas a través del reconocimiento celular por el receptor intracelular, PYL. El receptor PYL unido a ABA forma complejos que permiten la liberación de la inhibición de proteínas quinasas que regulan múltiples respuestas fisiológicas a través de sustratos diana fosforilables, incluidos canales iónicos, factores de transcripción y transportadores, entre otros. La regulación de estos componentes es crítica para manejar respuestas de defensa a estrés abiótico y mantener el crecimiento en entornos de crecimiento no óptimos (Chen y col., 2020).

4.2.1. Regulación interna de ABA

Los niveles de ácido abscísico se controlan mediante síntesis y degradación, conjugación y transporte. Las plantas sintetizan ABA utilizando la vía de los carotenoides, que también se conoce como la "vía indirecta". En mutantes de tomate defectuosos en la síntesis de ABA se determinó que esta se inicia desde la escisión de un precursor de 40 carbonos, el β -caroteno (Xiong y Zhu, 2003; Nambara y Marion-Poll, 2005). La conversión del precursor zeaxantina (C40) a xantoxina (C15) se lleva

a cabo en plastidios y en el citoplasma. En el citoplasma, una alcohol deshidrogenasa de cadena corta convierte la xantoxina en aldehído abscísico, que finalmente se oxida a ABA (Chen y col., 2020). La conversión de 9'-cis-neoxantina y 9'-cis-violaxantina en xantoxina por la 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED) es un paso limitante de la velocidad en la biosíntesis de ABA (Figura 12).

Los análisis de localización de enzimas biosintéticas y de los transcriptos correspondientes indican que los haces vasculares son el sitio de la síntesis de ABA en plantas turgentes, mientras que en condiciones adversas también está activa esta vía en las células de guardia (Nambara y Marion-Poll, 2005).

El transporte de ABA entre células y órganos es una parte importante de la función del ABA en respuestas de estrés sistémico de toda la planta. El ABA existe naturalmente en las plantas en forma aniónica (ABA⁻) y protonada (ABA^H), como es un ácido débil, puede difundirse pasivamente a través de la membrana plasmática pero también se moviliza activamente mediante transportadores proteicos unidos a ATP. Funcionalmente, cada vez se descubren más transportadores de ABA involucrados en transpiración, morfología de raíz, germinación de semillas y otros procesos importantes para el estrés (Sah y col., 2016).

El nivel endógeno de ABA está modulado por el equilibrio preciso entre la biosíntesis y el catabolismo. El catabolismo de ABA se produce en gran medida a través de dos tipos de reacciones: hidroxilación y conjugación. El ABA puede ser catalizado a ácido fásico (PA) por CYP707As, que a su vez es catalizado a ácido dihidrofásico (DPA) por PA reductasa (PAR) (Figura 12). En *Arabidopsis* se ha demostrado la existencia del gen CYP707A que codifica para una enzima ABA-8-hidroxilasa, que está comprometida en la ruta predominante de degradación del ABA. No obstante, existen otras dos hidrolasas que oxidan los grupos metilos en el C-7 y C-9 del anillo y limitan la actividad del ABA. A su vez, la hidroxilación desencadena otros pasos de inactivación. Otros mecanismos de reducción de la actividad del ABA son a través de la ciclación espontánea y por conjugación formando esterres con glucosa (Nambara y Marion-Poll, 2005).

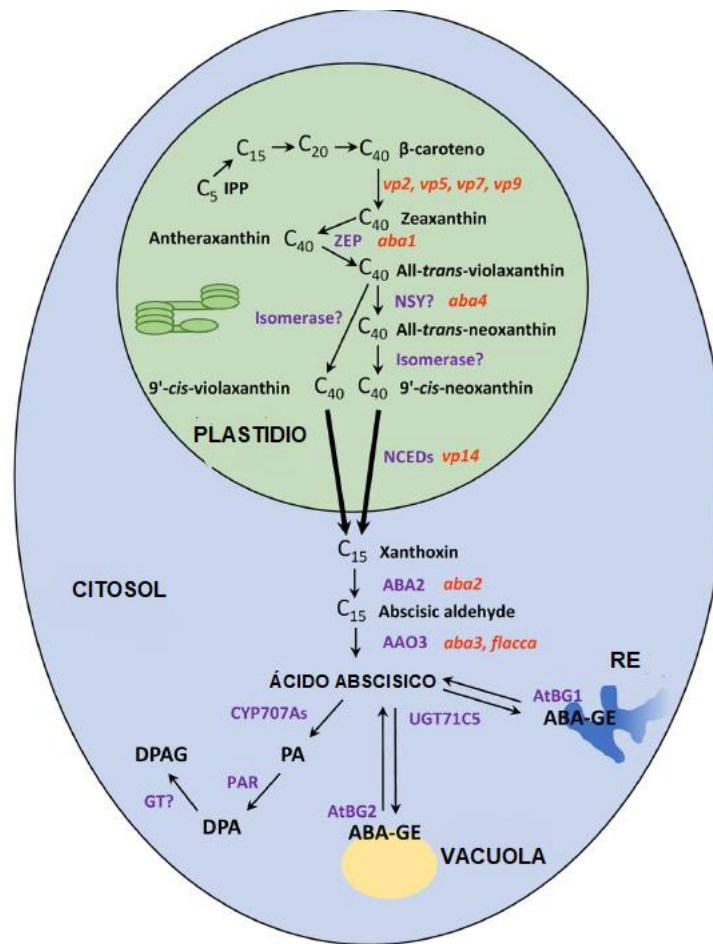


Figura 12. Biosíntesis, catabolismo y conjugación de ácido abscísico (ABA). Adaptado de Chen y col. (2020)

4.2.2. Rol del ABA en estrés oxidativo

La tolerancia al estrés inducida por ABA está parcialmente relacionada con la activación de los sistemas de defensa antioxidante, incluidos los componentes enzimáticos y no enzimáticos, que protegen las células vegetales contra el daño oxidativo (Jiang y Zhang, 2001; Zhang y col., 2014). Estudios realizados mediante aplicación exógena de ABA sobre *Orthosiphon stamineus* (hierba típica de zonas tropicales) demostraron que en los tejidos se incrementó la producción de fenoles totales, flavonoides, sacarosa, H_2O_2 , aumentó la actividad PAL, APX, CAT y SOD y las capacidades antioxidantes (Ibrahim y Jaafar, 2013). Los efectos positivos en la inducción de una respuesta de defensa antioxidante contra el daño oxidativo están relacionados a bajas concentraciones de ABA (10 a 100 mM). No obstante, una alta

concentración de ABA (1000 mM) puede inducir la generación excesiva de EROs y daño oxidativo en células vegetales (Jiang y Zhang, 2001).

Por otra parte, Jia y col. (2011) han reportado que frutos de plantas transgénicas de frutilla mutadas para inhibir la biosíntesis de ABA, presentaban menores niveles de esta hormona así como frutos sin color. Los resultados indicaron que el ABA está ligado a la maduración de los frutos y a la síntesis de antocianinas. Trabajos realizados en uva y en arándanos reportaron que el ABA no sólo estimula la síntesis de antocianinas sino que también induce las enzimas antioxidantes (Berli y col., 2010; Oh y col., 2018).

4.3. Etileno

El etileno es la única hormona vegetal gaseosa, presenta una estructura molecular simple y pequeña que le permite difundir por los tejidos rápidamente, para iniciar su efecto en cantidades mínimas. Está presente en angiospermas y gimnospermas aunque también en bacterias y hongos además de musgos, hepáticas, helechos y otros organismos. Siendo un gas, puede moverse rápidamente por los tejidos, no tanto por transporte sino por difusión. Su efecto además se inicia con cantidades mínimas, las cuales ya provocan respuestas (Jordán y Casaretto, 2006).

Si bien el etileno está involucrado en el quiebre de dormancia, epinastia, inducción floral, abscisión de órganos y respuesta a estrés biótico y abiótico, a nivel comercial, los efectos más analizados son la aceleración de la senescencia y maduración de frutos (Lara y Vendrell, 2000). En los frutos de las especies denominadas climatéricas, al inicio de la etapa de maduración, se produce un incremento marcado de la respiración coincidiendo con aumento de la producción de etileno (Ascón-Bieto y Talón, 2008). Por otra parte, en este tipo de frutos la presencia de etileno promueve su propia síntesis (autocatálisis) y son capaces de seguir madurando una vez separados de la planta, siempre que hayan alcanzado un nivel de desarrollo caracterizado por el tamaño máximo (Sozzi, 2007). Entre los frutos climatéricos se puede citar a banana, manzana, tomate, paltas, kiwi, melón, pera, higo, durazno, nectarinas, mango, y otros. En cambio, en los frutos no climatéricos el nivel de etileno permanece estable, siendo los más característicos los cítricos (naranja, limón), cerezas, frutillas y uvas. En estos últimos el etileno no es requerido para la maduración de sus frutos; sin embargo, aplicaciones a cítricos provocan un efecto de

deverdizado, con pérdida de clorofila en el flavedo, lo que da una apariencia de mayor madurez. Se ha determinado que en frutos climatéricos puede producirse un nivel de etileno superior a 300 nl/g h, al mismo tiempo que se desencadena una rápida liberación de CO₂ (Jordán y Casaretto, 2006).

4.3.1. Regulación interna del etileno

La biosíntesis de etileno se conoce como el ciclo de la metionina o de Yang, se inicia por la asociación de la metionina con la adenosina conformando la S-adenosilmetionina (SAM). El paso siguiente es la conversión de este intermediario en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que se escinde en etileno con liberación de CO₂ (Figura 13). De la conversión de SAM a ACC se libera 5 metil-tio-adenosina, la cual se disocia en adenina y ribosa pasando por varias reacciones hasta constituir nuevamente metionina y continuar el ciclo. Este ciclo metabólico es importante pues recicla la metionina, un aminoácido no abundante, como fuente de azufre. Las reacciones pueden estar separadas espacialmente; en condiciones de inundación (condiciones anaeróbicas) el ACC se genera en la raíz y se transporta vía xilema, a través de la corriente transpiratoria hacia la parte aérea, donde se transforma en etileno y manifiesta su acción (Jordán y Casaretto, 2006). Las tres reacciones principales están gobernadas por las enzimas SAM sintasa para la síntesis de SAM; la ACC sintasa para el ACC, y la ACC oxidasa para el etileno, siendo esta última una reacción aeróbica. Aumentos de ACC, ACC oxidasa y etileno se han observado en varios frutos un par de días después de su cosecha, sin embargo, las reacciones de síntesis también pueden ser incrementadas bajo algunas situaciones de estrés (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

La degradación de etileno ocurre en forma gradual pasando a óxido de etileno, ácido oxálico y CO₂. Por otro lado, no todo el ACC es convertido a etileno, sino que parte de él se conjuga a N-malonil ACC mediante la acción de la N-maloniltransferasa (Figura 13).

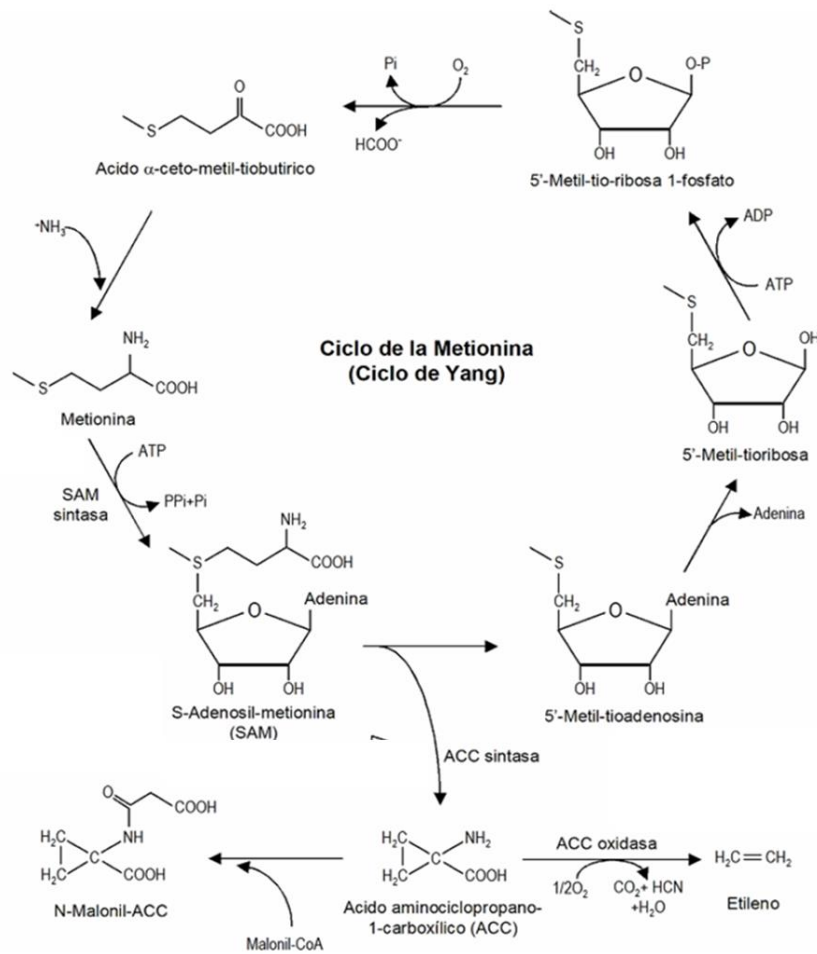


Figura 13. Ciclo de la metionina o de Yang, en relación a la síntesis de etileno. Extraído de Jordán y Casaretto (2006)

4.3.2. Rol del etileno en estrés oxidativo

Se ha reportado que el etileno juega un papel importante en la tolerancia de las plantas a estrés oxidativo generado por condiciones ambientales adversas (Peng y col., 2014; Cui y col., 2015). Estudios realizados en tabaco (*Nicotiana tabacum*) sobre factores de respuesta a etileno indicaron que esta hormona modula la reacción al estrés oxidativo aumentando la tolerancia al estrés abiótico. Esta regulación se asoció al aumento de la actividad de enzimas como SOD y reducción del contenido de EROs bajo tratamientos de sequía, frío, sal y ácido abscísico (Wu y col., 2008).

Para comprender mejor el papel de la señalización de etileno en la tolerancia al estrés de las plantas, Asensi-Fabado y col. (2012) midieron cambios inducidos por estrés salino en los niveles de expresión de los genes de biosíntesis, percepción y

señalización de etileno en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Entre los genes analizados, el factor de transcripción EIN3 mostró el mayor aumento del nivel de expresión bajo estrés oxidativo, produciendo señales derivadas de la peroxidación lipídica que pueden desempeñar un papel positivo a bajas concentraciones para soportar el estrés salino moderado, pero pueden ser perjudiciales si se acumulan en grandes cantidades, particularmente en el caso del malonildialdehído. Siguiendo esta línea de investigación, estudios en plantas de *Arabidopsis* pretratadas con etileno y con mutantes insensibles a etileno demostraron que esta hormona está involucrada en disminuir la concentración de EROs y generar una mayor tolerancia al estrés hídrico y salino (Peng y col., 2014; Cui y col., 2015).

Trabajos realizados en tabaco por Zhang y col. (2016) sugieren que proteínas que son factores de respuesta a etileno (ERF) coordinan una red reguladora compleja entre la señalización de etileno y la acumulación de EROs. La expresión de estos factores de respuesta a etileno podría disminuir la acumulación de EROs en las plantas de tabaco y aumentar la tolerancia del tabaco al estrés por H₂O₂.

FUNDAMENTACION

Las pérdidas en la producción de frutos de manzanas y peras ocasionadas por daño por sol son elevadas en la mayoría de las regiones frutícolas del mundo. Los valles irrigados del norte de la Patagonia se caracterizan por tener clima árido con radiación y temperaturas elevadas en verano (Rodríguez y Muñoz, 2006), lo que induce en la cara expuesta de los frutos una fisiopatía conocida como daño por sol. No obstante las condiciones climáticas extremas, la economía de la región se basa en el cultivo de frutales de Pomáceas que puede ser productivo debido a un amplio sistema de riego artificial. En esta región se ha determinado una incidencia de daño por sol de hasta el 50% en el caso de la variedad Fuji (Colavita, 2008). El impacto de esta fisiopatía genera importantes pérdidas económicas debido a que la fruta con leve daño de sol se comercializa con precios bajos en el mercado interno. La fruta que presenta grados avanzados de afección directamente se descarta. El daño por sol es considerado un grave problema económico en prácticamente todas las regiones productoras de manzanas del mundo (Racsco y Schrader, 2012).

Durante los años 2002-2005 realicé la Maestría en Ciencias Químicas con Orientación en Biotecnología dictada en la UNCo. La investigación de la tesis realizada dio como resultados que en los frutos de manzana expuestos a alta radiación solar se induce la síntesis de metabolitos y la actividad de las enzimas antioxidantes según un patrón que responde al desarrollo del fruto, dado que el estudio abarcó desde fruto pequeño a cosecha. Este comportamiento fue diferente en las dos variedades estudiadas (Red Delicious y Braeburn). También se determinó a nivel agronómico la incidencia de daño por sol en cinco variedades de manzana y se pudo establecer que existía una diferencia de susceptibilidad según la variedad.

En función a la importancia regional del problema de daño por sol causado por las características climáticas de la región y a la línea de investigación iniciada en la tesis de maestría se consideró profundizar en los estudios. Un primer aspecto, sobre el cual la información existente es fragmentada y escasa, es el que aborda un análisis conjunto del sistema antioxidante y hormonal que presentan tejidos con distintos grados de daño por sol (Morales-Quintana y col., 2020). En este sentido no existen trabajos relacionados al estudio de poliaminas en la respuesta de frutos a estrés por elevada radiación solar.

Ciertas contradicciones y confusión acerca del desarrollo de daño por sol que existe en la literatura surgieron del uso de técnicas y sistemas experimentales ampliamente divergentes. En la mayoría de los trabajos publicados sobre respuestas metabólicas a los factores estresantes que generan daño por sol se estudia estrés lumínico y térmico por separado bajo condiciones obtenidas en el laboratorio o de forma artificial, siendo escasos los trabajos en condiciones de campo y sobre frutos sin desprender de la planta. Según los investigadores que lideran el estudio de daño por sol a nivel mundial, no se pudo simular, bajo condiciones controladas de laboratorio, la calidad espectral y la cantidad de luz solar natural a plena intensidad. Tampoco se ha logrado reproducir la sintomatología de daño por sol usando manzanas separadas del árbol (Racsko y Schrader, 2012).

Existen contradicciones en la literatura sobre los resultados de experimentos con fruta unida versus fruta separada del árbol, lo que demuestra la importancia de estudiar los factores que generan daño por sol en órganos que permanecen unidos a las plantas después de los eventos climáticos o de la aplicación de tratamientos para su inducción y prevención. Aunque inducir quemaduras solares en el campo con fruta que permanece unida al árbol es difícil, los resultados más significativos y prácticos se han obtenido a partir de ese tipo de estudios (Chaves-Barrantes and Gutiérrez-Soto, 2016). Por tal razón, se trabajó siempre generando sistemas experimentales en los cuales los frutos estuvieron unidos a la planta hasta el momento de ser recolectados para los análisis.

La respuesta de los vegetales a situaciones de estrés implica procesos dinámicos. No obstante, la mayoría del conocimiento generado sobre este tema es descriptivos del momento determinado en el que se extrajeron las muestras. No existen avances en el conocimiento de la dinámica de la respuesta en el tiempo, tanto a nivel del metabolismo oxidativo como hormonal.

Los frutos de las seis variedades de manzana, más importantes comercialmente en la Argentina, son diferentes en el ciclo de crecimiento y en las características morfológicas y de pigmentación. No obstante, no existen estudios comparativos ni de agrupamiento de variedades en función a la respuesta fisiológicas y bioquímicas frente al estrés por alta radiación solar combinado con altas temperaturas. Agrónomicamente, este conocimiento es fundamental en el momento de seleccionar variedades de manzana adecuadas para diferentes ecosistemas, y para la determinación de prácticas de cultivos (raleo de frutos, poda, plantación).

En los últimos años se ha comenzado a probar como técnica de cultivo, para mitigar el efecto de condiciones ambientales adversas, la aplicación exógena de hormonas vegetales. En vid ya está probado que el ABA exógeno aumenta la concentración de antocianinas y compuestos fenólicos. Esta misma inducción puede que sea factible en manzanas y que de esta manera las aplicaciones de ABA contribuyan a aumentar las defensas antioxidantes del fruto y disminuir el daño de sol. En este sentido Racskó y Schrader (2012) indicaron que investigar el papel de la ABA en la señalización durante el exceso de radiación solar y los efectos de las aplicaciones externas de ABA podría ser un tema fructífero para la investigación futura.

El interés por avanzar en estudios detallados coincide con lo expresado por Musacchi y Serra, (2018) quien expuso... *‘Aunque este trastorno se ha estudiado en detalle y los esfuerzos previos han proporcionado avances significativos en la comprensión de los mecanismos subyacentes que causan quemaduras solares en varias frutas, aún se necesita más investigación. Indudablemente, esto proporcionará nuevos enfoques y herramientas para mejorar las estrategias actuales de mitigación’...*

Hipótesis

1- La diferencia de susceptibilidad al estrés por elevada radiación solar en frutos de distintas variedades de manzanas está relacionada con diferencias en el contenido de pigmentos, la respuesta del sistema antioxidante, la emisión de etileno, el contenido de poliaminas y ABA.

2- Las aplicaciones exógenas de ABA constituyen una herramienta para prevenir el daño por sol en frutos de manzana.

Objetivo general

Estudiar la respuesta antioxidante, la síntesis de pigmentos y cambios hormonales, que presentan los frutos de variedades de manzana con diferente susceptibilidad al daño por sol, cultivadas bajo estrés por alta radiación solar.

Objetivos específicos

- 1- Analizar la variación en el sistema antioxidante, la concentración de poliaminas, ABA y emisión de etileno en frutos que presentan tejidos con distintos grados de daño por sol.
- 2- Estudiar el tiempo de respuesta del sistema antioxidante y de las hormonas de estrés durante un evento de exposición del fruto de manzana a elevada radiación solar combinado con altas temperaturas.
- 3- Caracterizar variedades de manzana con diferente susceptibilidad al desarrollo de daño por sol mediante las respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés por alta radiación solar combinado con altas temperaturas
- 4- Evaluar el efecto de aplicaciones exógenas pre-cosecha de ABA sobre la promoción de defensas antioxidantes, la calidad de los frutos y variaciones en los aspectos vegetativos de las plantas de manzanos cultivados en condiciones de elevada radiación solar y temperatura

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

1. Localización, período de estudio y datos agrometeorológicos de los lugares donde se realizaron los trabajos experimentales

Los estudios fueron realizados en la región geográfica denominada Alto Valle de Río Negro (Figura 14), cuyas coordenadas geográficas corresponden aproximadamente a latitud 39° S y longitud 67° O. Los trabajos experimentales y extracciones de muestras se realizaron durante las temporadas de crecimiento de los años 2015-2016, 2016-2017 y 2017-2018.



Figura 14: ubicación geográfica de la región del Alto Valle del Río Negro, zona donde se realizó el estudio. Google. (2/12/2018), Google Earth. Recuperado el 31 de Julio, 2018, de: <https://www.google.com/maps/@-38.99992,-67.87901,31389m/data=!3m1!1e3>

El clima en la región del Alto Valle de Río Negro se caracteriza como árido a semiárido, mesotermal y con lluvias deficientes todo el año (Rodríguez y Muñoz, 2006). Según las estadísticas meteorológicas de la EEA-INTA Alto Valle (Contralmirante Guerrico, Allen, Río Negro, Argentina; Lat: 39° 01' 00" S, Long: 67° 40" 00" O, elevación: 242 msnm) la zona se caracteriza por tener radiación solar global elevada (promedio por encima de los 800 W m⁻² durante el verano), precipitación

media anual 197,7 mm, temperatura media anual de 15°C, el mes más caluroso es enero con temperaturas medias de 24°C y máximas medias de 31°C, llegando a alcanzar temperaturas diarias máximas alrededor de 40°C. La humedad relativa anual media es de 65%, los vientos son predominantes del oeste y suroeste con velocidades que suelen superar los 40 km h⁻¹ (Rodríguez y Muñoz, 2006).

Tabla 3: Registros meteorológicos obtenidos en la estación Agroclimatológica-Cinco Saltos, Río Negro (Lat: 38° 50' 41" S, Long: 68° 04' 09" O, elevación: 282 msnm) para las temporadas de crecimiento de frutos 2015-16, 2016-17 y 2017-18 y promedios históricos de temperatura y humedad (1990-2016) y de radiación global (2004-2017).

Variables climatológicas	Meses		
	Diciembre	Enero	Febrero
Promedios históricos			
Temperatura máx. media (°C)	29,7	29,7	31,3
Radiación máx. media (W m ⁻²)	890,1	849,3	874,2
Humedad Relativa media (%)	41,8	53,8	46,1
2015-16			
Temperatura máx. media (°C)	29,0	30,4	29,7
Radiación máx. media (W m ⁻²)	1007,0	958,8	885,3
Humedad Relativa media (%)	44	57	57
2016-17			
Temperatura máx. media (°C)	29,9	31,5	31,7
Radiación máx. media (W m ⁻²)	973,5	942,4	878,1
Humedad Relativa media (%)	46	46	56
2017-18			
Temperatura máx. media (°C)	29,5	31,3	30,9
Radiación máx. media (W m ⁻²)	976,8	950,0	867,4
Humedad Relativa media (%)	46	46	57

El clima durante las temporadas en que se realizaron los ensayos (detallado en la Tabla 3) se caracterizó por temperaturas del orden del promedio histórico. No obstante, analizando enero, en particular, se observa que en los tres años en que trabajamos las temperaturas máximas y radiación global media fueron superiores a los promedios históricos. También es destacable que se registraron temperaturas máximas que llegaron a los 39,8 °C. La heliofanía y humedad relativa fueron las características para esa época del año.

2. Cuantificación y determinación de condiciones de estrés

Las condiciones climáticas que caracterizaron a las temporadas de estudio indican que los tejidos expuestos al sol de los manzanos han estado sometidos, durante algunos períodos, a situaciones climáticas estresantes. A fines de caracterizar las condiciones de estrés ocasionadas por elevada radiación solar y temperatura, ambas variables fueron cuantificadas como se describe a continuación.

2.1. Radiación global

La radiación global se cuantificó mediante los datos emitidos por las estaciones meteorológicas del Sistema de Información y Gestión Agrometeorológica del INTA. Se promediaron los datos de la estación Agroclimatológica-Cinco Saltos, Río Negro, Lat: 38° 50' 41"S, Long: 68° 04' 09"O, (<http://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/45/clima.htm>) elevación: 282 msnm y de la estación Agroclimatológica-Alto Valle, Allen, Río Negro, Lat: 39° 01' 00"S, Long: 67° 40" 00"O, elevación: 242 msnm (<http://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/met/clima.htm>).

2.2. Radiación fotosintéticamente activa (PAR).

La radiación PAR se midió utilizando un ceptómetro Cavadevices con sensor de barra de 1 metro y en algunos casos se utilizó un sensor puntual externo.

2.3. Temperatura ambiente

Los registros de temperatura ambiente se tomaron con un termómetro de mercurio y con sondas de termocuplas de tipo T asociadas a datalogger Lutron BTM4208SD.

2.4. Temperatura superficial de hoja y fruto

La temperatura superficial de frutos se midió con termocuplas de tipo T registrando los datos en un datalogger Lutron BTM4208SD. Se realizaron intentos de medición con termómetro infrarrojo pero la variación de datos fue elevada, por lo tanto se descartó este instrumental.

3. Material vegetal

Para los trabajos de investigación de los distintos capítulos de esa tesis se trabajó con material vegetal extraído de plantaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue (localidad de Cinco Saltos), de cultivos de la EEA Alto Valle-INTA (localidad de Cte. Guerrico) y de chacras de empresas privadas, ubicadas en la zona comprendida entre las dos localidades citadas, según se detalla en la Figura 15.



Figura 15: Detalle de la ubicación geográfica de las plantaciones de donde se extrajo el material vegetal. Google. (2/12/2018), Google Earth. Recuperado el 31/7/2018, <https://www.google.com/maps/@-38.9581729,-67.8484758,33143m/data=!3m1!1e3>

En los estudios se trabajó con frutos de manzana (*Malus domestica* Borkh) de las variedades Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Granny Smith, Golden Delicious y Fuji. Las características de los frutos de estas variedades están detalladas en el Capítulo 3 de esta tesis.

Las determinaciones fisiológicas y bioquímicas fueron realizadas en muestras de piel de los frutos. Los frutos de manzana pertenecen al tipo 'Pomo' y están formados por el ovario interno que se suelda al receptáculo, por lo tanto, con la denominación de piel indicamos los tejidos epidérmicos y primeras capas de tejido parenquimático

del receptáculo (se trabajó con muestras de tejidos con un grosor aproximado de 1-2 mm).

3.1. Nivel de síntoma de estrés por alta radiación solar en frutos

En la región del Alto Valle y durante el verano, en los frutos, los tejidos expuestos al sol soportan una combinación de estrés por elevada radiación solar y altas temperaturas. Por lo tanto, en la presente tesis cuando se hace referencia a estrés por elevada radiación solar se trata de la combinación de los factores (energía radiante y calor). Estas condiciones de estrés, características de la Norpatagonia, inducen en los frutos una fisiopatía que se produce durante el cultivo y se denomina daño por sol.

Para clasificar los frutos según el nivel de daño por sol que presentaba la cara expuesta del fruto se utilizó una escala basada en la publicada por Felicetti y Schrader, 2008b (Figura 16).



Figura 16. Grados de daño por sol en frutos de manzana variedad 'Fuji'. NB, sin daño; SB daño por sol. El incremento de la graduación de 1 a 4 se corresponde con el aumento en la severidad del síntoma (Felicetti y Schrader, 2008b).

4. Variables de respuesta

4.1. Determinaciones fisiológicas

4.1.1. Integridad de membranas

Los cambios en la integridad de las membranas se evaluaron mediante la pérdida de electrolitos determinada por la conductividad eléctrica de la solución acuosa en la que se sumergen los tejidos (Hodges y col., 2001). Se extrajeron tres réplicas de 10

discos de 1 cm de diámetro por 1-2 mm de espesor de piel de los frutos que se lavaron, y se introdujeron en tubos de 50 ml conteniendo 35 ml de manitol 0,4 M en agua deionizada. Las muestras se incubaron por 1 h en baño de agua circulante a 24 °C y luego se determinó la conductividad eléctrica de la solución con un conductímetro (OHAUS modelo ST10 C-B). El valor determinado corresponde a la conductividad del tejido en las condiciones de estudio (C_m). Luego, las muestras fueron congeladas por 24 h. Pasado ese tiempo se procedió a descongelarlas y se determinó nuevamente la conductividad eléctrica para obtener la conductividad total (C_t). La pérdida de electrolitos se calculó como el porcentaje de la conductividad del tejido respecto de la conductividad total:

$$\text{Pérdida electrolitos (\%)} = (C_m/C_t) \times 100$$

4.1.2. Contenido relativo de agua

Para la determinación del contenido relativo de agua (CRA) en hojas completamente desarrolladas se extrajeron dos discos de cada lado de la nervadura central de 20 hojas, en los frutos se extrajeron dos discos de piel de 1 cm de diámetro por 1-2 mm de espesor y se registró su peso fresco (PF). Luego fueron sumergidos en agua destilada a 4 °C durante 48 h y nuevamente pesados para obtener el peso a turgencia máxima (PTM). Finalmente, se llevaron a estufa a 48°C durante 72 h y se pesaron para obtener el peso seco (PS). El contenido relativo de agua se expresó en porcentaje según la siguiente formula:

$$CRA \% = \left(\frac{PF - PS}{PTM - PS} \right) \times 100$$

4.1.3. Rendimiento cuántico máximo de fotosistema II (PSII)

Para evaluar el rendimiento cuántico máximo del PSII se midió la fluorescencia de la clorofila a en discos de piel de frutos de 1 cm de diámetro y 1 mm de espesor, previamente adaptados a la oscuridad durante 30 min (Li y col., 2008). Se utilizó un fluorímetro Hansatech Pocket PEA (Hansatech Instruments Limited, Norfolk, UK) ajustando la densidad de flujo fotónico de saturación a 3500 $\mu\text{mol (fotón)} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Cada medición se realizó con una resolución de 120 datos s^{-1} , registrados cada 10 μs

durante los primeros 300 μ s, y luego en intervalos más amplios a medida que la cinética de la señal de fluorescencia disminuyó. Para calcular el rendimiento cuántico máximo del PSII se utilizaron los parámetros intensidad de fluorescencia a 20 μ s (F_0), cuando todos los centros de reacción de PSII están abiertos, y la intensidad de fluorescencia máxima (F_m), cuando todos los centros de reacción de PSII están cerrados. El rendimiento o eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) fue calculada como:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

4.2. Determinaciones químicas y bioquímicas

4.2.1. Concentración de clorofilas

El contenido de clorofila en la piel de los frutos se realizó utilizando la extracción con dimetilsulfóxido (DMSO) y la cuantificación a través de espectrofotometría. Se extrajeron con un sacabocado 3 discos de piel de 1 cm de diámetro y 1 mm de espesor. Los discos fueron pesados y colocados en un tubo de ensayo con 3 ml de DMSO y se incubaron en estufa a 65 °C durante 2 h. Luego, se dejó enfriar durante 15 min y se procedió a medir la absorbancia de la solución a 665,1 nm y 649,1 nm en un espectrofotómetro UV-Vis DU-80 (Beckman Coulter, Alemania). Con los valores de absorbancia, se determinó el contenido de clorofilas a y b utilizando las ecuaciones propuestas por Wellburn (1994):

$$\text{Chl a } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 12,47 \cdot A_{665,1} - 3,62 \cdot A_{649,1}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 25,06 \cdot A_{649,1} - 6,50 \cdot A_{665,1}$$

Donde,

$A_{665,1}$: Absorbancia a 665,1 nm

$A_{649,1}$: Absorbancia a 649,1 nm

4.2.2. Concentración de carotenos

Los carotenos totales (C_{Tot}) se determinaron por espectrofotometría, utilizando el mismo extracto descrito en el inciso anterior. El contenido de C_{Tot} se determinó según Wellburn (1994) a partir de la absorbancia obtenida a 470 nm:

$$C_{Tot} (\mu\text{g ml}^{-1}) = (1000 A_{470} - 1,29 \text{ Chl a} - 53,68 \text{ Chl b}) / 220$$

Donde,

A_{470} : Absorbancia a 470 nm

Chl_a : contenido de clorofila a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

Chl_b : contenido de clorofila b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.2.3. Peroxidación de lípidos

El daño oxidativo en membranas se determinó según Hodges y col. (1999), midiendo la peroxidación de lípidos en términos de concentración de especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARs). Se homogeneizó 0,25 g de piel de fruto (1 mm de grosor) utilizando nitrógeno líquido y 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%.

El homogenato fue centrifugado a 10.000 g y 4°C por 5 min. Una alícuota de 0,5 ml del sobrenadante se colocó en un tubo de ensayo y se le adicionó 2 ml de TCA 20% (TBA-). Otra alícuota de 0,5 ml fue colocada en otro tubo de ensayo con 2 ml de una solución de 0,1% de ácido tiobarbiturico (TBA) preparada en TCA 20% (TBA+). Ambos tubos fueron calentados en baño de agua a 95 °C por 30 min y luego rápidamente enfriados en baño de hielo-agua y se centrifugaron a 10.000 g a 4°C, durante 10 min.

El TBA forma complejos color rojizo con subproductos del proceso de peroxidación de lípidos como el malondialdehído (MDA), lo cual permite su cuantificación espectrofotométrica. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (DU-80 Beckman Coulter, Alemania). Se sustrajo el valor de absorbancia no específica por turbidez, leídas a 440 nm y a 600 nm. Las mismas lecturas se realizaron para las muestras sin reaccionar con el TBA (TBA-). Este último valor se restó al anterior, eliminando de esa manera la interferencia de pigmentos y otros compuestos que absorben a la misma longitud de onda. Para el cálculo, se utilizó el coeficiente de extinción molar del malondialdehído ($c=157 \text{ mM}^{-1}$

$^1\text{cm}^{-1}$ a 532 nm) dado que es el principal producto de la peroxidación lipídica de membranas reactiva al TBA.

La concentración del complejo MDA/TBA fue calculada según se observa en la siguiente ecuación.

$$MDA[nmol\ ml^{-1}] = \left[\frac{(A_{TBA+532} - A_{TBA+600}) - (A_{TBA-532} - A_{TBA-600}) - ((A_{TBA+440} - A_{TBA+600}) \times e)}{c} \right] \times 10^6$$

Donde,

A: absorbancia

c: coeficiente de extinción a 532 nm = $157.000\ M^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Hodges y col. 1999).

E: absorción molar de azúcares a 532 nm / absorción molar de azúcares a 440 nm = 0,057142857 (Hodges y col. 1999).

4.2.4. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó a partir de la reacción de reducción del radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ante la presencia de compuestos antioxidantes como ácido ascórbico, ácido isoascórbico, isoeugenol, ácido rosmarínico y α -tocoferol, etc. (Brand-Williams y col. 1995). El radical DPPH, de color azul-violeta, presenta un máximo de absorción a 516 nm, pero al reducirse se decolora a amarillo pálido.

La capacidad antioxidante, así como el contenido de polifenoles totales y antocianinas monoméricas totales se midió en un extracto metanólico ácido de las muestras. Se trituraron 0,25 g de tejido con nitrógeno líquido, homogenizando con 2 ml de metanol ácido al 80%. El homogenato se agitó durante 2 h a 150 rpm, temperatura ambiente y en oscuridad, luego se centrifugó a 16.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante fue conservado a -20°C .

Para la determinación de capacidad antioxidante se incubó 20 μl del extracto metanólico con 780 μl de solución de DPPH 0,1 mM en metanol, durante 30 min, en oscuridad y a 4°C . Luego se registró la absorbancia a 516 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (DU-80 Beckman Coulter, Alemania). La absorbancia de la muestra se comparó con la de un blanco constituido por 20 μl de agua bidestilada con 780 μl de

solución de DPPH. La capacidad antioxidante fue expresada como el porcentaje de inhibición del radical y se calculó según se observa en la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad Antioxidante} = (\% \text{ Inhibición}) = [(B - A) / B] * 100$$

Donde:

A: absorbancia de la muestra

B: absorbancia del blanco

Un incremento en el porcentaje de inhibición se corresponde con el aumento de la capacidad antioxidante.

4.2.5. Antocianinas monoméricas totales

El contenido de antocianinas monoméricas totales se determinó por espectrofotometría con el método de pH diferencial. El fundamento del método radica en el cambio estructural de las antocianinas ante un cambio en el pH, manifestando un cambio en el color.

Para esta determinación se utilizó el extracto en metanol ácido obtenido previamente (Ítem 4.2.4.). Se dejaron reaccionar 100 µl de extracto con 300 µl de KCl 0,025 M pH 1, y por otro lado, 100 µl del extracto con 300 µl de buffer HAC/NaAc 0,4 M pH 4,5. Se midió la absorbancia a 510 y 700 nm. El contenido de antocianinas se expresó en mg de cianidina-3-glucósido en 100 mg de tejido según las siguientes ecuaciones (Giusti and Wrolstad, 2001).

$$A_{muestra} = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}$$

$$AMT [mg.l^{-1}] = \frac{(A_{muestras} \times PM \times FD \times 1000)}{\epsilon \times L}$$

Donde,

A_{510} = Absorbancia a 510 nm

A_{700} = Absorbancia a 700 nm

$AMT [mg.l^{-1}]$ = antocianinas monoméricas totales

$PM = 449,2 [g.mol^{-1}]$ cianidina – 3 – glucosido

FD = factor de dilución

ϵ = coeficiente de extinción molar: $29600 l.mol^{-1}.cm^{-2}$

L = ancho de celda en cm

4.2.6. Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó por espectrofotometría basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. Los compuestos fenólicos reaccionan con un agente oxidante, como el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 760 nm (Škerget y col., 2005). Para esta determinación se utilizó 20 µl del extracto metanólico obtenido previamente (Ítem 4.2.4.) diluido (al 25%), 100 µl de reactivo de Folin- Ciocalteu y 1,58 ml agua bi-destilada. Se dejó en reposo 8 min en oscuridad. Luego se agregó 300 µl de Na₂CO₃ 20% p/v y se dejó en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente, y finalmente se midió la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800). Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón una solución de ácido gálico anhidro 5 g/l (Biopack) (Emmons, Peterson y Paul, 1999). Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por 100 g de tejido fresco.

4.2.7. Determinaciones enzimáticas

4.2.7.1. Preparación del extracto proteico

Se pulverizaron 2 g de piel de manzana (1 mm de grosor) en mortero con nitrógeno líquido. Al polvo de tejido se lo suspendió en 10 ml de buffer fosfato de potasio 100 mM (pH 7,8) que contenía 0,5% (v/v) Triton X-100 para aumentar la extractabilidad de la enzima. Se agregó 1 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) para adsorber fenoles, dado que la manzana contiene elevados niveles de estos compuestos que interfieren en la extracción y en las determinaciones enzimáticas (Serradell y col., 2000). La mezcla fue dializada toda la noche a 5 °C contra el mismo buffer, con membrana con un tamaño de corte de 10 kDa, y luego fue centrifugada a 22.000 g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue recolectado y conservado a -20 °C para las posteriores determinaciones de actividad enzimática (Abassi y col., 1998), que se realizaron mediante espectrofotometría usando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800.

4.2.7.2. Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad enzimática fue medida en base a la inhibición de la oxidación de NADH mediante radicales superóxido en presencia de SOD (modificación de Paoletti y col., 1986). La reacción de oxidación, en presencia de cantidades adecuadas de EDTA Mn^{2-} y 2-mercaptoetanol, se realiza por una reacción en cadena de radicales libres que involucra la oxidación de grupos tiol y reducción univalente de O_2 . El agregado de SOD al medio de reacción causa una inhibición proporcional a la tasa de oxidación del NADH.

El medio de reacción fue 800 μ l de buffer trietanolamina-dietanolamina (Tea-Dea) 100 mM (pH 7,4), 100 μ l de solución EDTA 100 mM más $MnCl_2$ 50 mM (pH 7,0), 40 μ l NADH 7,5 mM; a esta mezcla se le agregó 5-25 μ l de muestra (o agua o buffer), 100 μ l mercaptoetanol 10 mM, se mezcló suavemente, se dejó reaccionar durante 10 min a 20 °C y luego se midió el decrecimiento en la absorbancia a 340 nm durante 5 min. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que reduce a la mitad la velocidad de oxidación del NADH, tomando como referencia una cantidad inicial de NADH equivalente a una unidad de absorbancia. Para el cálculo de las unidades de SOD presentes en las muestras se usó la fórmula:

$$V_{SOD} = V_{MAX} / [1 + (Vol / K_{0,5})]$$

Donde,

V_{SOD} : velocidad de oxidación de NADH en presencia de muestra.

V_{MAX} : velocidad de oxidación de NADH control, en ausencia de SOD.

Vol: volumen de muestra empleado.

$K_{0,5}$: volumen de muestra que contiene una unidad de SOD, expresado en las mismas unidades que Vol.

Para el cálculo se empleó una linealización de la expresión según:

$$1/ V_{SOD} = 1/ V_{MAX} + [1/ (V_{MAX} \cdot K_{0,5})] \cdot Vol$$

Las determinaciones se realizaron en al menos 3 volúmenes diferentes de cada muestra.

4.2.7.3. Actividad de catalasa (CAT)

La actividad de CAT fue determinada siguiendo la disminución de H_2O_2 en el medio de reacción (Ma y Cheng, 2003), a través de la medición de la caída de la absorbancia a 240 nm (coeficiente de extinción igual a 40 $mM^{-1} cm^{-1}$). El medio de

reacción estuvo constituido por 2,5 ml de sustrato de reacción (168 μl de H_2O_2 100 vol. En 60 ml de buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0) a los que se agregó 50 μl de muestra. La actividad de CAT fue expresada en $\mu\text{moles consumidos por tiempo por peso fresco de la muestra}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$).

4.2.7.4. Actividad de Glutación Reductasa (GR)

La actividad enzimática de GR se determinó siguiendo la técnica de Schaedle y Bassham (1977) modificada por nosotros, mediante el seguimiento cinético del consumo de NADPH_2 dependiente de GSSG en condiciones saturantes a 340 nm (coeficiente de extinción $5,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El medio de reacción fue 700 μl de buffer de reacción (buffer fosfato de potasio 143 mM pH 7,5, EDTA 6,3 mM, NADPH 0,21 mM) al que se le agregó 300 μl de muestra. La reacción se inició agregando 10 μl de GSSG 50 mM. Las mediciones fueron corregidas sustrayendo la actividad inespecífica de NADPH oxidasas, medida en ausencia de GSSG (Grace y Logan, 1996). La actividad de GR fue expresada en $\mu\text{moles consumidos por tiempo por peso fresco de la muestra}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$).

4.2.7.5. Actividad de ascorbato peroxidasa (APX)

La actividad de APX se midió siguiendo la oxidación del ascorbato, que provoca la disminución de la absorbancia a 290 nm (coeficiente de extinción $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Mishra y col., 1993). El ensayo fue realizado a 20 °C y el medio de reacción contenía buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, ascorbato de Na 0,5 mM, 0,1 mM de H_2O_2 y 100 μl de muestra. La reacción se inició con el agregado de H_2O_2 y el cambio en la absorbancia se midió desde 10 a 30 segundos después de la adición del H_2O_2 . Se realizó una corrección con el dato de la oxidación del ascorbato por el H_2O_2 en ausencia de la muestra. La actividad de APX fue expresada en $\mu\text{moles consumidos por tiempo por peso fresco de la muestra}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$).

4.2.8. Determinación de hormonas vegetales

4.2.8.1. Concentración de ácido abscísico

Las determinaciones de ABA fueron realizados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias Naturales, Facultad Ciencias Exactas, Físico-

Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Los análisis se realizaron en muestras de piel de fruto liofilizados, por el método modificado de Durgbanshi y col. (2005). Como estándares internos se adicionaron 50 ng de [²H₆]-ABA. La separación cromatográfica se realizó con un HPLC Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una columna de fase reversa C18 (100 mm x 2,1 mm, 3- μ m), el cual se encuentra acoplado con un espectrómetro de masa con triple cuadrupolo (Quattro Ultima pt; Micromass, Manchester, UK), realizándose la ionización por electrospray en forma negativa (ESI-).

La identificación y cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples). La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones parentales y sus transiciones para ABA: 263>153 y para su estándar interno 268>159. El Software utilizado fue MassLynx TM v. 4.1, Micromass, Manchester, UK). Las determinaciones son expresadas en pmol g⁻¹ de peso seco.

4.2.8.2. Concentración de poliaminas

Las determinaciones de poliaminas se realizaron en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús (IIB-INTECH-UNSAM-CONICET). Se midieron poliaminas libres a través de la derivatización con cloruro de dansilo y su separación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo a la metodología propuesta por (Campestre y col., 2011).

La extracción se realizó en 0,25 g de tejido epidérmico de frutos de manzana que fueron homogeneizados en mortero con 2 ml de ácido perclórico 0,2 N. El extracto obtenido se colocó en baño de hielo durante 1 h y luego se centrifugó durante 15 min a 14.000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue separado y colocado en freezer a -20°C para su posterior dansilación.

Para la dansilación se tomaron 60 μ l del extracto descongelado y se le añadieron 6 μ l de Heptanodiamina (Htd) 0,1mM como estándar interno. Se le añadieron 60 μ l de una solución de carbonato sódico saturada y 75 μ l de una solución de cloruro de dansilo en acetona (10 mg ml⁻¹). Se colocó en estufa a 70°C durante una hora y luego se enfrió en baño de hielo. La dansilación se detuvo con el agregado de 20 μ l de solución de prolina (100 mg ml⁻¹ de agua destilada) dejando incubar durante 30 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Luego, los derivados dansilados se

extrajeron añadiendo 200 μl de tolueno a la mezcla de reacción, se agitó en vortex y se centrifugó 5 min a 10.000 rpm a 20°C para separar las dos fases. Se extrajeron 175 μl de la fase orgánica, la cual fue evaporada mediante vacío y el residuo fue resuspendido en 40 μl de acetonitrilo previamente filtrado. Las muestras fueron agitadas en vortex y luego centrifugadas 10 min a 10.000 rpm.

La separación de poliaminas dansiladas se realizó mediante un cromatógrafo HPLC Waters 1525. Se utilizó una columna de fase reversa Luna C18 (Phenomenex) y la detección se realizó con un espectrofluorómetro Waters 2475 a una longitud de onda de 415 nm de excitación y 510 nm de emisión. El flujo del solvente fue de 1,5 ml min^{-1} , utilizando el siguiente protocolo de elución: acetonitrilo- H_2O 70:30 (0-4,5 min); acetonitrilo 100 (4,5-9 min); acetonitrilo- H_2O 70:30 (9-15 min). En la Figura 17 se observan los tiempos de retención correspondientes a Putrescina (Put; 6,85 min), Heptanodiamina (Htd; 7,55 min), Espermidina (Spd; 8,08 min) y Espermina (Spm; 9,17 min).

Los cálculos de las concentraciones se realizaron integrando el área de los picos del cromatograma normalizados según el área de Htd e interpolados con la curva de calibración de las poliaminas estándar (Figura 17).

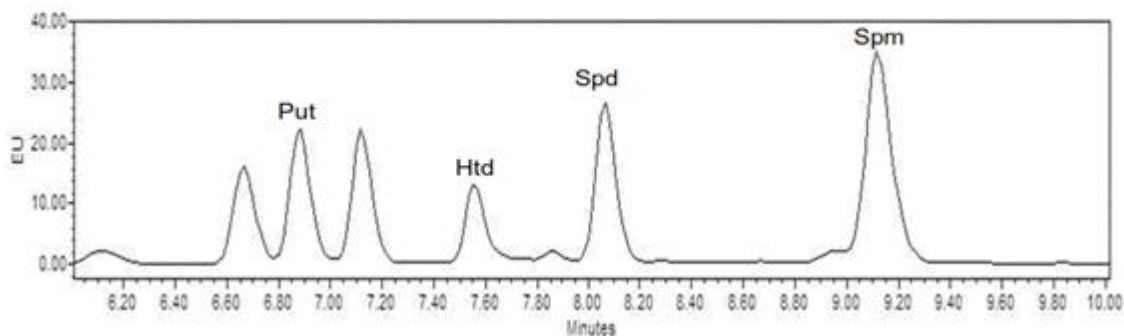


Figura 17. Tiempo de retención de las diferentes poliaminas (Put, Spd y Spm) y estándar (Htd) a través de la separación por HPLC.

4.2.8.3. Emisión de etileno

Las determinaciones de etileno se realizaron en los laboratorios de INTA EEA Alto Valle. Se utilizaron 3 muestras constituidas por 3 frutos para cada tratamiento. Los frutos fueron colocados en contenedores de vidrio herméticamente sellados de 1,5 L durante 60 min a temperatura constante de 20°C. Luego se extrajo una muestra de 1 ml de gas de la parte superior del recipiente y se analizó por cromatografía

gaseosa (GC-14A, Shimadzu, Kyoto, Japan) utilizando una columna de alúmina y detector de ionización de llama FID (Calvo y Sozzi, 2009). Las temperaturas del inyector, el horno y el detector fueron de 110, 90 y 240 ° C, respectivamente. Se usó helio como gas portador a una velocidad de flujo de 0,37 ml s⁻¹ (velocidad lineal del gas= 4,5 cm s⁻¹). Los resultados se expresaron como nanogramos de etileno producido por gramo de fruta en 1 hora (ng g⁻¹ h⁻¹).

5. Análisis estadístico

Tamaño de las muestras

El tamaño de la muestra varió según la variable de respuesta a medir. En las variables contenido relativo de agua, pérdida de electrolitos e integridad del PS II, el número de individuos estudiado fue 15. Las variables bioquímicas se midieron sobre 5 repeticiones, exceptuando emisión de etileno y concentración de ABA que se valoró sobre 3 réplicas.

Supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas

La determinación de normalidad de los datos se realizó utilizando el estadístico Shapiro-Wilks modificado por Mahibbur y Govindarajulu, y la homogeneidad de las varianzas fue controlada a través de la prueba de Levene (análisis de la varianza de los residuos absolutos). Para la verificación del cumplimiento de supuestos del modelo también se recurrió a apreciaciones gráficas (box-plots de residuos estudentizados, gráficos de residuos estudentizados versus predichos y Q-Q plot normales).

Métodos de análisis

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando análisis de la varianza (ANOVA) uni o bifactorial (con interacción), modelos lineales generales y mixtos, análisis de componentes principales y análisis de conglomerados a través del programa estadístico InfoStat en interfase con la plataforma R (Di Rienzo y col., 2016).

Cuando en el ANOVA se determinaron diferencias significativas, las comparaciones de medias fueron hechas usando la prueba de igualdad de medias mediante el test DGC ($p < 0,05$) (Di Rienzo y col., 2002). El nivel de significación estadístico se estableció en $\alpha = 0,05$ y se utilizó a la media como estadístico descriptivo.

CAPITULO I

Variación del sistema antioxidante, poliaminas, ABA y etileno en piel de manzanas que presentan distintos grados de daño por sol

INTRODUCCIÓN

En los frutos de manzana que se desarrollan con una cara expuesta a estrés por elevada radiación solar y temperaturas, frecuentemente, se desarrolla un desorden fisiológico que en la presente tesis optamos por denominar “daño por sol”. A lo largo del tiempo se emplearon distintos términos para definir esta fisiopatía, tales como, “quemado de sol” y “asoleado”. Consultando bibliografía en inglés aparecen los términos “sunburn”, “sun/solar injury”, “heat injury” y “sunscald” (Racsco y Schrader, 2012; Munné-Bosch y Vincent, 2019; Morales-Quintana y col., 2020). Este último vocablo, actualmente se ha dejado para nombrar el desorden poscosecha que se presenta en la zona del fruto que ha desarrollado daño por sol a campo (Racsco y Schrader, 2012).

Un reporte de Barber y Sharpe (1971) menciona que esta fisiopatía fue descrita por primera vez a mediados del siglo pasado por Walker, J.C. en el libro titulado “Diseases of Vegetable Crops”. Para ese tiempo, ya se informaba que el daño por sol causaba importantes pérdidas económicas en gran variedad de cultivos frutales y hortícolas (pimientos, tomates, zapallo, uva, duraznos, melones, frutillas, manzanas y naranjas). La manzana es uno de los cultivos más afectados, debido a que el daño por sol produce cambios morfológicos y altera la composición de los pigmentos, lo que disminuye la calidad visual del fruto. Esta situación implica que los frutos afectados sean descartados o comercializados a precios bajos. El daño por sol se considera un problema económico grave en todas las regiones productoras de manzana del mundo. Las pérdidas anuales de producción debido a esta fisiopatía pueden variar entre 10% a 50% dependiendo de la variedad, la tecnología aplicada al cultivo y el rigor del clima (Gindaba y Wand, 2005; Schrader y col., 2008; Colavita, 2008; Munné-Bosch y Vincent, 2019).

A lo largo de los últimos veinte años se fueron diferenciando distintos tipos de daño por sol en frutos de manzana. Los primeros dos tipos identificados fueron el daño por sol relacionado con la necrosis de los tejidos y el asociado con síntomas de amarronamiento de la piel (Schrader y col., 2001). Luego, se describió el daño por sol de tipo fotooxidativo (Felicetti y Schrader, 2008a). Los distintos tipos de daño por sol están descriptos en detalle en la Introducción de la tesis. El presente capítulo está

basado en el trabajo realizado con frutos que manifestaron el daño por sol de tipo amarronamiento o bronceado, que según Felicetti y Schrader (2008b) se puede diferenciar en distintos grados según la intensidad del síntoma (Figura 3, sección Materiales y Métodos Generales).

El daño por sol de tipo bronceado o amarronamiento es el que más frecuentemente se produce en frutos unidos a la planta. Este tipo de daño por sol no puede ser inducido experimentalmente en laboratorio con entornos controlados. El síntoma que se observa en la cara de la manzana expuesta al sol es una mancha amarilla-marrón perfectamente circular (Racsco y Schrader, 2012). Esta coloración se ha relacionado con una disminución del contenido de clorofila y antocianina, y un aumento de la concentración de carotenoides y de quercetina (Felicetti y Schrader, 2009). La coloración es superficial y no penetra en el mesocarpio de la fruta. Se comprobó que no hay diferencias significativas en la conductividad de electrolitos entre manzanas con daño por sol tipo amarronamiento y manzanas sanas, lo que indica que esta fisiopatía es un evento subletal para las células (Schrader y col., 2001). El daño por sol de tipo bronceado o amarronamiento ocurre en los frutos cuando la cara expuesta al sol registra una temperatura superficial entre 46-49 °C, durante 45-60 minutos (Schrader y col., 2001). Además de dicho umbral de temperatura en la superficie del fruto, se requiere luz solar para que se produzca daño por sol de tipo bronceado. La energía solar es necesaria para el desarrollo de los síntomas dado que no se produce cuando las manzanas son calentadas en la oscuridad (Schrader y col., 2001) lo que sugiere que diferentes componentes de la luz solar intervienen en su desarrollo. Se demostró que la radiación ultravioleta-B (UV-B, 280-320 nm) está implicada debido a que cuando se utilizan filtros para la misma, la incidencia de este tipo de daño por sol se reduce (Schrader y col., 2003).

El daño de sol es causado por elevada radiación solar y temperatura que derivan en estrés oxidativo en los tejidos expuestos (Naschitz y col., 2015). El estrés oxidativo provoca modificaciones en las biomoléculas causando la pérdida parcial o completa de actividades fisiológicas. Entre ellos, la peroxidación lipídica conduce al daño de las membranas, colapso de su función barrera, desintegración de orgánulos, oxidación y disfunción de proteínas, ADN y ARN (Demidchik, 2015). Los productos terminales de la peroxidación lipídica como el malondialdehído pueden ser medidos fácilmente y por lo tanto son usados como marcadores de estrés oxidativo (Hodges y col., 1999). En

manzanas, los tejidos que presentan daño por sol tienen mayor contenido de malondialdehído y de H₂O₂ (Chen y col., 2008).

El sistema de defensas antioxidante de los tejidos de manzanas expuestos al sol es activado, pero si las condiciones de estrés persisten, pueden resultar insuficientes para evitar el daño en las biomoléculas (Racsco and Schrader, 2012). Dentro de los metabolitos desarrollados en manzanas como protección al estrés por elevada radiación solar y temperatura se han reportado las antocianinas y compuestos fenólicos (Felicetti y Schrader, 2009b; Feng y col., 2013). En las variedades de manzanas y peras que tiene piel roja se determinó mayor capacidad de fotoprotección tanto por mayor concentración de antocianinas como de compuestos fenólicos (Felicetti y Schrader, 2009b; Li y col., 2008; Feng y col., 2013; Li y col., 2013; Chen y col., 2019).

Las antocianinas se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas, actuando como filtros bioquímicos naturales en las longitudes de onda correspondientes a la radiación UV y azul, ejerciendo efectos fotoprotectores (Merzlyak y col., 2008). A pesar de la capacidad fotoprotectora de las antocianinas, si las condiciones de radiación y temperatura superan los límites de tolerancia se produce la degradación de las mismas. Esto explica la disminución de la coloración de la piel de las manzanas a medida que aumenta la intensidad de daño por sol. La pérdida de clorofilas y la disminución de antocianinas en la piel quemada por el sol permiten que los colores amarillos de los carotenoides y los glucósidos de quercetina sean más evidentes (Felicetti y Schrader, 2008).

Los compuestos fenólicos, sumado a las antocianinas, contribuyen a la absorción de las radiaciones UV y azul del espectro y actúan como captadores de moléculas de especies reactivas de oxígeno (Solovchenko y Merzlyak, 2008). Estudiando manzanas variedad Golden Delicious y Braeburn bajo condiciones meteorológicas favorables para el desarrollo de daño por sol, se ha reportado aumento en la concentración de compuestos fenólicos. Si bien estos compuestos son altamente antioxidantes, cuando se acumulan en la piel con daño por sol contribuyen a producir los síntomas visibles como parches marrones (Zupan y col., 2014). Felicetti y Schrader (2009b) determinaron que la concentración de compuestos fenólicos aumenta a medida que se incrementa el daño por sol en los tejidos de variedades de manzanas

con frutos rojos y verdes. En Este comportamiento se observó en todas las variedades estudiadas.

Además de los compuestos previamente descritos, la maquinaria antioxidante frente a condiciones que promueven daño por sol en piel de manzanas involucra la activación de enzimas (Morales-Quintana y col., 2020). Las enzimas antioxidantes ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa mostraron un patrón diurno similar al de la intensidad de flujo fotónico incidente (Cheng and Ma, 2004). Se ha determinado que en la piel de manzanas expuestas al sol hay mayor actividad de las enzimas del ciclo del glutatión-ascorbato que en la cara sombreada del mismo fruto (Ma y Cheng, 2003). No obstante, el aumento de la actividad de estas enzimas frente a la exposición de manzanas a elevada radiación y temperatura esta regulación no proporciona suficiente protección contra la fotooxidación (Chen y col., 2008). Si bien otros estudios acuerdan en el aumento de actividad de enzimas como superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa, reportan disminución de actividad monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa a medida que aumentó la gravedad de las quemaduras solares (Zhang y col., 2015).

Durante la respuesta antioxidante frente a estrés abiótico se requiere un alto grado de coordinación y equilibrio en el cual intervienen hormonas en la señalización y activación de las rutas metabólicas en diferentes compartimientos celulares (Suzuki y col., 2012; Bartoli y col., 2013). En la respuesta de los tejidos de manzanas, frente a condiciones climáticas que promueven daño de sol, recientemente se ha reportado la participación de hormonas vegetales, (Morales-Quintana y col., 2020). Se ha informado que las concentraciones de etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico y ABA aumentan significativamente en frutas con daño por sol moderado (Torres y col., 2017). Estos autores proponen que existe un 'crosstalk' entre estas fitohormonas para modular los cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales en el tejido de la fruta expuesta a condiciones fotooxidativas y calor. Sumado a estas evidencias, trabajos realizados en Japón con aplicaciones exógenas de ABA sobre manzanas indican una reducción del daño por sol (Iamsu y col., 2009). Existe poca investigación en este tema, los resultados en la bibliografía son contradictorios. En estudios realizados bajo las condiciones climáticas en Sudáfrica, se concluyó que aplicaciones

foliares de ABA eran ineficientes para aliviar el daño por sol en manzanas var. Granny Smith (Mupambi y col., 2018).

Otras sustancias que regulan procesos celulares y activan la capacidad antioxidante enzimática y no enzimática son las poliaminas (putrescina, espermina y espermidina) (Kaur-Sawhney y col., 2003; Fariduddin y col., 2013; Calzadilla y col., 2014). Existen escasos estudios realizados sobre la participación de las poliaminas en la respuesta a condiciones de estrés en frutos de Pomaceas. Una investigación realizada en peras indicó que una correlación positiva entre la capacidad de sintetizar poliaminas y la adaptación a estrés salino y por cadmio (Wen y col., 2011). Por otra parte se ha observado que la síntesis de poliaminas en manzanas varía según la temperatura y concentración de CO₂ del ambiente, como sucede en las cámaras refrigeradas para almacenamiento (Shelp y col., 2019). Estos resultados indican que posiblemente las poliaminas están involucradas en la respuesta antioxidante frente a condiciones de estrés que promueven daño por sol.

Objetivo

El objetivo fue analizar la variación en el sistema antioxidante, la concentración de poliaminas y ABA y la emisión de etileno en frutos que presentan tejidos con distintos grados de daño por sol.

Hipótesis

- 1- En frutos de manzana, el sistema antioxidante, la concentración de poliaminas y ABA y la emisión de etileno presentan diferencias en función al nivel de síntoma de daño por sol de sus tejidos.
- 2- El sistema de defensas antioxidante y hormonal se activa frente al estrés por alta radiación y temperatura.

1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.1. Sitio de estudio y condiciones climáticas

El estudio fue llevado a cabo con fruta cosechada de parcela de manzanos implantada en la chacra experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue (km 12, ruta 151, Cinco Saltos, Río Negro). Las

plantas eran de 15 años y estaban conducidas en espalderas, plantadas con una separación de 2,7 m entre plantas x 4,0 m entre filas orientadas de este a oeste. La parcela recibió las pautas de cultivo y tecnología establecidas por los estándares del INTA, Estación Alto Valle.

Las condiciones meteorológicas para la temporada productiva 2015-16 fueron las características para la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Registros meteorológicos de la temperatura y radiación máxima registrada en cada mes, para las temporadas de crecimiento de frutos 2015-16. Datos obtenidos en la estación Agroclimatológica-Cinco Saltos, Río Negro (Lat: 38° 50' 41" S, Long: 68° 04' 09" O, elevación: 282 msnm)

Variables climatológicas	Meses		
	Diciembre	Enero	Febrero
Temperatura máx. (°C)	37,3	38,1	35,7
Radiación máx. ($W m^{-2}$)	1317	1359	1206

1.1.2. Material vegetal

Las determinaciones de las variables de respuestas fueron realizadas en frutos de manzana de las variedades Red Delicious y Granny Smith en momento de cosecha (15/02/2016 y 02/03/2016, respectivamente). La cosecha se realizó según los índices de madurez para inicio de cosecha de cada variedad determinados por Calvo y col. (2012):

Variedad	Firmeza de pulpa (lb)	Sólidos Solubles (%)	Acidez Titulable ($g l^{-1}$)	Degradación Almidón (%)
Red Delicious	16-18,5	≥ 10	3-4	20-25
Granny Smith	14,5-16	10-11	8-8,5	20-30

1.1.3. Determinaciones de variables de respuesta

1.1.3.1. Incidencia de fisiopatía daño por sol

Para evaluar el daño por sol, por cada variedad se seleccionaron cinco árboles homogéneos de un diámetro basal de tronco aproximado a 20 cm y altura 3,5 m con una carga frutal de 300-350 frutos. Se cosecharon los árboles completos y se clasificó la totalidad de los frutos según el síntoma de daño por sol. Los niveles de daño se determinaron visualmente sobre la superficie de los frutos clasificándolos según una escala generada sobre la base de la publicada por Felicetti y Schrader (2008b). Los niveles de síntomas presentes en las caras expuestas al sol se observan en la Figura 1.1 y se describieron de la siguiente manera:

- Sano: frutos sin daño por sol, no presentaban ningún signo de daño o deterioro a causa de exposición al sol.
- Daño leve (DS-1): los frutos presentaban una leve decoloración o coloración amarillenta en la zona afectada. Un cierto porcentaje de ellos puede ingresar al mercado en niveles de calidad bajos.
- Daño moderado (DS-2): los frutos presentaban una coloración bronceada a marrón en la zona afectada. Estos frutos no son comercializables bajo ningún grado de calidad.
- Daño grave (DS-3): los frutos presentaban coloración marrón intensa y algunas manchas de tejido necrótico. Estos frutos no son comercializables.

Se registraron las frecuencias absolutas y relativas de fruta dañada y no dañada. Los datos fueron expresados en porcentaje de frutos por cada nivel de daño determinado, por lo cual los test estadísticos se realizaron sobre los valores previamente transformados a arcoseno para lograr la normalidad (Contreras y col., 2008).

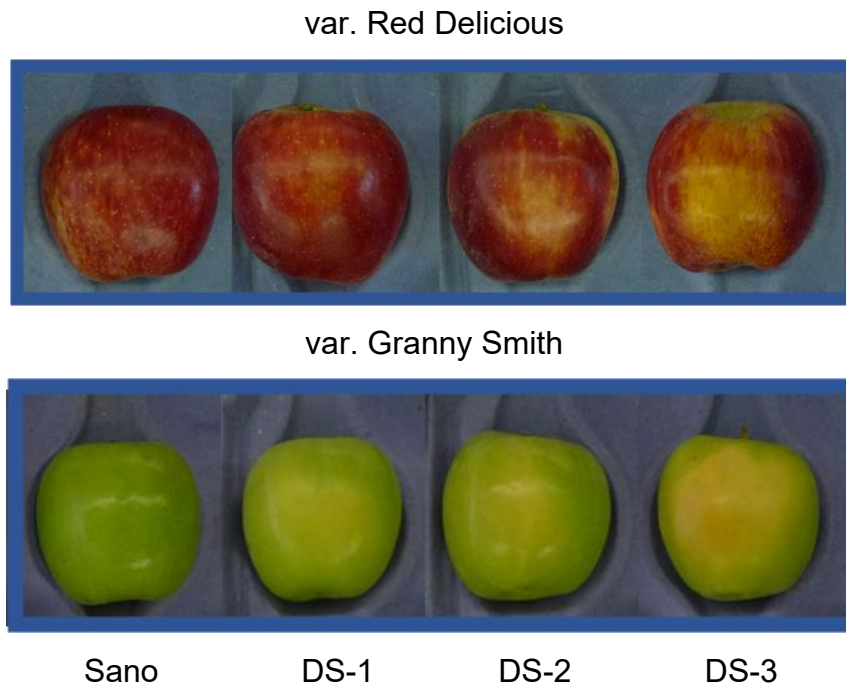


Figura 1.1: Grados de daño por sol en frutos de manzana var. Red Delicious y Granny Smith. Sano, sin daño; DS daño por sol correspondiendo el incremento del número al aumento de la severidad del síntoma.

1.1.3.2. Variables bioquímicas

La mayoría de los parámetros bioquímicos fueron evaluados en tejidos de la piel de la cara expuesta al sol de los frutos. La excepción fue la medición de la emisión de etileno, que fue realizada en frutos enteros que presentaban los diferentes niveles de daño por sol.

Se evaluó: peroxidación de lípidos, capacidad antioxidante por DPPH, polifenoles totales, concentración de antocianinas, actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX y GR, emisión de etileno, concentración de poliaminas (putrescina, espermina y espermidina) y concentración de ABA. Estas metodologías están detalladas en la sección Materiales y Métodos Generales.

1.1.4. Análisis estadístico

Las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas se determinaron por el test de Lilliefors y de Levene, respectivamente. En todos los casos en los cuales se

comparaban las medias de las variables de interés, se realizaron pruebas de DGC con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$).

1.2. RESULTADOS

Los frutos que crecen con una cara expuesta a la combinación de elevada radiación solar y altas temperaturas presentan distintos grados de daño por sol según la intensidad y tiempo de duración de estos factores climáticos. El estudio de las condiciones oxidativas de los tejidos permitió evaluar la intensidad del estrés que estas condiciones ambientales provocaron en los tejidos. Por otra parte, para entender la respuesta de los tejidos a las situaciones de estrés oxidativo impuestas por el ambiente se analizó la síntesis de compuestos como antocianinas y fenoles, la actividad de enzimas antioxidantes y los cambios en las hormonas relacionadas al estrés, en frutos de dos variedades de manzana, con diferentes niveles de daño por sol.

1.2.1. Incidencia de daño por sol

En ambas variedades se registraron frutos afectados por distintos grados de daño por sol, determinándose un porcentaje de frutos sanos de 78,5 % en la var. Red Delicious y de 66,2 % en Granny Smith (Figura 1.2).

En la var. Red Delicious, se observaron diferencias significativas entre todos los frutos que presentaban diferentes niveles de daño de sol. Los frutos que presentaban DS-3 (4,3 %) fueron significativamente menos que los que tenían síntoma DS-2 (7 %) y lo mismo entre estos últimos y los DS-1 (10,2 %). En la var. Granny Smith los frutos con DS-3 y DS-2 alcanzaron aproximadamente el 9 %, distinguiéndose claramente de los que presentaban daño DS-1, que duplicaron dicho valor de incidencia de daño por sol.



Figura 1.2: Porcentaje de frutos de manzana var. Red Delicious y Granny Smith con síntoma creciente de daño por sol (Sano, DS-1, DS-2 y DS-3; descripción presentada en la Figura 1.1). Las barras indican la media ($n=300$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras de cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

1.2.2. Indicadores de estrés oxidativo

La peroxidación de los lípidos de membranas celulares, fue significativamente ($P \leq 0,05$) mayor en los tejidos que presentaron daño de sol respecto de los sanos. Esta situación fue más marcada en la var. Red Delicious, donde se observó un incremento del 170 % en los TBARs en promedio en los frutos con daño respecto de los sanos, mientras que en Granny Smith dicho incremento fue del 68 % (Tabla 1.2). A su vez, en la var. Granny Smith el contenido de TBARs se incrementó de 59,8 nmol.g^{-1} PF en DS-1 a cerca de 80 nmol.g^{-1} PF en los de mayor grado de daño. En la var. Red Delicious, si bien se observó una tendencia en el aumento de la peroxidación de los tejidos a medida que se agrava el daño por sol esta no fue significativa entre diferentes niveles de daño.

Tabla 1.2: Peroxidación de lípidos de membranas celulares (medido por especies reactivas al ácido tiobarbiturico, TBARs) y capacidad antioxidante (determinada usando diphenylpicrylhydrazyl, DPPH) en tejidos de piel de frutos de manzana var. Red Delicious y Granny Smith con diferentes niveles de daño por sol. DS: daño por sol correspondiendo el incremento en número al aumento en la severidad del síntoma (descripción presentada en la Figura 1.1)

Nivel de daño	TBARs (nmol.g ⁻¹ PF)		DPPH (% de inhibición)	
	Red Delicious	Granny Smith	Red Delicious	Granny Smith
Sano	43,8 a	42,8 a	36,8 a	31,4 a
DS-1	94,5 b	59,8 b	59,6 b	40,8 b
DS-2	128,9 b	80,0 c	49,1 b	44,2 b
DS-3	132,9 b	75,5 c	52,1 b	52,9 c

Los valores son la media (n=5). Letras distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

Se comparó la capacidad antioxidante de frutos sanos y expuestos a daño por sol, y se observó que el aumento en el estrés oxidativo en los tejidos provocaba un incremento significativo ($P \leq 0,05$) en el sistema de defensa (capacidad antioxidante) en los frutos con daño de sol (Tabla 1.2). Entre frutos sanos y los de mayor grado de daño se determinó un aumento de la capacidad antioxidante de 68 % para Granny Smith y de 41 % para Red Delicious. Las diferencias entre los distintos grados de daño por sol siguieron el mismo patrón que en la peroxidación de lípidos para ambas variedades.

1.2.3. Variación en compuestos antioxidantes

Los polifenoles totales fueron mayores en los tejidos estresados de ambas variedades (Tabla 1.3). Entre tejidos sanos y DS-1 el aumento fue en promedio 40 %.

En ambas variedades, se observó que los frutos con daño por sol presentaban mayor contenido de polifenoles totales que los frutos sanos. En Red Delicious la concentración de polifenoles presentó tendencia a incrementar a medida que aumentó el nivel de daño, aunque no se pudieron determinar diferencias significativas ($P \leq 0,05$). En cambio, en la var. Granny Smith la concentración de polifenoles fueron

significativamente mayores cuanto más grave era el síntoma de daño de sol de los tejidos.

Tabla 1.3: Polifenoles totales y antocianinas monoméricas totales (AMT) en tejidos de piel de frutos de manzana var. Red Delicious y Granny Smith con diferentes niveles de daño por sol. DS: daño por sol, correspondiendo el incremento en número al aumento en la severidad del síntoma (descripción presentada en la Figura 1.1)

Nivel de daño	Polifenoles totales (mg GAE 100g ⁻¹ PF)		AMT (mg cy-3-glu 100 g ⁻¹ PF)	
	Red Delicious	Granny Smith	Red Delicious	Granny Smith
Sano	630,1 b	549,9 d	8,26 a	n.d.
DS-1	1166,9 a	1510,4 c	7,04 a	n.d.
DS-2	1617,7 a	2538,9 b	6,64 b	n.d.
DS-3	1718,3 a	3650,9 a	4,65 c	n.d.

Los valores son la media (n=5). Letras distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$). n.d: no detectado

Las antocianinas monoméricas totales fueron detectadas sólo en la var. Red Delicious (piel roja). La var. Granny Smith (piel verde) no acumula antocianinas normalmente, ni tampoco en respuesta al desarrollo de estrés por elevada radiación solar y temperatura (Tabla 1.3). En Red Delicious, la concentración de antocianinas disminuyó a medida que los tejidos presentaron más intensidad de síntomas de daño por sol.

1.2.4. Diferencias en la actividad de enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes presentaron actividades diferentes según el grado de daño por sol de los tejidos (Figura 1.3). Dado que sólo se midió actividad, no se puede descartar que haya habido efectos en la expresión proteica enzimática que hayan contribuido a esos cambios.

En ambas variedades, la actividad de la enzima SOD fue menor en los tejidos sanos (aproximadamente 8 UI mg⁻¹ PF) y se incrementó significativamente a medida que el grado de daño aumentó. En los tejidos con DS-3 se registró en promedio para

las dos variedades, una actividad enzimática de SOD de $135 \text{ UI mg}^{-1} \text{ PF}$ (Figura 1.3 A).

Contrariamente, el valor de actividad de la enzima CAT fue mayor en los frutos sanos y disminuyó en los primeros niveles de síntomas, no fue detectable en los estadios avanzados de daño por sol (Figura 1.3 B). La var. Granny Smith presentó valores de CAT, con un orden de magnitud superior a la registrada en Red Delicious, siendo la actividad promedio en los frutos sanos igual a 81 y $4 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{PF}$, respectivamente.

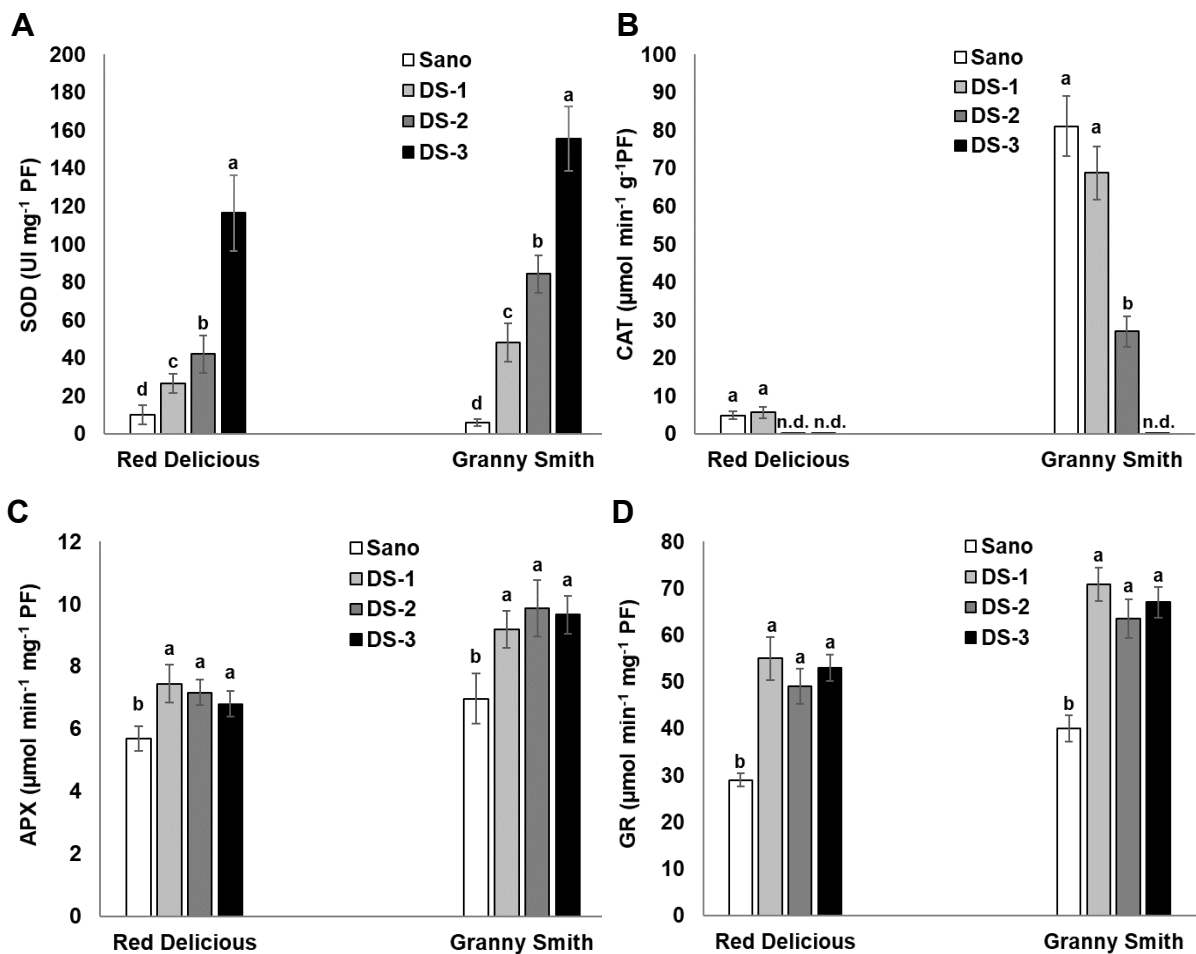


Figura 1.3: Actividad enzimática de superóxido dismutasa-SOD (A), catalasa-CAT (B), ascorbato peroxidasa-APX (C) y glutatión reductasa-GR (D) en tejidos de piel de frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith sanos y con síntomas de daño por sol creciente (DS-1, DS-2 y DS-3; descripción presentada en la Figura 1.1). Las barras indican la media ($n=5$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras de cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas (DGC; $P \leq 0,05$). n.d.= no detectado

La actividad de las enzimas APX y GR siguió patrones similares en función al nivel de síntomas de los tejidos. En los frutos sanos la actividad fue menor respecto a los que presentaban daño de sol y entre los diferentes niveles de afección no hubo cambios significativos (Figura 1.3 C y D). En frutos sanos de la var. Red Delicious la actividad de APX fue $5,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$, y en Granny Smith $6,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$, aumentando en los tejidos con daño de sol a $7,5$ y $9,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$, respectivamente. En ambas variedades el aumento de actividad de APX promedió un 32 % mientras que el incremento de la actividad GR fue cercano al 80 %.

1.2.5. Niveles de las hormonas relacionadas con la respuesta a estrés

1.2.5.1. Poliaminas

En los tejidos sanos de los frutos de ambas variedades, putrescina fue la poliamina más abundante. En la var. Red Delicious la concentración de putrescina fue mayor que en Granny Smith, mientras que los niveles de espermina y espermidina fueron similares en los tejidos sanos de ambas variedades. Independientemente de la variedad el contenido de las tres poliaminas fue mayor en los tejidos con daño por sol respecto de los tejidos sanos (Figura 1.4).

En el caso de la putrescina, el incremento relacionado al grado de síntoma se dio de manera diferente entre las dos variedades. En Red Delicious se registró un aumento significativo en todos los niveles de daño por sol, mientras que en Granny Smith el incremento fue significativo recién en DS-3 (Figura 1.4 A). En la primera variedad, la diferencia de concentración de putrescina entre sanos y con daño por sol fue de aproximadamente un 57 %, mientras que en Granny Smith fue un 140 %. El incremento registrado en Granny Smith fue mayor dado que en tejidos sanos de esta variedad se registró $129 \text{ nmol g}^{-1}\text{PF}$ y Red Delicious $206 \text{ nmol g}^{-1}\text{PF}$ alcanzando en el nivel DS-3, ambas variedades, $330 \text{ nmol g}^{-1}\text{PF}$.

La concentración de espermina en tejidos sanos fue en promedio $90 \text{ nmol g}^{-1}\text{PF}$ en las dos variedades estudiadas (Figura 1.4 B). En la var. Red Delicious aumentó a $124 \text{ nmol g}^{-1}\text{PF}$ en DS-1 y DS-2 y a $153 \text{ nmol g}^{-1}\text{PF}$ en DS-3, mientras que, en la var. Granny Smith ese incremento fue de mayor magnitud alcanzando en promedio $158 \text{ nmol g}^{-1}\text{PF}$ en DS-1 y DS-2 y $220 \text{ nmol g}^{-1}\text{PF}$ en D-3.

En las dos variedades de manzana estudiadas la concentración de espermidina presentó niveles similares según el grado de daño por sol de los tejidos (Figura 1.4 C). Los registros correspondientes a nivel sano fueron en promedio 40 nmol g⁻¹PF incrementándose a valores cercanos a 50 nmol g⁻¹PF en DS-1 y DS-2, llegando a 60 nmol g⁻¹PF en DS-3.

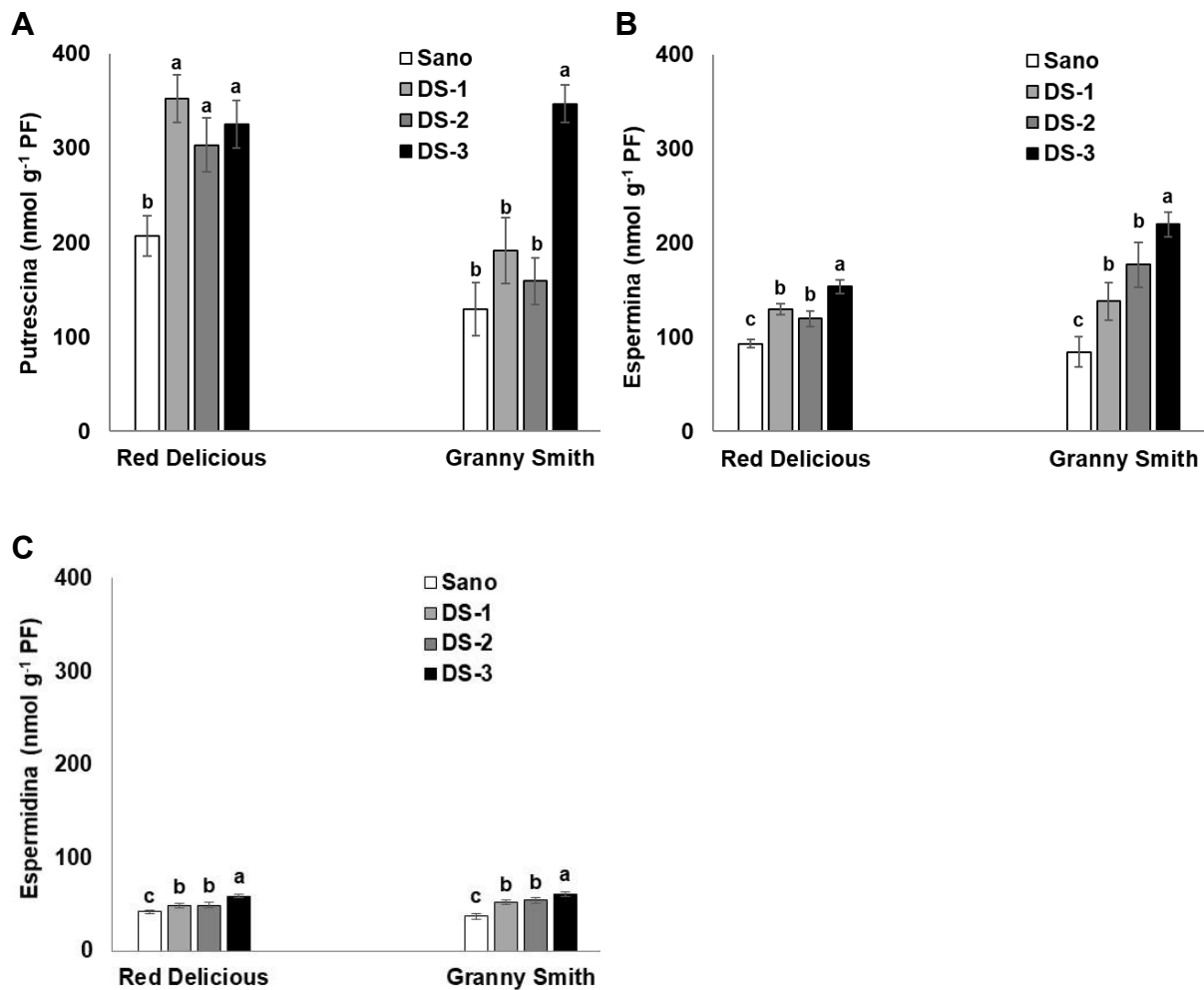


Figura 1.4: Evolución en la concentración de putrescina (A), espermina (B) y espermidina (C) en tejidos de piel de frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny sanos y con síntomas de daño por sol creciente (DS-1, DS-2 y DS-3; descripción presentada en la Figura 1.1). Las barras indican la media (n=5) ± D.E. Letras distintas sobre las barras de cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas (DGC; P ≤ 0,05).

1.2.5.2. Ácido abscísico y etileno

Según se observa en la Tabla 1.4, la concentración de ABA en los tejidos con diferente grado de daño por sol aumentó significativamente en frutos en las dos variedades estudiadas ($P \leq 0,05$). En el caso del etileno, se determinó un incremento de la emisión en frutos de la var. Red Delicious que presentaban distintos niveles de síntomas de daño mientras que en la var. Granny Smith no se registraron niveles detectables de etileno.

Tabla 1.4: Concentración de ácido abscísico (ABA) en tejidos de piel de frutos y emisión de etileno en frutos de manzana var. Red Delicious y Granny Smith con diferentes niveles de daño por sol. DS: daño por sol correspondiendo el incremento en número al aumento en la severidad del síntoma (descripción presentada en la Figura 1.1)

Nivel de daño	ABA (nmol g ⁻¹ PS)		Etileno (nl g ⁻¹ h ⁻¹)	
	Red Delicious	Granny Smith	Red Delicious	Granny Smith
Sano	5,7 b	11,5 c	1,7 b	n.d.
DS-1	5,9 b	13,3 b	5,3 a	n.d.
DS-2	6,1 b	13,8 b	6,1 a	n.d.
DS-3	7,4 a	14,9 a	6,3 a	n.d.

Los valores son la media (n=3). Letras distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$). n.d.: no detectado

La concentración de ABA en los tejidos de la var. Granny Smith fue el doble que en la var. Red Delicious; el contenido de ABA aumentó en los frutos de ambas variedades con diferentes niveles de daño por sol, en aproximadamente un 20 % y 18 %, respectivamente (Tabla 1.4).

En los frutos de la var. Granny Smith no se detectó emisión de etileno, mientras que en frutos sanos de la var. Red Delicious se determinó una emisión de 1,7 nl g⁻¹ h⁻¹, mientras que los que tuvieron diferentes grados de daños liberaron al medio un promedio de 5,9 nl g⁻¹ h⁻¹ (Tabla 1.4).

2.3. DISCUSIÓN

En el presente capítulo se estudiaron las diferencias en el sistema antioxidante, la concentración de poliaminas y ABA y la emisión de etileno que presentan los tejidos de frutos con diferentes niveles de síntomas de daño por sol. Los frutos con daño por sol, fueron cosechados de árboles de manzana var. Red Delicious y Granny Smith y se determinó que ambas variedades presentaron frutos con daño por sol. Coincidiendo con trabajos realizados previamente (Colavita, 2008), la var. Red Delicious fue menos afectada que la var. Granny Smith. El nivel de ocurrencia de daño por sol encontrado en esta variedad coincide con los reportados por Mupambi y col., 2014 en las condiciones de cultivo de Sudáfrica y con valores informados para otros cultivares en Turquía, Chile y España (Racsco y Schrader, 2012). Por lo tanto, los frutos utilizados para los análisis fisiológicos y bioquímicos fueron extraídos de árboles que tuvieron una incidencia de daño de sol acorde con los encontrados en otras regiones productoras del mundo.

El daño por sol en manzanas es producido por efecto de elevada radiación solar combinada con altas temperaturas que incrementan los procesos de oxidación en los tejidos (Ma y Cheng, 2004; Toivonen y Hodges, 2011). Los resultados indican que la oxidación fue evidente en los tejidos de ambas variedades y que la peroxidación lipídica fue mayor a medida que se incrementó el grado de daño por sol analizado. Resultados similares informaron Chen y col. (2008) con manzanas var. Gala.

En los tejidos con daño por sol se determinó mayor capacidad antioxidante en coincidencia con datos reportados por Iamsub y col. (2009) quienes informaron un aumento de la capacidad antioxidante junto al incremento de la incidencia de quemaduras solares. Sin embargo, la mayor peroxidación de lípidos, indica que los antioxidantes generados por las células no fueron suficiente para contrarrestar la oxidación provocada por alta temperatura y radiación solar.

Los compuestos fenólicos tienen propiedades captadoras de radicales libres y su síntesis aumenta en respuesta de defensa ante el estrés oxidativo provocado por diferentes factores ambientales (Gutteridge y Halliwell, 2010). Esta bien documentado que en manzanas la capacidad antioxidante está altamente correlacionada con el contenido fenólico total, los cuales desempeñan un papel importante en la estabilidad oxidativa (Treutter, 2001; Tsao y col., 2005; Vieira y col., 2009). Este grado de relación

entre capacidad antioxidante y polifenoles fue confirmado para ambas variedades analizadas, el contenido de polifenoles totales fue mayor a medida que aumentó el grado de daño por sol.

Del mismo modo, Felicetti y Schrader (2009b) reportaron aumento de los compuestos fenólicos en los tejidos expuestos a estrés por radiación solar combinado con calor en cinco variedades de manzanas. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden, puesto que se determinó el incremento de polifenoles en los tejidos dañados, el cual fue mayor en la var. Granny Smith que en Red Delicious. Esta diferencia podría deberse a que la var. Granny Smith logra la madurez de cosecha veinte días más tarde que Red Delicious, por lo tanto permanece más tiempo expuesta a situaciones de estrés por alta radiación y temperatura.

Como se mencionó en la introducción, las antocianinas también actúan como antioxidantes, secuestrando radicales libres y contribuyendo a la capacidad de fotoprotección de los frutos (Li y col., 2008). Inclusive, Bi y col. (2014) reportaron que las antocianinas contribuyen a la eliminación de peróxido de hidrógeno en mayor medida que otros compuestos fenólicos presentes en la piel de manzana. Las variedades estudiadas se diferenciaron en la capacidad de sintetizar antocianinas. Coincidiendo con Felicetti y Schrader (2009b) en la var. Red Delicious se registró que los tejidos sanos presentaban más concentración de antocianinas respecto a los que tenía daño por sol, decreciendo a medida que el nivel de daño analizado aumentó. En cambio, en la var. Granny Smith no se detectaron antocianinas mediante el método de pH diferencial evaluado por espectrofotometría, tal vez la sensibilidad del método no alcanza para detectarlos. Esto no implica que sus frutos no sintetizen antocianinas, puesto que estudios realizados mediante HPLC indican presencia de cianidina 3-galactosido y cianidina 3-arabinosido en variedades de manzanas Granny Smith. No obstante estos valores son 75% menores a los medidos en variedades de piel roja (Liu y col., 2013).

Como respuesta al incremento de procesos oxidativos asociado al aumento en los metabolitos secuestradores de EROs, cuando se miden las enzimas SOD, APX y GR, aumentan su expresión y consecuentemente presentan mayor actividad en tejidos con daño por sol respecto de los sanos.

En las plantas, está reportado que la enzima SOD proporciona la primera línea de defensa contra los efectos tóxicos de niveles elevados de EROs (Gill y Tuteja,

2010). El producto de SOD es el peróxido de hidrogeno que, si bien en condiciones de homeostasis celular es del orden de $0,5 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ en cloroplastos, en condiciones de estrés alcanza niveles mayores ($15 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$) tornándose tóxico (Mittler, 2002; Quan y col., 2008). En este estudio se determinó que en ambas variedades la actividad de SOD aumentó significativamente a medida que se agravó el daño por sol, por lo tanto, se puede suponer que los niveles de peróxido de hidrogeno también aumentaron.

En las plantas el peróxido de hidrogeno es eliminado en el cloroplasto por el ciclo agua-agua, en el peroxisoma por el ciclo de la glutatión peroxidasa y la CAT y en cloroplastos y citosol por el ciclo del glutatión-ascorbato (Mittler, 2002; Foyer y Shigeoka, 2011; Suzuki y col., 2012). Las enzimas relacionadas a estas vías de detoxificación son APX, GR y CAT, su actividad fue determinada, tanto APX como GR incrementaron la actividad en tejidos con daño por sol respecto de los sanos. Zhang y col. (2015) mostraron resultados similares en tejidos de manzana 'Fuji'. Chen y col. (2008) en var 'Gala', lo que indica que el ciclo del glutatión-ascorbato cumple un papel clave en la respuesta de los frutos durante el daño por sol. Reafirmando estos resultados, similares resultados informaron Chen y col. (2013) en las variedades Golden Delicious (frutos verde-amarillo) y Red Delicious.

La enzima CAT es importante en la eliminación del peróxido de hidrogeno generado en los peroxisomas por la β -oxidación de los ácidos grasos, la fotorrespiración y el catabolismo de las purinas. A pesar de su función, existen resultados diversos en cuanto a su activación o inactivación frente a condiciones de estrés abiótico (Jiang y Huang, 2001; Gill y Tuteja, 2010). En las dos variedades estudiadas la enzima CAT se inactivó a medida que el daño en los tejidos fue mayor, siendo dicho efecto más pronunciado en 'Red Delicious'. Diferencias en la tasa de disminución de actividad de CAT entre dos variedades también fueron reportadas por Ma y Cheng (2003) para las var. Gala y Smoothie. Aparentemente, la catalasa no tiene un papel importante en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno generadas por condiciones de estrés que conducen a daño por sol en manzanas (Chen y col., 2008). Se ha determinado que la actividad de catalasa en la cáscara de manzana muestra un patrón diurno opuesto al presentado por la densidad de flujo fotónico (Cheng y Ma, 2004). La disminución en la actividad de CAT frente a estrés

por elevada radiación solar y calor podría atribuirse a que esta enzima es susceptible a foto-inactivación (Shang and Feierabend, 1999).

En las plantas, se ha determinado que sumado a la activación del sistema antioxidante interviene una red coordinada de hormonas que dinamizan las rutas asociadas a las respuestas antioxidantes (Mittler y col., 2011; Suzuki y col., 2012; Bartoli y col., 2013). Las poliaminas, el ABA y el etileno son sustancias que actúan regulando estas vías.

Las poliaminas (putrescina, espermina y espermidina) son metabolitos de bajo peso molecular con características policatiónicas presentes en las plantas que actúan en múltiples procesos, desde la división celular y la organogénesis hasta la protección contra el estrés (Kaur-Sawhney y col., 2003). Parte del mecanismo asociado a la protección contra el estrés es que aumentan la capacidad antioxidante enzimática y no enzimática (Fariduddin y col., 2013). Se ha documentado que las poliaminas tienen un papel importante en la modulación y protección de las plantas frente a diversos tipos de estrés abióticos como sequía, salinidad, radiación UV-B y temperaturas extremas (He y col., 2008; Mapelli y col., 2008; Fariduddin y col., 2013; Calzadilla y col., 2014). Se ha observado inclusive, que la síntesis de poliaminas en manzanas fluctúa con la temperatura y la concentración de CO₂ durante el almacenamiento en atmosferas modificadas (Shelp y col., 2019). Estudiando plantas transgénicas de peras que tienen afectada la capacidad de síntesis de poliaminas se determinó que existe una relación positiva entre estos compuestos y la capacidad de adaptación a condiciones de estrés salino y por cadmio (Wen y col., 2011). Los resultados mostraron que los frutos sanos presentaron menor concentración de poliaminas que los afectados por daño por sol. Por lo tanto, la síntesis o activación de las formas conjugadas de poliaminas fue una respuesta de los tejidos de piel de manzanas a las condiciones ambientales que generan daño por sol. En el caso de Red Delicious, el contenido de putrescina se incrementó hasta alcanzar valores similares para todos los niveles de daño analizado. Este incremento puede estar relacionado a que putrescina es la primera poliamina que se sintetiza, y que a partir de este compuesto se genera luego espermina y espermidina mediante la adición de grupos aminopropilo (Kaur-Sawhney y col., 2003; Takahashi y Tong, 2015). Llama la atención que en la var. Granny Smith el incremento de putrescina se registró recién en el grado DS-3. No obstante, el incremento de espermina y espermidina se observó en DS-1 y grados de

daño mayor. En frutos de tomate, Handa y Mattoo (2010) reportaron que el nivel de putrescina no se correlaciona positivamente con espermidina o espermina, las cuales se correlacionan entre sí. Se han reportado investigaciones que registraron concentraciones diferentes de poliaminas en cultivares dentro de una misma especie con distinta tolerancia a estrés abiótico (Gupta y col., 2013). Posiblemente estas diferencias puedan estar asociadas a que la actividad antioxidante en la var. Red Delicious esté más relacionada a putrescina y en Granny Smith a espermina y espermidina (He y col., 2008).

En plantas, la enzima S-adenosil metionina descarboxilasa (dcSAM) es clave tanto en la síntesis de espermina y espermidina como en la de etileno (Handa y col., 2012). Por lo tanto, las poliaminas y el etileno podrían actuar de manera antagónica compitiendo por un sustrato común, la S-adenosil metionina (SAM) (Takahashi y Tong, 2015). En frutos de manzana, Torres y col. (2013) sugieren que la respuesta al estrés fotooxidativo en los tejidos dañados por sol puede estar regulada por etileno. El incremento de la producción de etileno observado en este trabajo en la var. Red Delicious a medida que progresa la severidad del daño por sol, coincide con lo observado por Torres y col. (2017). En la var. Granny Smith no se detectó emisión de etileno con la metodología utilizado, lo cual puede estar relacionado a que es una variedad de maduración tardía y se cosecha en estadio de pre-climaterio. No obstante estudios realizados en variedades que se recolectan tardíamente como Fuji y Granny Smith han reportado valores de etileno muy bajos del orden de $0,1 \text{ nl g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Watkins col., 1989; Kondo y col., 1991; Melnyk y col., 2014).

Estudios realizados por Torres y col. (2013) proponen que los tejidos con daño por sol tienen menor potencial hídrico y presentan índices de deshidratación. El ABA es una hormona relacionada con la vía de señalización de estrés hídrico (Lee y Luan, 2012), se ha propuesto que en frutos de manzana podría estimular la síntesis de etileno como mecanismo de respuesta a condiciones de estrés que desencadenan daño por sol (Torres y col., 2017). En las dos variedades estudiadas, se determinó un aumento en la concentración de ABA en la piel lesionada por sol y a su vez una relación positiva con el incremento de etileno. Esto sugiere que ABA puede estar desencadenando la síntesis de etileno como un mecanismo de respuesta al estrés como informaron Lara y Vendrell, (2000).

Por otra parte, trabajando en vid y estrés abiótico, se ha reportado que el ABA actúa en la señalización de la vía que desencadena la síntesis de poliaminas. Esta señalización sería mediada por los niveles de H₂O₂ regulados por poliaminas (Toumi y col., 2010). En este sentido nuestros resultados indican la misma situación, dado que al incrementar la severidad de daño se determinó un aumento de ABA y también de poliaminas.

CONCLUSIÓN

Trabajando con variedades de manzana que difieren en la incidencia de la fisiopatía daño por sol, corroboramos que la var. Granny Smith es más afectada que Red Delicious.

El daño de sol es una afección relacionada a procesos oxidativos dado que a medida que aumenta el nivel de daño incrementa la peroxidación de lípidos. Estos procesos no alcanzan a ser contrarrestados por el incremento de la actividad de enzimas y metabolitos antioxidantes.

Las hormonas de estrés estudiadas aumentan en los tejidos que presentan daño por sol respecto de los sanos. No obstante, existen diferencias en los niveles de concentración hormonal relativas a cada variedad.

Las hipótesis planteadas se corroboran. En tejidos de frutos de manzana, el sistema antioxidante, la concentración de poliaminas, ABA y emisión de etileno presentan diferencias en función al nivel de síntoma de daño por sol. Si bien el sistema de defensa antioxidante y hormonal se activa frente al estrés por alta radiación y temperatura, no alcanza a ser suficiente para contrarrestar los efectos nocivos en los tejidos y se produce el síntoma de daño por sol.

CAPITULO II

Evolución de la respuesta antioxidante y hormonal en manzanas expuestas a estrés por elevada radiación solar y temperatura

INTRODUCCIÓN

El estrés generalmente se define como un factor externo que ejerce una influencia desventajosa en la planta generando una desviación en la fisiología normal que puede ser perjudicial y causar daños irreversibles al sistema vegetal (Taiz y Zeiger, 2006). Tanto en condiciones naturales como bajo cultivo, las plantas están frecuentemente expuestas a tensiones ambientales. Un volumen creciente de estudios de campo, de laboratorio y moleculares sugiere que las plantas responden a una combinación específica de factores ambientales de una manera no aditiva, produciendo efectos que no pueden ser predichos a partir del estudio de cada uno de los factores individualmente (Atkinson y Urwin, 2012). Durante el período de desarrollo de los frutos de manzana en los valles irrigados de la Norpatagonia, las temperaturas ambientes pueden alcanzar valores que superan los 40 °C y la radiación solar puede llegar a máximos superiores a 1200 Wm⁻² (Rodríguez y Muñoz, 2006). Estas condiciones ambientales extremas se registran frecuentemente a campo, por lo cual es importante estudiarlas en conjunto e *in situ* (Racsko y Schrader, 2012; Smirnov, 2014). La fisiopatía daño de sol en frutos de manzana resulta en un fenotipo morfológico y estructural inaceptable para los consumidores. Esto lleva a graves pérdidas de productividad para los agricultores (Musacchi y Serra, 2018).

Los frutos son más susceptibles que las hojas a alta exposición solar y temperatura, principalmente porque no tienen mecanismos eficientes de uso de la radiación solar, ni de disipación de energía térmica (Blanke y Lenz, 1989). En los tejidos expuestos, la temperatura superficial de frutos (TSF) de manzana puede superar en 15 °C a la temperatura ambiente, llegando a registrarse valores de TSF mayores a 50 °C, mientras que en las caras sombreadas la TSF es similar a la atmosférica (Felicetti y Schrader, 2008a; Alvarez y col., 2015).

Algunos factores ambientales, como la temperatura del aire, pueden ser estresantes en solo unos minutos; otros, como las deficiencias minerales del suelo, pueden tardar meses en generar estrés (Taiz y Zeiger, 2006). La duración del periodo de exposición a las condiciones estresantes, y la velocidad de respuesta de los tejidos a dichas tensiones van a determinar el grado de daño o adaptación de la planta (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Chaves-Barrantes y Gutiérrez-Soto, 2016). En manzanas,

un estudio realizado en las condiciones ambientales registradas del estado de Washington, USA, determinó que TSF entre 46-49 °C durante 60 minutos son suficientes para generar daño de sol (Schrader y col., 2008).

Por otra parte, el mismo grupo de investigadores ha descrito que las manzanas separadas o unidas a los árboles responden de manera diferente a la alta temperatura y radiación. Las manzanas desprendidas se queman más fácilmente y desarrollan síntomas que difieren de los síntomas más comunes de daño por sol (Schrader, 2011). La mayoría de los estudios en relación a los factores temperatura y radiación que generan el daño por sol se han realizado en frutos separados de la planta, en condiciones muy alejadas de las correspondientes a campo. Si bien esto contribuyó al conocimiento actual sobre esta fisiopatía, todavía se percibe gran confusión (Racsco y Schrader, 2012). Existen contradicciones en la literatura sobre los resultados de experimentos con fruta unida versus fruta separada del árbol, lo que demuestra la importancia de estudiar los factores que generan daño por sol en órganos que permanecen unidos a las plantas después de los eventos climáticos o de la aplicación de tratamientos para su inducción y prevención (Chaves-Barrantes y Gutiérrez-Soto, 2016).

La fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más sensibles a alta temperatura y elevada radiación solar. Se ha observado inhibición de la fotosíntesis después de una corta exposición a temperaturas moderadamente altas (35 a 40 °C) en varias especies de plantas incluidos frutos de manzanas (Seo y col., 2008; Brestic y Zivcak, 2013; Blackhall y col., 2020). El fotosistema II (PSII) es lábil en condiciones extremas de temperatura y radiación, y por lo tanto se altera el transporte fotosintético de electrones y el flujo de energía. La medición de la fluorescencia de la Clorofila *a* permite la investigación de varios parámetros fotoquímicos del PSII que pueden alterarse durante el estrés ambiental, como el flujo de energía de absorción, de energía atrapada, de transporte de electrones, de energía disipada y la reducción de los receptores de electrones finales (Strasser y col., 2004). Un parámetro usado frecuentemente en la emisión de la fluorescencia es el rendimiento cuántico máximo de la reacción fotoquímica primaria, determinado por el cociente entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_v/F_m) (González Moreno y col., 2008). Estudios llevados a cabo en piel de manzana bajo condiciones controladas en laboratorio indican que altas temperaturas combinadas con elevada radiación dañan el complejo

del PSII (Chen y col., 2008). Comparando la sensibilidad al calor del aparato fotosintético entre cuatro variedades de manzana, Wand y col. (2008) encontraron que, a TSF hasta 38 °C, Fv/Fm permaneció alta en tratamientos que llegaron a 8 h de duración, mientras que a TSF 42-43 °C, Fv/Fm se redujo significativamente ya a las 6 h de exposición. La dinámica de decaimiento de Fv/Fm es diferente para las distintas variedades de manzana (Glenn y Yuri, 2013).

El proceso de fotosíntesis deteriorado, junto al exceso de energía de excitación de las moléculas de clorofila produce un desbalance en favor a la generación de EROs y así conduce a la peroxidación lipídica, al daño de biomoléculas en general y la destrucción oxidativa de la célula (Mittler, 2002). Los frutos han desarrollado un complejo sistema de defensa al estrés oxidativo, basado fundamentalmente en la síntesis de metabolitos y enzimas antioxidantes (Jimenez y col., 2002; Li y col., 2008; Muñoz y Munné-Bosch, 2018). En tejidos de manzana expuestos a radiación solar excesiva se ha determinado un aumento de la síntesis de compuestos fenólicos, ácido ascórbico y glutatión, entre otros (Ma y Cheng, 2003; Ma y Cheng, 2004; y col., 2008; Zupan y col., 2014). Asociado a los metabolitos con capacidad antioxidante en piel de frutos de manzana se ha detectado incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes del ciclo del ascorbato-glutatión y del ciclo de las xantofilas (Ma y Cheng, 2004; Chen y col., 2008; Munné-Bosch y Vincent, 2019; Morales-Quintana y col., 2020).

Frente a los diferentes estímulos ambientales las plantas presentan respuestas fenotípicamente plásticas, generalmente moduladas por la intervención de diferentes hormonas. Si bien existe duda de incorporar a las poliaminas al grupo de las hormonas vegetales, se sabe que estos compuestos generados en la planta son potentes moduladores de procesos de respuesta a estrés abiótico (Calzadilla y col., 2014). Las poliaminas son policationes alifáticas que tienen carga positiva a pH fisiológico, por lo tanto pueden interactuar con biomoléculas cargadas negativamente (ADN, ARN, fosfolípidos, cromatina y proteínas) estabilizando estructuras biológicas, y además actuar secuestrando EROs (Fariduddin y col., 2013). Si bien existe información del rol de las poliaminas en diferentes vegetales, es poco lo informado en plantas de manzanas. Líneas transgénicas de peras que sobreexpresan la enzima espermidina sintasa de manzana presentaron un aumento del contenido de espermidina (He y col. 2008). Estas plantas tenían actividades enzimáticas antioxidantes más altas y menos

peroxidación de lípidos que las líneas salvajes, una mayor capacidad antioxidante enzimática y no enzimática. Estudios realizados por nuestro equipo en piel de frutos de manzana Red Delicious que presentaban síntomas de haber estado bajo estrés que induce daño por sol, indicaron un aumento en el contenido de poliaminas totales (Vita y col., 2019).

El estudio de la participación de las hormonas vegetales en la respuesta a estrés por alta radiación y temperatura en frutos de manzana es reciente y hay escasos informes. Torres y col. (2017) sugieren que la respuesta al estrés fotooxidativo en la manzana podría ser moduladas por hormonas. El estudio que realizaron en manzana variedad Granny Smith, indicó que el ABA, el ácido jasmónico, el ácido salicílico y etileno aumentan significativamente en frutas con daño por sol moderado, que indica que estas hormonas están participando en la modulación de las respuestas de defensas frente a estrés fotooxidativo y por calor en frutos expuestos al sol. En general, la participación de fitohormonas específicas durante el desarrollo de síntomas de quemaduras solares sugiere que las respuestas en la cáscara de la fruta a elevada luz y temperatura implican vías e interacciones complejas que deben ser estudiadas con mayor detalle (Musacchi y Serra, 2018; Morales-Quintana y col., 2020).

Objetivo

El objetivo de este capítulo fue estudiar el tiempo de respuesta del sistema antioxidante y de las hormonas de estrés durante un evento de exposición de manzanas a elevada radiación solar combinado con altas temperaturas en frutos que permanecen unidos a la planta.

Hipótesis

En los frutos de manzana que permanecen unidos a la planta el sistema antioxidante y las hormonas relacionada a estrés se modifican, respondiendo durante las primeras horas de exposición a elevada radiación solar combinada con alta temperatura.

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Sitio de estudio y condiciones climáticas

El estudio fue llevado a cabo en una parcela de manzanos implantada en la chacra experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue (km 12, ruta 151, Cinco Saltos, Río Negro). Las determinaciones fueron realizadas en fechas próximas a la cosecha de los frutos de cada variedad y en condiciones meteorológicas similares (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Datos meteorológicos correspondientes a la EEA-Alto Valle-Cinco Saltos (Lat: 38° 50' 41" S Long: 68° 04' 09" W Elevación: 282 msnm) en las fechas en que se realizaron los estudios.

Variedad	Fecha de estudio	Temperatura máxima (°C)	Viento vel. media (km h ⁻¹)	HR media (%)	Radiación máxima (W m ⁻²)
Red Delicious	12-2-16	33,3	2,6	50	914
Granny Smith	22-2-16	33,4	0,3	52	1015

La estación meteorológica está ubicada a 150 m de la parcela donde se realizaron las investigaciones, lo que permitió tener datos meteorológicos precisos de temperatura, velocidad de viento, humedad relativa y radiación global entre otros. No obstante, en el sitio experimental se determinó la evolución de la temperatura superficial de frutos y temperatura ambiente mediante el uso de termocuplas tipo "T" conectadas a un adquisidor de datos (Figura 2.1. C y D) y radiación fotosintéticamente activa con un ceptómetro según se detalla en la sección Materiales y Métodos Generales.

2.1.2. Material vegetal y sistema experimental

Se trabajó en una parcela de manzanos de dos años de edad, plantados a una distancia de 3 m entre plantas y 4 m entre filas. La composición varietal fue de tres

filas de la variedad Red Delicious (frutos rojos) alternadas con una fila de Granny Smith (frutos verdes). La parcela recibió las pautas de cultivo y tecnología establecidas por los estándares de INTA, estación Alto Valle.

El sistema experimental se realizó a campo exponiendo al sol (sin desprender de la planta), frutos que se desarrollaron en alta luminosidad, pero sin recibir radiación solar directa. Esta condición se pudo lograr trabajando con plantas jóvenes cuyas ramas se habían desarrollado arqueadas hacia el suelo y los frutos no estaban expuestos a radiación solar directa (Figura 2.1 A). Fenológicamente en momento próximo a la cosecha de cada variedad, se seleccionaron los frutos en los que se iban a realizar las mediciones, luego se enderezaron y sujetaron las ramas de tal manera que los frutos quedaron expuestos al sol (Figura 2.1 B). Se pusieron termocuplas en las caras expuestas al sol de tres frutos y se dejaron dos termocuplas para medir temperatura ambiente (Figura 2.1 C-D). La exposición se realizó promediando el mediodía solar, que en la región del Alto Valle se produce próximo a las 13:00 h. Los frutos fueron expuestos a las 13:10 h, y se realizó el seguimiento de la TSF y de la temperatura ambiente, esperando hasta que la diferencia entre ambas fuera de 10 °C y la TSF superara los 39 °C. Esta situación se logró a las 13:30 h, lo que coincidió con mediciones previas en las que se determinó que ese delta de temperaturas se lograba exponiendo los frutos por 20 min al sol. Se tomaron muestras de tejidos de la cara expuesta al sol a las 13:10 h (0 min de exposición), 13:30 h (20 min de exposición), 14:00 h (50 min de exposición), 15:00 h (110 min de exposición) y a las 16:00 h (170 min de exposición). Por cada momento de exposición se recolectaron 5 frutos.

Además, se analizaron tejidos de 5 frutos que presentaban síntomas de daño por sol de nivel identificado DS-1 (Figura 1.1; Capítulo 1). Esto se realizó con el fin de contrastar la evolución de las variables de respuesta respecto de los tejidos que presentaban nivel de daño por sol leve.



Figura 2.1: Sistema experimental utilizado para exponer a elevada radiación solar y temperatura frutos de manzana que se desarrollaban sin recibir radiación solar directa. A: ramas que se habían desarrollado arqueadas hacia el suelo y los frutos no estaban expuestos a radiación solar directa. B: ramas enderezadas y sujetas de tal manera que los frutos quedaron expuestos al sol. C-D: detalle de colocación de termocuplas para medir temperatura superficial del fruto.

2.1.3. Determinaciones de variables de respuesta fisiológicas y bioquímicas

Los parámetros fisiológicos y bioquímicos evaluados en la piel de frutos fueron: rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m), peroxidación de lípidos, actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX y GR, concentración de poliaminas

(putrescina, espermina y espermidina), emisión de etileno y concentración de ABA. Estas metodologías están detalladas en la sección Materiales y Métodos Generales.

2.1.4. Análisis estadístico

Las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas se determinaron por el test de Lilliefors y de Levene, respectivamente. En todos los casos en los cuales se comparaban las medias de las variables de interés, se realizaron pruebas de DGC con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$).

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Parámetros de temperatura y radiación

Los experimentos para ambas variedades fueron desarrollados en día calurosos y despejados, caracterizados por elevada radiación solar asociada a altas temperaturas (Tabla 2.1). Las condiciones meteorológicas fueron las características de un día de verano en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. La radiación fotosintéticamente activa fue saturante y registró valores próximos a los 2000 μmol (fotones) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las temperaturas ambientes registradas en cada fecha y lugar de experimentación durante el mediodía solar fueron elevadas. En el experimento realizado en Red Delicious la máxima temperatura ambiente alcanzada fue 36,0 °C, mientras que durante el trabajo en Granny Smith se llegó a 33,1 °C (Figura 2.2).

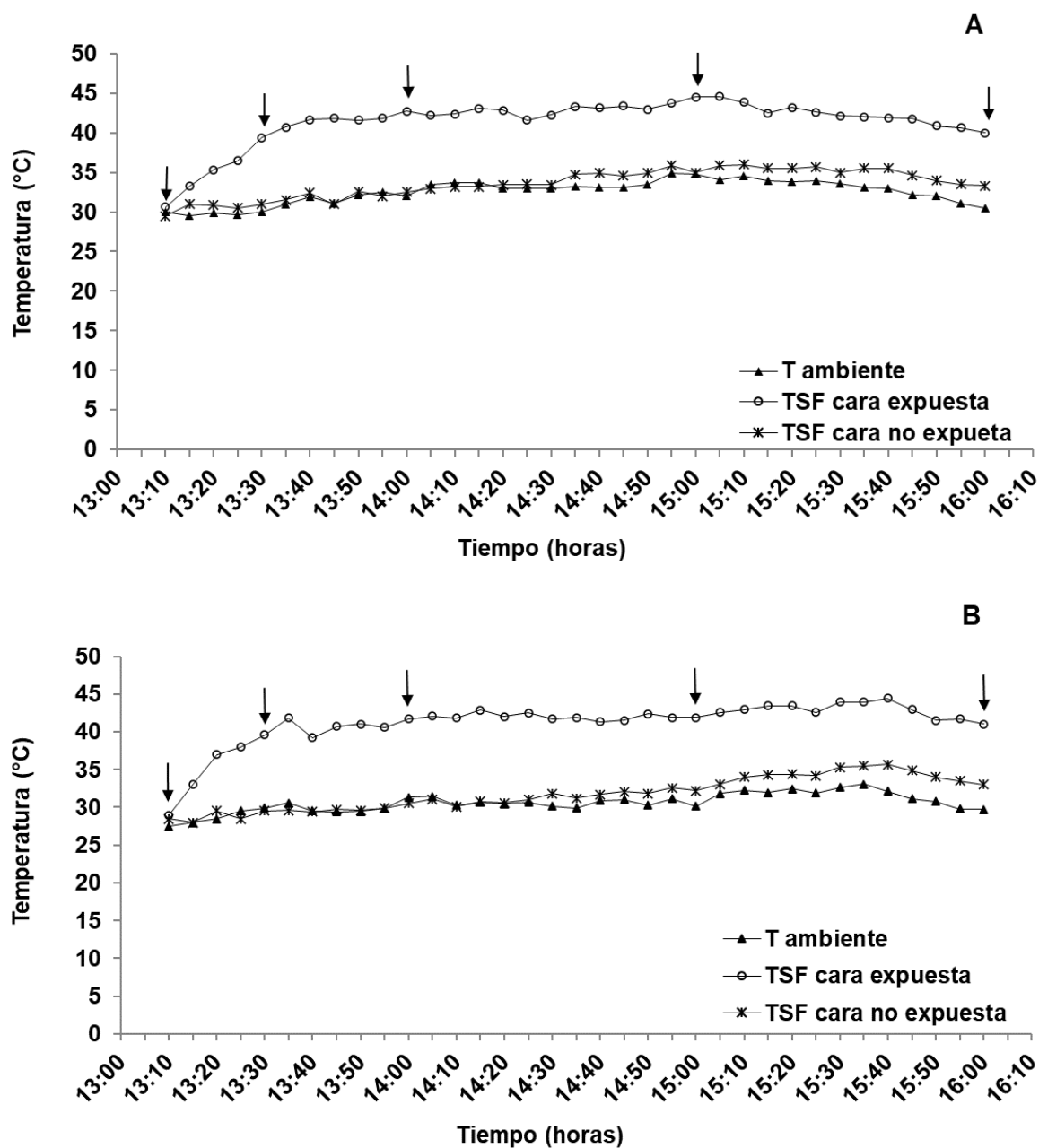


Figura 2.2: Evolución de la temperatura ambiente y la temperatura superficial de fruto (TSF) en la cara expuesta y no expuesta al sol de manzanas variedad Red Delicious (A) y Granny Smith (B) durante las primeras horas de la tarde los días 12/02/2016 para Red Delicious y 22/02/2016 para Granny Smith. El inicio del experimento fue a las 13:10 h ($t = 0$ min); las flechas indican los momentos en que se tomaron las muestras de tejidos para analizar.

El patrón de calentamiento de los frutos fue similar en ambas variedades, alcanzando en 20 minutos una diferencia promedio entre la temperatura ambiente y la TSF de 9,7 °C (Figura 2.2). Luego la TSF en la cara expuesta de los frutos de Red

Delicious se mantuvieron en promedio 9,9 °C por sobre la temperatura ambiente, llegando a registrar 44,6 °C a las 15:05 h momento en que comienza a descender levemente siguiendo el descenso de la temperatura ambiente (Figura 2.2 A). En la cara expuesta de los frutos de Granny Smith la TSF alcanzó 44,5 °C, a las 15:40 h y la diferencia entre TSF y temperatura ambiente fue de 11 °C (Figura 2.2 B). Luego disminuyó siguiendo la temperatura ambiente como sucedió con los frutos de Red Delicious. La TSF en la cara no expuesta al sol de ambas variedades siguió el ritmo de la temperatura ambiente hasta transcurridas 1,5 h del ensayo. A partir de ese momento, aumenta levemente hasta la finalización del estudio, superando a la temperatura ambiente en 2,5 °C en frutos de Red Delicious y 3,7 °C en frutos de Granny Smith.

2.2.2. Variaciones en los indicadores de estrés fotoquímico y oxidativo

Con el fin de determinar el estrés sufrido por los tejidos expuestos al sol y el impacto generado en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis se midió la emisión de fluorescencia de la Chl *a*, para evaluar rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm). Por otra parte, se cuantificó la peroxidación de lípidos de las membranas celulares, parámetro que refleja el estrés oxidativo desarrollado en las células.

Según se observa en la Figura 2.3 A, durante los primeros 20 minutos de exposición no se registraron cambios en Fv/Fm pero pasado este tiempo, los tejidos de ambas variedades se calentaron a TSF que superaron los 39 °C (Figura 2.2) y comenzaron a manifestar síntomas de estrés. Esta situación fue evidenciada porque Fv/Fm redujo rápidamente, a los 50 min de exposición (pasados 30 min en que la TSF fue estresante) se observó una disminución de 78% y 63% para Red Delicious y Granny Smith, respectivamente. En ambas variedades el PSII perdió integridad a partir de los 50 min de exposición.

La peroxidación de lípidos de membranas celulares (Figura 2.3 B) al inicio de la exposición fue similar a la determinada para tejidos sanos en el Capítulo 1, por lo tanto los frutos no presentaban síntomas de daño de sol. No obstante, cuando los frutos sombreados fueron desplegados al sol la peroxidación de lípidos incrementó. La tasa de aumento en la peroxidación de lípidos fue similar en las dos variedades, se observó un aumento paulatino que se hizo estadísticamente significativo a partir de los 50 min para la var. Granny Smith y 110 min para var. Red Delicious. El mayor delta de

incremento en la peroxidación lipídica lo presentaron los tejidos de la variedad Red Delicious (66%), mientras que en los frutos de Granny Smith el incremento fue menor (46%).

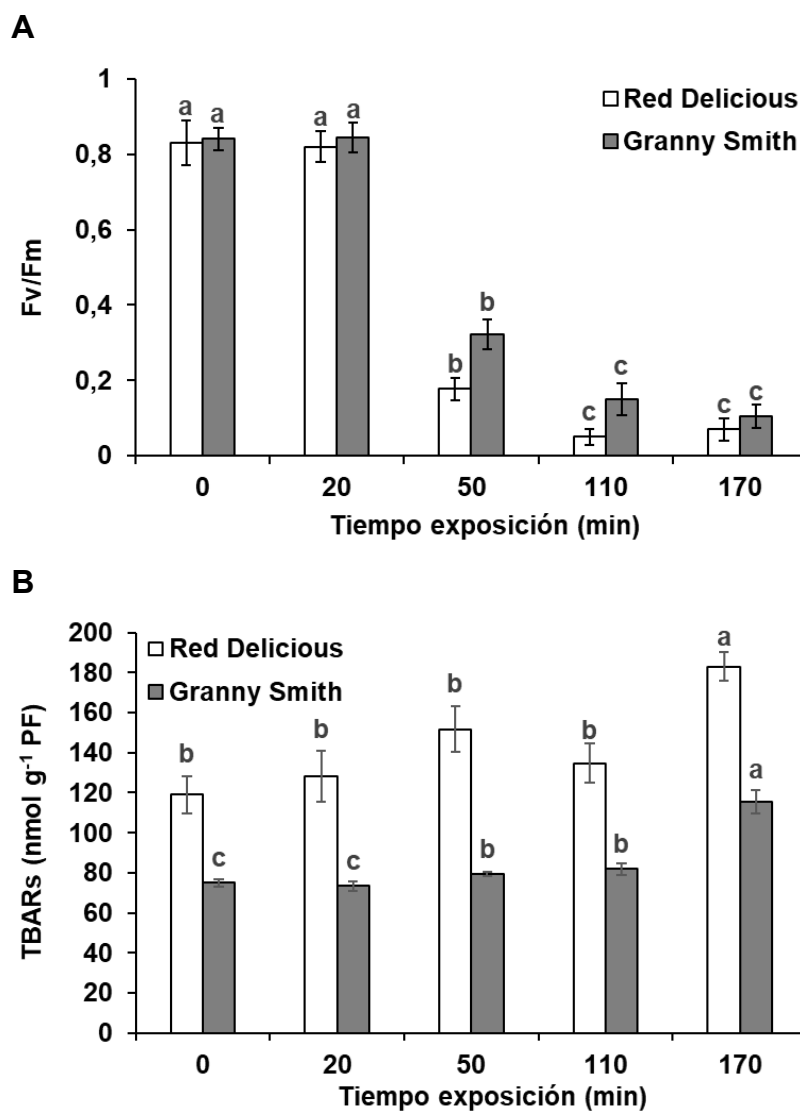


Figura 2.3: Cambios en el rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) (A) y peroxidación de lípidos de membranas celulares (medido por especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARs) (B), durante la reacción a estrés por elevada radiación solar y temperatura en frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith. El inicio del experimento fue a las 13:10 h (t= 0 min). Las barras indican la media ($n=15$ para Fv/Fm y $n=5$ para TBARs) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras de cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de exposición (DGC; $P \leq 0,05$).

Comparando los tejidos de frutos de ambas variedades que se desarrollaban a la sombra y luego recibieron 170 min de exposición a elevada radiación solar y temperatura con respecto a tejidos que se desarrollaron expuestos al sol y presentan un leve síntoma de DS-1 se determinó que en los primeros hubo pérdida total de la integridad del PSII, mientras que los segundos mantienen significativamente mayor ($P \leq 0,05$) eficiencia fotoquímica (Tabla 2.2.).

En ambas variedades, la peroxidación de lípidos alcanzada luego de la exposición de los tejidos a estrés fue similar a la presentada por tejidos con DS-1 (Tabla 2.2). No obstante, los TBARs registrados en Red Delicious fueron en promedio 56% mayor que en Granny Smith.

Tabla 2.2: Cambios en el rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) y peroxidación de lípidos de membranas celulares (medido por especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARs) en tejidos de piel de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith luego de 170 min de exposición a estrés por elevada radiación solar y temperatura comparados con tejidos que presentan síntomas de daño de sol leve DS-1 (Figura 1.1; Capítulo 1).

Variedad	Exposición	Fv/Fm	TBARs (nmol g ⁻¹ PF)
Red Delicious	170 min	0,07 a	183,3
	DS-1	0,60 b	192,0
Granny Smith	170 min	0,11 a	115,4
	DS-1	0,69 b	105,2

Los valores son la media (n=15 para Fv/Fm y n=5 para TBARs). Letras distintas para los valores de una misma columna dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

2.2.3. Evolución de la actividad de enzimas antioxidantes

El análisis de las enzimas antioxidantes indica que la actividad de la mayoría de las mismas se modificó a medida que se incrementaba el tiempo de exposición de los frutos al sol (Figura 2.4).

La actividad de la enzima SOD fue la que primero incrementó en ambas variedades. Rápidamente, después de transcurridos 50 min de exposición de los frutos

al sol, la actividad de SOD incrementó significativamente ($P \leq 0,05$). El aumento se presentó durante todo el periodo de estudio (Figura 2.4 A).

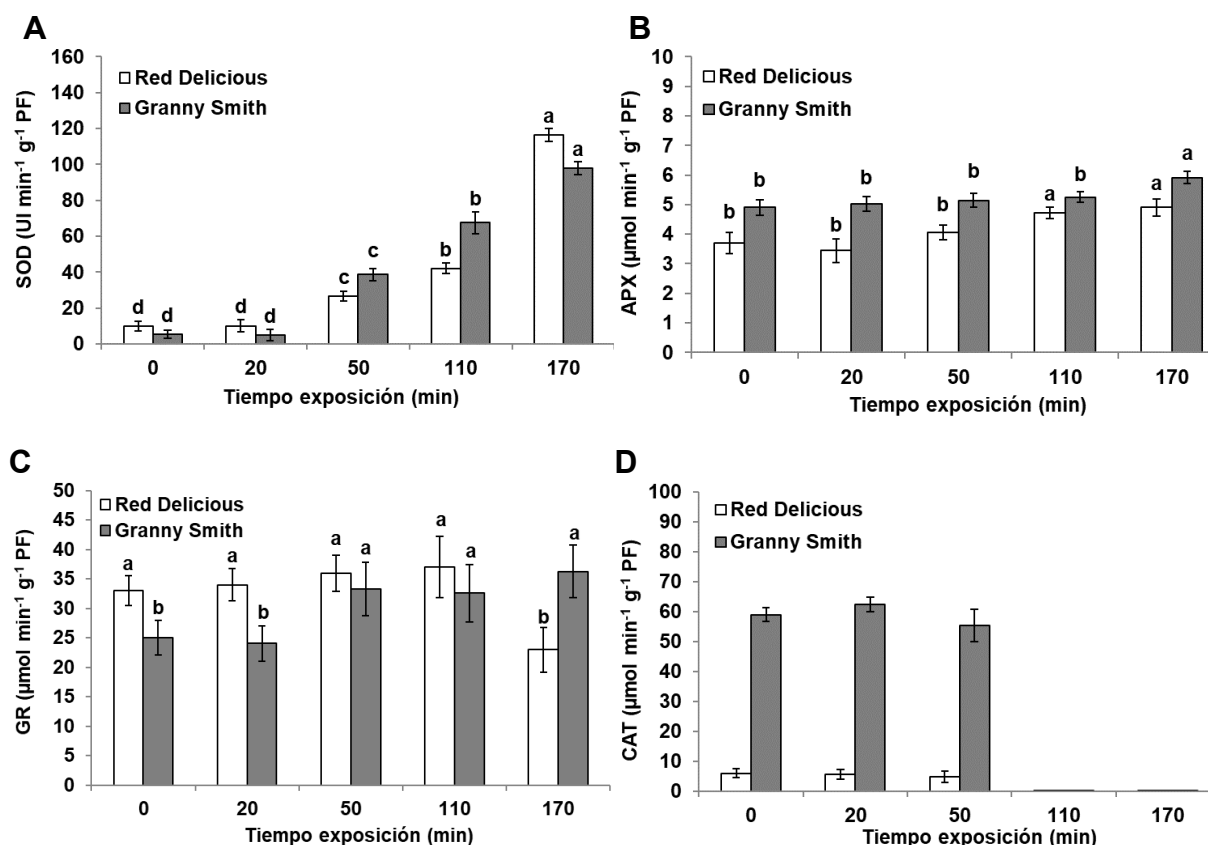


Figura 2.4: Evolución en la actividad enzimática de superóxido dismutasa-SOD (A), ascorbato peroxidasa-APX (B), glutatión reductasa-GR (C) y catalasa-CAT (D) en tejidos de piel de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith durante 170 min de exposición a estrés por elevada radiación solar y temperatura. El inicio del experimento fue a las 13:10 h (t= 0 min). Las barras indican la media ($n=5$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras de cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de exposición (DGC; $P \leq 0,05$). n.d.= no detectado

En los tejidos expuestos de los frutos de ambas variedades la actividad de la enzima APX aumentó paulatinamente como consecuencia de la exposición al sol. En los frutos de la variedad Red Delicious el aumento fue significativo a partir de los 110 min, mientras que en Granny Smith fue recién a los 170 min (Figura 2.4 B).

La actividad de la enzima GR presentó comportamiento diferente entre las dos variedades estudiadas (Figura 2.4 C). En la variedad Red Delicious, la actividad

descendió llegando a registrar, los 170 min, un 38% menos de actividad que al comienzo de la exposición. En la variedad Granny Smith no se registraron cambios en la actividad de GR hasta los 20 min de exposición, manteniéndose en promedio en $24,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$, luego de 50 min aumentó significativamente llegando a valores de $36,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$ a los 170 min de exposición.

En los tejidos expuestos al sol, la actividad de la enzima CAT en la variedad Granny Smith fue un orden de magnitud superior que en los de la variedad Red Delicious. No obstante, en ambas variedades, la actividad de CAT decreció con el transcurso de la exposición al sol, llegando a niveles no detectables en un intervalo de 110 min (Figura 2.4 D).

Tabla 2.3: Cambios en la actividad enzimática de superóxido dismutasa-SOD, ascorbato peroxidasa-APX, glutatión reductasa-GR y catalasa-CAT en tejidos de piel de manzana var. Red Delicious y Granny Smith luego de 170 min de exposición a estrés por elevada radiación solar y temperatura comparados con tejidos que presentan síntomas de daño de sol leve DS-1 (Figura 1.1; Capítulo 1).

Variedad	Exposición	SOD	APX	GR	CAT
		UI mg^{-1}PF	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{PF}$
Red	170 min	116,4 a	4,9 a	23,0 a	n.d.
Delicious	DS-1	102,0 a	5,1 a	27,3 a	6,5
Granny	170 min	97,9 a	5,9 a	36,3 a	n.d.
Smith	DS-1	86,3 a	6,7 a	50,3 b	71,1

Los valores son la media (n=5). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

En los tejidos expuestos de ambas variedades, las enzimas SOD y APX alcanzan niveles de actividad similares a los registrados en tejidos que se desarrollaron expuestos al sol y presentaron síntomas DS-1. Realizando la misma comparación para la actividad de la enzima GR se observó similitud en la var. Red Delicious, pero en la var. Granny Smith los tejidos DS-1 tuvieron un 28% menos de actividad. En ambas variedades, la enzima CAT se desactivo luego de 170 min de exposición repentina, diferenciándose de los tejidos de frutos que se desarrollaron al sol (Tabla 2.3).

2.2.4. Cambios en las concentraciones de hormonas relacionadas con la respuesta a estrés

El análisis de poliaminas en los tejidos de los frutos de ambas variedades indicó que la exposición a elevada radiación solar activa la síntesis de estas sustancias (Figura 2.5). Los niveles de putrescina en Red Delicious fueron mayores a los de Granny Smith, siendo un 40% superior al inicio de la exposición terminando en un 45% más a los 170 min. El contenido de espermina fue similar en ambas variedades al inicio del ensayo, pero al finalizar fue 35% superior en Red Delicious respecto de Granny Smith. En ambas variedades la espermidina no registró cambios durante el periodo de exposición estudiado, registrando valores en promedio de 40,0 nmol g⁻¹ PF.

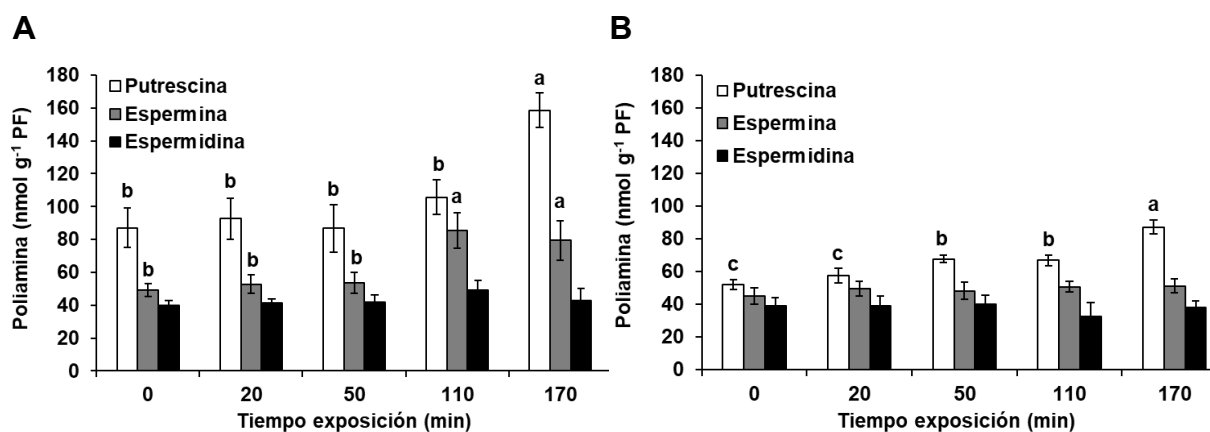


Figura 2.5: Evolución en la concentración de poliaminas en tejidos de manzana variedad Red Delicious (A) y Granny Smith (B) durante 170 min de exposición a estrés por elevada radiación solar y temperatura. El inicio del experimento fue a las 13:10 h (t= 0 min). Las barras indican la media ($n=5$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras de cada poliamina en cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de exposición (DGC; $P \leq 0,05$).

En los tejidos expuestos al sol de los frutos de la variedad Red Delicious (Figura 2.5 A) se registró aumento de putrescina de 87,0 a 158,5 nmol g⁻¹ PF desde el inicio de exposición hasta los 170 min, aunque este incremento no llegó al nivel de los tejidos

que presentaban DS-1 que fue de 248,1 nmol g⁻¹ PF (Tabla 2.4). La concentración de espermina, se mantuvo estable aproximadamente en 52,0 nmol g⁻¹ PF hasta los 50 min, luego incrementó 37% a los 110 min y se mantuvo en valores próximos a 82,3 nmol g⁻¹ PF hasta los 170 min, sin alcanzar la concentración determinada en tejidos que presentaban DS-1.

En la variedad Granny Smith se observó un patrón de aumento de putrescina más gradual que en los frutos de la variedad Red Delicious, incrementando de 52,0 a 87,1 nmol g⁻¹ PF desde el inicio de exposición hasta los 170 min (Figura 2.5 B). En esta variedad tampoco los tejidos expuestos durante 170 min llegaron a sintetizar concentraciones de putrescina similares a los tejidos con síntoma DS-1 (110,3 nmol g⁻¹ PF) (Tabla 2.4). La concentración de espermina en Granny Smith se mantuvo estable en valores que promediaron 48,3 nmol g⁻¹ PF y fueron aproximadamente un 50% menor a la registrada en los frutos con DS-1.

Tabla 2.4: Cambios en la concentración de Poliaminas en tejidos de piel de manzana var. Red Delicious y Granny Smith luego de 170 min de exposición a estrés por elevada radiación solar y temperatura comparados con tejidos que presentan síntomas de daño de sol leve DS-1 (Figura 1.1; Capítulo 1).

Variedad	Exposición	Poliaminas (nmol g ⁻¹ PF)		
		Putrescina	Espermina	Espermidina
Red	170 min	158,5 a	79,0 a	43,0 a
Delicious	DS-1	248,1 b	103,1 b	46,9 a
Granny	170 min	87,1 a	51,1 a	37,8 a
Smith	DS-1	110,3 b	79,9 b	42,0 a

Los valores son la media (n=5). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; P ≤ 0,05).

La concentración de ABA en tejidos de los frutos de la variedad Red Delicious fue en promedio 50% menor que en Granny Smith (Tabla 2.5). Más allá de la diferencia en las concentraciones de ABA propias de cada variedad también se registraron diferencias en el comportamiento respecto a los frutos con DS-1. En Red Delicious no se determinó cambios entre frutos repentinamente expuestos a estrés por elevada

radiación solar respecto a los que presentaban DS-1. Contrariamente en la var. Granny Smith la concentración de ABA tendió a aumentar luego de la exposición, pero no alcanzó los niveles de los frutos con DS-1.

No se detectó emisión de etileno en la var. Grany Smith, pero si en Red Delicious. En esta última, se registró un leve incremento de $0,9 \text{ nl g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a lo largo de los 170 min de exposición a estrés. Este incremento no llegó a los niveles detectados en tejidos DS-1 (Tabla 2.5).

Tabla 2.5: Cambios en la concentración de ácido abscísico (ABA) y emisión de etileno durante la reacción a estrés por elevada radiación solar y temperatura en frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith. Se ensayaron distintos tiempos de exposición; como referencia se incluyen tejidos con daño de sol leve DS-1 (Figura 1.1; Capítulo 1). La exposición de los frutos (inicio del experimento) comenzó a las 13:10 h ($t=0$ min).

Tiempo exposición (min)	ABA ($\text{nmol g}^{-1} \text{ PS}$)		Etileno ($\text{nl g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	
	Red Delicious	Granny Smith	Red Delicious	Granny Smith
0	5,7 a	11,5 b	1,5 b	n.d.
50	5,6 a	11,3 b	1,7 b	n.d.
170	5,9 a	12,5 b	2,4 b	n.d.
DS-1	6,1 a	14,9 a	4,3 a	n.d.

Los valores son la media ($n=3$). Letras distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$). n.d.= no detectado

2.3. DISCUSIÓN

Durante el presente estudio se trabajó con las condiciones ambientales características de los veranos en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, registrando elevada radiación solar acompañada de altas temperaturas (Rodríguez y Muñoz, 2006). La radiación solar actúa incrementando la energía de excitación de las moléculas y aumentando la temperatura de los tejidos (Demmig-Adams y Adams III, 1992; Chen y col., 2012). La temperatura ambiente promedió los 30-32 °C durante

todo el tiempo en que se realizó el experimento, por lo tanto no se produjo intercambio térmico con el fruto que posibilitara la refrigeración de los tejidos expuestos al sol. Los resultados coinciden con trabajos realizado previamente (Alvarez et al., 2015) y con estudios de otros investigadores en los que informaron que la temperatura superficial del fruto en la cara expuesta superó en 15 °C a la temperatura del aire circundante (Gindaba y Wand, 2005; Racsko y Schrader, 2012).

Las TSF alcanzadas durante el estudio fueron inferiores a los 45 °C. Según Schrader y col. (2001) las TSF que no superan los 46-49 °C son subletales y están asociadas con síntomas de daño por sol leve a moderado.

El análisis de la fluorescencia de la clorofila *a* permite obtener información del flujo de energía de excitación en PSII en tres vías fundamentalmente diferentes, la utilizada fotoquímicamente, la disipada como calor y por fluorescencia (Kalaji y col., 2017). Durante la exposición a tensiones abióticas las plantas aumentan los procesos de extinción no fotoquímicos, lo que disminuye el rendimiento máximo cuántico medido por Fv/Fm (González Moreno y col., 2008; Zivcak y col., 2014). En Blackhall y col. (2020) se informó que Fv/Fm puede ser usado como una herramienta no-destruktiva para detectar sensibilidad a estrés foto-termal en manzanas (Seo y col., 2008; Barasu y col., 2020). Esto quedó claro en el presente estudio, observándose que a los 50 min de soportar condiciones de alta TSF y radiación solar los frutos registraron más del 50% de disminución de Fv/Fm. En piel de manzanas, temperaturas superiores a 46 °C durante 30 min son suficientes para disminuir la donación de electrones del complejo de evolución de oxígeno a los centros de reacción que, por lo tanto, no pueden cerrarse completamente y decrece la Fv/Fm (Chen y Cheng, 2009). Esta situación es agravada cuando se produce una exposición simultánea a condiciones de alta temperatura y radiación (Chen y col., 2008; Wand y col., 2008). La exposición a la combinación de estas condiciones ambientales promueven estrés oxidativo e inhiben la reparación del PSII debido fundamentalmente a la supresión de la síntesis de proteínas D1 (Takahashi y Murata, 2008). No obstante, se registró la adaptación en tejidos que durante el crecimiento del fruto se desarrollaron expuestos al sol y que presentaron síntoma DS-1. En estos tejidos la eficiencia cuántica máxima del PSII permanece entre un 60-69%, mientras que en los tejidos que fueron expuestos abruptamente a la combinación de sol y calor Fv/Fm prácticamente declina por completo transcurridos 170 min.

En coincidencia con reportes de Hengari y col. (2014a), se encontró que la relación Fv/Fm disminuye más lentamente en manzanas de la variedad Granny Smith que en variedades de piel roja. Esto coincide con lo expresado por Glenn y Yuri (2013), quienes compararon la dinámica de decaimiento de Fv/Fm en las variedades Gala, Braeburn, Fuji, Granny Smith y Cripps' Pink y sugirieron que Granny Smith tiene mayor tolerancia a radiaciones UV y PAR.

El estrés producido por elevada radiación solar combinado con altas temperaturas no solo produjo desbalances en la fotosíntesis sino que posiblemente alteró la respiración e incrementó la actividad del sistema NADPH-oxidasa y de peroxidasas en general (Apel y Hirt, 2004). El desbalance en los procesos de oxido-reducción aumenta progresivamente al transcurrir el tiempo de exposición e incrementa la peroxidación autocatalítica de los lípidos de la membrana celulares (Wahid y col., 2007). En los tejidos expuestos de ambas variedades, y en las condiciones de estrés del presente estudio, fueron suficientes 170 min de exposición para alcanzar los niveles de peroxidación lipídica característicos para frutos que presentan DS-1. Este intervalo de tiempo puede variar si se trabajara con frutas que anteriormente estaban completamente expuestas a la luz solar y, por lo tanto, aclimatadas al calor y a la luz solar (Racsko y Schrader, 2012).

La enzima SOD ocupa el primer paso en el mecanismo de defensa enzimático frente al estrés oxidativo. En los tejidos expuestos tanto en frutos de Red Delicious como de Granny Smith se observó un rápido incremento de la actividad de la enzima SOD para eliminar EROs. La tasa de ascenso de la actividad de SOD fue significativa desde el inicio y a medida que trascurría la imposición de estrés. Este ritmo se mantuvo hasta los 170 min, momento en que se iguala con la actividad registrada en frutos con DS-1. Estos resultados coinciden con investigaciones realizadas para determinar la fisiología de manzanas que presentan daño por sol (Ma y Cheng, 2004; Preston y Johnson, 2007).

La acción de SOD da como resultado la formación de H₂O₂, el cual es eliminado por vía de las CAT en el peroxisoma o por el ciclo del ascorbato-glutation principalmente en cloroplastos (Mittler, 2002; Zhang y col., 2014). Los resultados mostraron que la vía de la CAT en la detoxificación de H₂O₂ es desactivada cuando el estrés térmico combinado con elevada radiación es impuesto abruptamente. Pasados los 50 min de exposición de los tejidos al sol y alta temperatura la actividad de CAT

se redujo a niveles no detectables. Esta disminución posiblemente se debe a que la enzima CAT es fotosensible (Shang y Feierabend, 1999), situación que se agravaría sobre todo frente a la exposición directa sin aclimatación (como fueron las condiciones de estos experimentos).

El ácido ascórbico y el glutatión participan en una transferencia cíclica de equivalentes reductores, lo que permite la reducción de H₂O₂, utilizando electrones derivados de NADPH. Las enzimas APX y GR, que catalizan las reacciones de los extremos del ciclo del ascorbato-glutatión (Mittler, 2002), presentaron diferente comportamiento. La actividad de APX incrementó a medida que avanzaba el tiempo de exposición al estrés, mientras que la actividad de GR se mantuvo estable durante todo el tiempo sin alcanzar los valores característicos para frutos con DS-1. Si bien hay coincidencia en que el estrés por elevada radiación y temperatura aumenta la actividad de APX, los resultados son diversos en cuanto al comportamiento de GR. Las investigaciones de Ma y Cheng (2003) y Chen y col. (2008) reportan activación de GR en tejidos de manzana con moderado daño por sol mientras que Zhang y col. (2014) informan disminución de la actividad a medida que se incrementa la severidad del estrés. En manzanas, la diferencia en la velocidad de activación entre GR y APX que hemos registrado indica que al inicio de la exposición y por un lapso de 170 minutos la piel de los frutos tiene limitada la dinámica de respuesta al estrés por elevada radiación y temperatura disminuyendo transitoriamente la capacidad de desintoxicación de peróxido de hidrógeno catalizada por APX (Foyer y Noctor, 2011).

Mediante la activación de enzimas y síntesis de metabolitos antioxidantes las plantas tienden a mantener el equilibrio en la concentración celular de EROs en respuesta al estrés oxidativo causado por factores abiótico. En esta regulación interviene una red coordinada de señales redox y hormonas que dinamizan las rutas metabólicas relacionadas a las respuestas antioxidantes (Mittler y col., 2011; Suzuki y col., 2012; Bartoli y col., 2013).

Frente a elevada radiación solar y alta temperatura, los tejidos de las dos variedades estudiadas mostraron que el aumento de la respuesta antioxidante estuvo asociado al incremento en la concentración de poliaminas, especialmente putrescina. En cuanto a espermina, la var. Granny Smith no presentó cambios a lo largo del tiempo de exposición. Tal vez, en esta variedad, una exposición de 170 minutos no fue suficientes para que se sintetizara espermina, dado que efectivamente en tejidos DS-

1 la concentración es significativamente mayor. Contrariamente, en la var. Red Delicious se registró un incremento significativo de espermina transcurridos 110 minutos. Posiblemente esta diferencia en la velocidad de respuesta entre las dos variedades se deba a que Red Delicious tiene mayor cantidad de putrescina, la cual es sustrato para la síntesis de espermina y espermidina (Kaur-Sawhney y col., 2003; Takahashi y Tong, 2015). El aumento de espermidina puede dar lugar a un incremento de la tolerancia al estrés (He y col., 2008). Trabajando con tomates maduros Handa y Mattoo (2010) reportaron que los efectos de espermina y espermidina en varios procesos fisiológicos y metabólicos parecen similares y de naturaleza positiva que los encontrados para putrescina. Esto podría indicar que, en cuanto a espermina, la var. Red Delicious estaría en mejores condiciones de enfrentar el estrés que la var. Granny Smith.

Las interacciones sinérgicas o antagónicas entre las diferentes hormonas vegetales ejercen un papel crucial en la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Peleg y Blumwald, 2011; Bitrián y col., 2012). En la presente tesis se estudiaron poliaminas, etileno y ABA porque como reguladores de crecimiento tienen una importante participación en la respuesta a condiciones de estrés abiótico en frutos (Toumi y col., 2010; Wang y col., 2013; Torres y col., 2017; Shelp y col., 2019).

Otro tipo de acción conjunta se ha reportado entre el ABA y etileno. Mediante el estudio de la expresión de los genes que codifican para la síntesis de ACC sintasa y ACO oxidasa se ha revelado que las aplicaciones de ABA exógeno inducen la biosíntesis de etileno (Liu y col., 2015). Reportes de Torres y col. (2017) indican que el ABA, una hormona fundamental en señalización de estrés hídrico (Lee y Luan, 2012), podría estimular la síntesis de etileno en manzanas con daño por sol.

En frutos climaterios se ha demostrado que la maduración se inicia con el aumento de síntesis de ABA, el cual promueve la actividad de enzimas relacionadas a la acumulación de etileno (Zhang y col., 2009). Por otra parte, el etileno y el ABA son fitohormonas involucradas en la respuesta a situaciones de estrés abiótico (Cui y col., 2015; Verma y col., 2016). Datos obtenidos en *Arabidopsis* sp. sugieren que la protección contra el daño oxidativo inducido por el calor involucra etileno y ABA (Larkindale y Knight, 2002).

Los resultados obtenidos en este capítulo coincidieron con los del capítulo 1 y con los reportes de Torres y col. (2017) en que los frutos con DS-1 presentan mayor

síntesis de ABA y etileno que los sanos. No obstante, estudiando la dinámica de la síntesis de estas hormonas no hemos encontrado cambios durante los 170 min de exposición a la radiación solar partiendo de frutos que habían crecido en condiciones de sombreado. Una posible interpretación de estos resultados sería que los procesos metabólicos asociados al incremento de ABA y etileno en tejidos de manzanas expuestas a estrés por alta temperatura y radiación solar requieren de un mayor tiempo de exposición que el establecido en el presente estudio. Según Mattoo y Lieberman (1977) reestablecer la síntesis de etileno en protoplastos derivados de células de manzanas demanda entre 80 a 120 horas, dependiendo si fueron extraídos en frutos en estadio preclimaterico o climaterico.

CONCLUSIÓN

En los tejidos de la piel de manzanas que están unidos a la planta, el PSII es uno de los componentes que más rápido se degrada durante la exposición a un evento de elevada radiación solar combinado con altas temperaturas. En 50 min de exposición los fotosistemas pierden integridad tanto en la variedad Red Delicious como Granny Smith. Esto es acompañado de un aumento en el estrés oxidativo, lo que promueve que luego de 170 minutos la peroxidación de las membranas alcance los niveles de TBARs observados en los tejidos que presentan síntoma DS-1.

Frente al aumento abrupto de estrés oxidativo durante el evento de exposición, la respuesta de las enzimas del sistema antioxidante es diversa. La actividad de SOD aumenta rápidamente, la vía de las CAT se desactiva y las enzimas del ciclo del ascorbato-glutatión se ven afectadas. La actividad de APX aumenta, pero la de GR no se modifica, lo que permite suponer que no aportaría el flujo de electrones necesario para la eliminación del peróxido de hidrógeno catalizada por APX.

Respecto a los reguladores del crecimiento analizados, la concentración de poliaminas aumenta rápidamente frente a la imposición de estrés por elevada radiación solar y temperatura, pero no se observaron cambios significativos en los niveles de ABA y etileno, probablemente debido a que el tiempo de exposición utilizado en el experimento no fue suficientemente largo.

Por lo tanto, se corroboró en los frutos de manzana que permanecen unidos a la planta el sistema antioxidante y las hormonas relacionada a estrés se modifican,

respondiendo durante las primeras horas de exposición a elevada radiación solar combinada con alta temperatura.

CAPITULO III

**Caracterización de variedades de manzana según la
respuesta de sus frutos al estrés por alta radiación solar y
temperatura**

INTRODUCCIÓN

Las variedades de manzana domesticadas han dado lugar a frutos que difieren en el aspecto y en las respuestas metabólicas. Red Delicious es la variedad más importante cultivada en el país, su fruto es tronco-cónico con cinco lóbulos bien marcados y tiene piel con estrías rojo brillante en gran parte de la superficie. La coloración de superficie es heterogénea y más intensa en los frutos más expuestos al sol (Benítez, 2001). El fruto del cultivar Gala es de forma tronco-cónica, con el cáliz cerrado y el pedúnculo largo. El color de superficie es rojo siendo la intensidad y el porcentaje de superficie cubierta afectado por las condiciones agroecológicas del cultivo y la posición de los frutos en el árbol (Benítez, 2001). Los frutos de Cripp's Pink se caracterizan por tener color rosado brillante sobre fondo verde claro que vira al amarillo en la madurez; cuando alcanzan una cobertura de color rojizo superior al 50%, se comercializa con el nombre de Pink Lady que tiene un mayor valor de mercado (Benítez, 2001). El cultivar Fuji tiene fruto redondo, de mediano a grande, de color rojo brillante con fondo verde claro (Benítez, 2001). La variedad Granny Smith es la tercera variedad más difundida en el mundo, luego de Red Delicious y Golden Delicious. La piel del fruto es verde intenso, con lenticelas blancas bien visibles (Benítez, 2001). Golden Delicious es originaria de Estados Unidos, tiene frutos tronco-cónico alargado, de piel verde amarillenta a amarillo dorado (Benítez, 2001).

Las diferentes variedades de manzana presentan distinta susceptibilidad frente a estos factores de estrés que derivan en la fisiopatía daño por sol (Morales-Quintana y col., 2020) (Figura 3.1). En la mayoría de las regiones productoras del mundo se reporta alta incidencia de daño por sol en las variedades Granny Smith y Jonagold, moderada en Fuji, Golden Delicious, Braeburn y Red Delicious, y menor daño en Cripp's Pink, Idared, y Topaz (Racsko y Schrader, 2012). Estudios realizados en la región del Alto Valle de Rio Negro indicaron que Fuji fue la variedad más susceptible, observándose que el 55,6% de los frutos muestreados presentó algún tipo de afección por sol. Le siguieron en orden de ocurrencia de daño Golden Delicious, Granny Smith y Braeburn, esta última con una incidencia de daño del 38,1%. Las variedades que presentaron menor daño fueron Starkrimson con un 14,9% y luego Red Delicious con un 24% (Colavita, 2008). Otros ensayos realizados en la región reportan valores de descarte por daño por sol grave en variedad Fuji del 21% (Dussi y col., 2005).

Se ha reportado que existen diferencias particulares a cada variedad de manzana en cuanto al metabolismo de los tejidos expuestos al sol intenso destinado a mitigar la producción excesiva de EROs y la inactivación del aparato fotosintético (Glenn y Yuri, 2013; Hengari y col., 2014b).

La fotoinhibición de la fotosíntesis se produce debido al daño de la proteína del centro de reacción D1, que une a todos los componentes del fotosistema II (Taiz y Zeiger, 2006). Los centros de reacción desintegrados se reparan continuamente por degradación y resíntesis de la proteína D1 (González Moreno y col., 2008). No obstante, en manzanas expuestas a altos niveles de radiación solar junto con elevada temperatura superficial de frutos, este mecanismo es insuficiente para evitar daños en los sitios donantes y aceptores del fotosistema II, por lo cual disminuye la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) del mismo (Chen y col., 2008). Si bien los tejidos estresados de manzana presentan menor F_v/F_m , la sensibilidad es diferente para las distintas variedades e inclusive existe variación interanual dentro de una misma variedad (Glenn y Yuri, 2013).

En los frutos de manzana que tienen genéticamente menor capacidad de sintetizar antocianinas, la radiación solar excesiva produce mayor degradación de clorofila, disminuyendo la capacidad de procesar la energía solar (Merzlyak y col., 2002; Solovchenko y Merzlyak, 2008). En las variedades de peras y manzanas de frutos rojos se determinó mayor capacidad de fotoprotección.

Dentro de las sustancias sintetizadas por la célula, los fenoles sirven como potentes antioxidantes no enzimáticos (Sharma y col., 2012). Con el fin de caracterizar los cambios en las concentraciones de compuestos fenólicos frente al estrés por radiación solar y al estrés por calor, Felicetti y Schrader (2009b) compararon tres variedades de frutos color rojo (Fuji, Gala y Delicious), una amarilla (Golden Delicious) y una verde (Granny Smith). Los resultados indicaron aumento de fenoles en los tejidos estresados y las respuestas fueron bastante uniformes entre las cinco variedades estudiadas. No obstante, existen resultados contrapuestos que indican que bajo condiciones ambientales inductoras de daño por sol, la variedad Golden Delicious sintetizó significativamente mayor cantidad de compuestos fenólicos que la variedad Braeburn (Zupan y col., 2014). En general, los compuestos fenólicos en la piel de manzana muestran diferentes respuestas dependiendo del genotipo de cada variedad (Sun y col., 2014).

Más allá del aumento en metabolitos antioxidantes, se ha concluido que en tejido de manzanas, las enzimas del ciclo ascorbato-glutación son reguladas positivamente en respuesta a la exposición a pleno sol (Ma y Cheng, 2003; Ma y Cheng, 2004; Chen y col., 2008; Zhang y col., 2015). No obstante, son escasos los estudios que comparan el comportamiento de las enzimas del ciclo del ascorbato-glutación en diferentes variedades de manzana. En tal sentido, el estudio realizado por Ma y Cheng (2003) en la variedad Gala (fruto rojo) y Smoothie (fruto verde-amarillo) reporta que la actividad de las enzimas APX, MDAR, DHAR y GR mostraron una tendencia similar, siendo mayor la actividad en la piel expuesta al sol que en la sombreada.

Respecto a la actividad SOD, durante el desarrollo de quemaduras solares existirían cambios específicos dependiendo de la variedad. En los estudios realizados en tejidos expuestos al sol en las variedades Fuji y Grany Smith se determinó un incremento en la actividad de SOD, mientras que en las variedades Gala, Smoothie, Golden Delicious y Liberty no se observaron modificaciones (Ma y Cheng, 2003; Ma y Cheng, 2004; Preston y Johnson, 2007; Racsco y Schrader, 2012).

Según Mupambi y col. (2018) aplicaciones exógenas de ABA en manzanas Granny Smith redujeron la concentración de antioxidantes como los polifenoles y ácido ascórbico. Contrariamente, Iamsub y col. (2009), reportan que en variedades rojas el ABA exógeno promovió la capacidad antioxidante, y que aumentó el contenido de ácido ascórbico, polifenoles y antocianinas. Si bien existe amplia bibliografía que describe el aumento de poliaminas frente a un estrés abiótico, son escasos los estudios realizados de estos metabolitos en frutos de manzanas.

La manzana es la fruta que ocupa el cuarto puesto en orden de importancia en cuanto a producción y consumo en todo el mundo, llegando a alcanzar un máximo de producción de 84,6 millones de toneladas en el 2014 (Colavita y col., 2020). Dado que la alta radiación solar y temperatura es característica de muchas zonas productoras de manzana y que el estrés provocado por estos factores puede llegar a disminuir su calidad, es importante identificar y agrupar variedades según sus respuestas frente a estas condiciones ambientales. De esta manera, se podría determinar la condición más adecuada para cada grupo respecto al emplazamiento, diseño del huerto, sistema de conducción, de riego e incluso de fertilización (Musacchi y Serra, 2018).

Objetivo

El objetivo de este capítulo fue caracterizar variedades de manzana con diferente susceptibilidad al desarrollo de daño por sol mediante las respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés por alta radiación solar combinado con altas temperaturas.

Hipótesis

Los cultivares de manzana que presentan distinta susceptibilidad de los frutos al desarrollo de la fisiopatía daño por sol difieren en las respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés por alta radiación solar combinado con elevada temperatura.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Sitio de estudio y condiciones climáticas

En la región del Alto Valle no existe ningún establecimiento público o privado que en un mismo sitio cultive las seis variedades utilizadas en este estudio. Con el fin de lograr la mayor homogeneidad de las parcelas se seleccionaron plantaciones en plena producción (árboles de 10-15 años), cultivados en suelos franco, con sistema de riego gravitatorio. Se seleccionaron parcelas que tuvieran el mismo marco de plantación y orientación respecto al sol. Los árboles estaban conducidos en espalderas, plantados con una separación de 2,7-3 m entre plantas x 4,0 m entre filas, y las mismas estaban orientadas de este a oeste. Los frutos se extrajeron de las caras norte de las filas, por ser las que mayor incidencia de radiación solar reciben. Todas las parcelas recibieron pautas de cultivo según el manejo cultural, fertilización y sanidad dictadas por EEA-INTA Alto Valle.

3.1.2. Material vegetal y sistema experimental

Se trabajó con frutos de manzana de 4 variedades de piel roja (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink y Fuji), una de piel verde-amarillenta (Golden Delicious) y una

de piel verde (Granny Smith) (Figura 3.1). Las variedades seleccionadas para este estudio difieren en la susceptibilidad al daño por sol según determinaciones realizadas en estudios previos (Colavita, 2008). Además, aunque las fechas de plena floración son próximas, los momentos de cosecha comercial son distintos, por lo tanto los ciclos de cultivo varían entre 117 a 185 días (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Sensibilidad al daño de sol y características del ciclo de desarrollo de frutos para diferentes variedades de manzanas según el Área de Poscosecha de la EEA-INTA Alto Valle perteneciente al Programa Regional de Madurez del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

Variedad	Sensibilidad a daño de sol *	Fecha media de plena floración	Momento cosecha comercial	Edad media del fruto a cosecha ** (días)
Gala	leve	19/sep	24-29/ene	117
Red Delicious	media	20/sep	14-16/feb	138
Cripp's Pink	media	18/sep	3-7/abr	185
Fuji	muy alta	21/sep	15-17/mar	175
Golden Delicious	alta	27/sep	15-18/feb	140
Granny Smith	alta	18/sep	4-6/mar	165

(*) según Colavita, 2008

(**) según Calvo y Candan, 2012

En cada variedad, 10 días previos al inicio de la cosecha comercial se recolectaron frutos con una cara que se desarrolló expuesta al sol y que presentaba síntomas de daño por sol leve (tejidos expuestos). Este nivel de síntoma corresponde al identificado como DS-1, según la escala mostrada en la Figura 1.1 del Capítulo 1 y se visualiza como un área de color amarillo suave o con un ligero descoloramiento, sin zonas de color marrón o necróticas. Los tejidos sanos (no expuestos) se extrajeron del sector opuesto al que presentaba síntomas, correspondiente a tejidos que nunca

recibieron radiación solar directa y que visualmente no presentaban alteraciones (Figura 3.1).

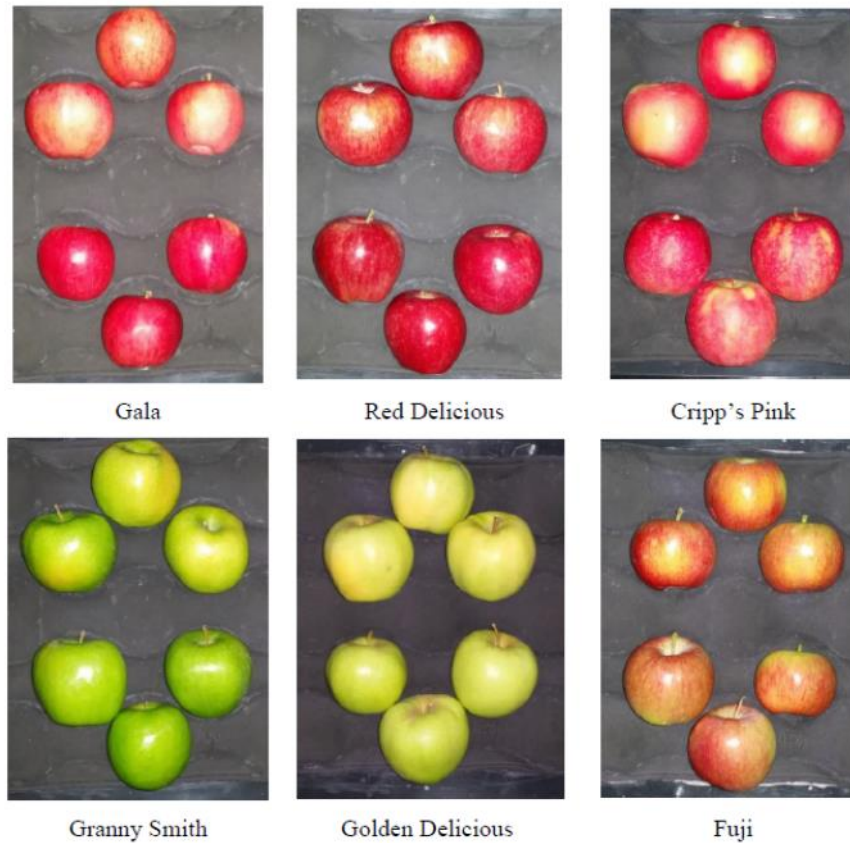


Figura 3.1: Frutos de manzana de las variedades Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Granny Smith, Golden Delicious y Fuji. Los tres frutos superiores de cada foto exhiben tejidos que se desarrollaron expuestos a estrés por elevada radiación solar y temperatura y que presentan síntoma de daño por sol leve DS-1 (Figura 1.1 del Capítulo 1). Los tres frutos inferiores de cada foto muestran el sector opuesto al que mostraba DS-1 y corresponde a tejidos que durante su desarrollo no fueron expuestos a radiación solar directa y que visualmente no presentan alteraciones.

3.1.3. Determinaciones de variables de respuesta

Las metodologías utilizadas para el análisis de las variables de respuesta están detalladas en la sección destinada a Materiales y Métodos Generales. Las variables de respuestas medidas fueron: contenido relativo de agua, pérdida de electrolitos, integridad del PS II (F_v/F_m), antocianinas monoméricas totales, polifenoles totales,

contenido de clorofilas, peroxidación de lípidos, capacidad antioxidante, actividad de las enzimas SOD, CAT, APX y GR, poliaminas totales, ABA y emisión de etileno.

3.1.4. Análisis estadístico

Las determinaciones fisiológicas y bioquímicas se realizaron sobre tejidos extraídos de la cara expuesta a estrés por elevada radiación solar y temperatura y que desarrollaron síntomas DS-1 y de la cara sana (no expuesta) de un mismo fruto, exceptuando las mediciones de etileno exógeno que se realizaron en frutos enteros. El tamaño de las muestras y la verificación del cumplimiento de supuestos del modelo se efectuó según se detalla en la sección Materiales y Métodos Generales. Las variables fueron analizadas por ANOVA y en el caso de comparaciones múltiples se usó el test DGC ($p < 0,05$) (Di Rienzo y col., 2002).

Con el fin de determinar las variables con mayor contribución en la explicación de la variabilidad en la respuesta de los tejidos a la exposición solar se trabajó con Análisis de Componentes Principales (ACP). El ACP permite examinar todos los datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables. Con el ACP se construyen ejes artificiales (componentes principales) que permiten obtener gráficos de dispersión de observaciones y/o variables con propiedades óptimas para la interpretación de la variabilidad y covariabilidad subyacente (M.G. Balzarini et al., 2008).

Luego de establecidas las variables que mayor correlación tienen con las componentes principales 1 y 2, se las introdujo en un Análisis de Conglomerados (AC) para poder identificar grupos de los cultivares de manzana que comparten el mayor número de características y así generar grupos de cultivares que presentan respuesta similar en la piel de sus frutos a la exposición solar. Los conglomerados se obtuvieron utilizando el método del encadenamiento promedio y distancia Euclídea, considerando la correlación cofenética como guía para seleccionar el método de agrupamiento más adecuado. El ACP y AC se realizó con el procedimiento estadístico de análisis multivariado del programa InfoStat en interfase con la plataforma R.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Cambios fisiológicos y bioquímicos en tejidos de frutos expuestos a estrés por elevada radiación solar y temperatura

3.2.1.1. Variables fisiológicas

En los frutos de todas las variedades estudiadas, el contenido relativo de agua de los tejidos que no estuvieron expuestos al sol durante su desarrollo fue significativamente ($P \leq 0,05$) mayor respecto de los tejidos de la cara con síntomas de estrés por elevada radiación solar (Figura 3.2 A). A su vez, en los tejidos no expuestos de los cultivares Gala, Red Delicious, Cripp's Pink y Fuji el contenido relativo de agua fue similar y mayor respecto de Granny Smith y Golden Delicious. Los tejidos expuestos de los cultivares Fuji, Granny Smith y Golden Delicious presentaron un contenido relativo de agua en promedio de 88% mientras que el resto de las variedades fue superior a 90%. Estos valores indican que la variedad Fuji se deshidrató un 10% y Golden Delicious y Granny Smith un promedio de 7%, mientras que el resto de las variedades perdieron en promedio 5% de agua.

No se registraron diferencias significativas en la pérdida de electrolitos entre los tejidos expuestos a estrés respecto de los no expuestos en ninguna de las variedades estudiadas. Tampoco se determinaron diferencias entre variedades (Figura 3.2 B).

La disminución de la eficiencia cuántica máxima en los tejidos expuestos indica que el fotosistema II de todos los cultivares fue significativamente dañado por la exposición a elevada radiación solar (Figura 3.2 C). El daño fue mayor en el caso de las variedades de piel roja, donde la reducción de la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II fue en promedio 22% mientras que en las verdes (Golden Delicious y Granny Smith) decreció aproximadamente 16%.

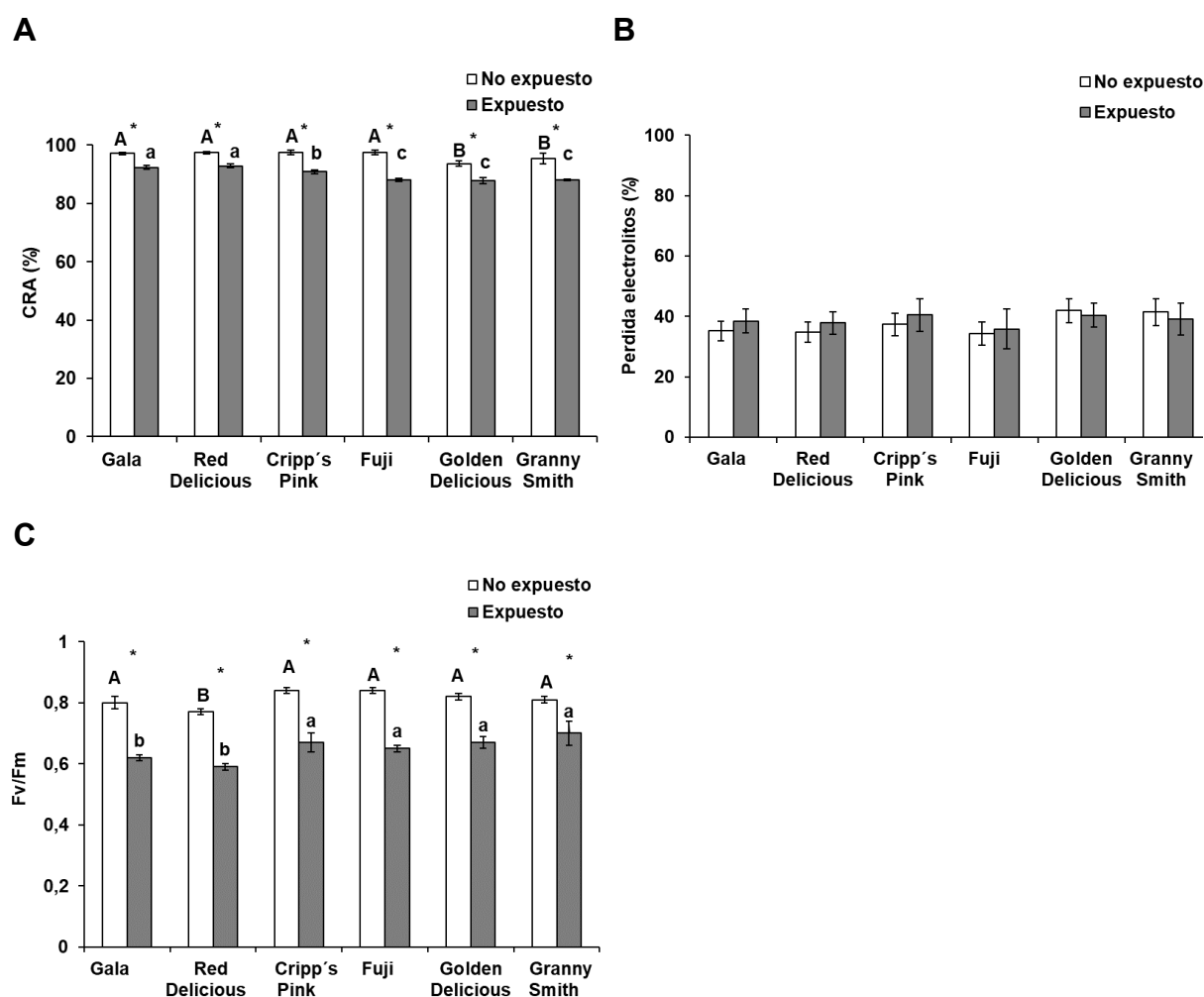


Figura 3.2: Contenido relativo de agua-CRA (A), Pérdida de electrolitos (B) y Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II, medida por fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) (C) en tejidos expuestos y no expuestos a estrés por elevada radiación solar de frutos de seis cultivares de manzana (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Fuji, Golden Delicious y Granny Smith). Las barras indican la media ($n=15$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras (mayúsculas para tejidos no expuestos y minúsculas para tejidos expuestos) presentan diferencias estadísticamente significativas entre variedades; (*) sobre el par de barras indica diferencias significativas entre tejidos no expuestos y expuestos para una misma variedad (DGC; $P \leq 0,05$).

3.2.1.2. Variables bioquímicas

Pigmentos y polifenoles

En las variedades de piel verde y verde-amarilla no se detectó síntesis de antocianinas en tejidos estresados ni en sanos. En cambio, en las variedades de piel

color rojo la exposición a estrés por alta radiación solar redujo el contenido de antocianinas. La variedad más afectada por la exposición fue Gala, en la que se detectó una reducción de 4,25 mg Cianidina 3-glucósido/100 g PF mientras que en el resto de las variedades rojas esa disminución fue de 2 mg Cianidina 3-glucósido/100 g PF (Figura 3.3 A).

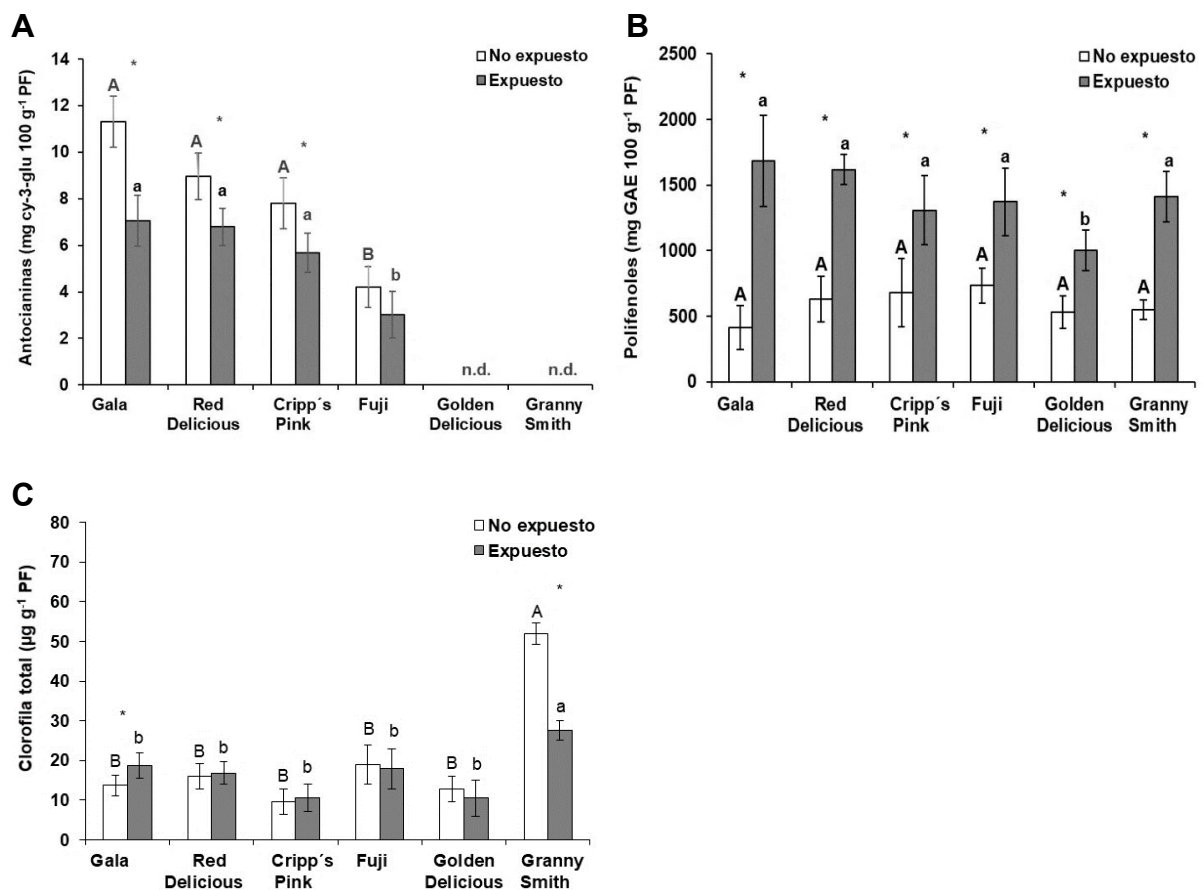


Figura 3.3: Contenido de antocianinas monoméricas totales (A), contenido de polifenoles totales (B) y concentración de clorofila total (C) en tejidos expuestos y no expuestos a estrés por elevada radiación solar de frutos de seis cultivares de manzana (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Fuji, Golden Delicious y Granny Smith). Las barras indican la media ($n=5$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras (mayúsculas para tejidos no expuestos y minúsculas para tejidos expuestos) presentan diferencias estadísticamente significativas entre variedades; (*) sobre el par de barras indica diferencias significativas entre tejidos no expuestos y expuestos para una misma variedad (DGC; $P \leq 0,05$).

El análisis de polifenoles, indicó que el contenido de estos compuestos fue similar en los tejidos no expuestos de las distintas variedades, alrededor de un valor promedio de 590 mg Ac. Gálico/100 g PF (Figura 3.3 B). Los tejidos no expuestos a la radiación solar presentaron significativamente menor contenido de polifenoles totales que los expuestos a estrés. La exposición a estrés por elevada radiación solar indujo un aumento en la concentración de polifenoles de 24-53 % dependiendo de la variedad. El mayor incremento se detectó en la variedad Gala y el menor en Golden Delicious.

La concentración de clorofila dependió fundamentalmente del color de epidermis del fruto. La variedad con mayor concentración de clorofila fue Granny Smith relacionado al intenso color verde de su piel. En las distintas variedades la exposición al sol indujo respuestas dispares. En Gala se observó un 27% más de clorofila en tejidos expuestos y con síntoma DS-1 respecto de los no expuestos al sol. En cambio en los tejidos expuestos de Granny Smith la clorofila disminuyó aproximadamente 50%. En el resto de las variedades (Red Delicious, Cripp's Pink, Fuji y Golden Delicious) no se observaron modificaciones estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) (Figura 3.3 C).

Peroxidación de lípidos y capacidad antioxidante

El estrés impuesto por la elevada radiación solar y temperatura generó daño oxidativo a los lípidos de membranas celulares de todas las variedades estudiadas (Figura 3.4). Las variedades Gala, Red Delicious y Cripp's Pink aumentaron las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico entre 22 y 28 nmol g⁻¹ PF, mientras que en las demás variedades el aumento fue entre 32 y 40 nmol g⁻¹ PF.

Todas las variedades incrementaron la capacidad antioxidante en los tejidos expuestos al sol y el aumento fue diferente según las distintas variedades. Coincidentemente, en las variedades que tenían mayor peroxidación de lípidos, se observó un menor incremento de la capacidad antioxidante (Figura 3.4). Las variedades Gala, Red Delicious y Cripp's Pink aumentaron la capacidad antioxidante en promedio 24 % mientras que Fuji, Golden Delicious y Granny Smith incrementaron 11%.

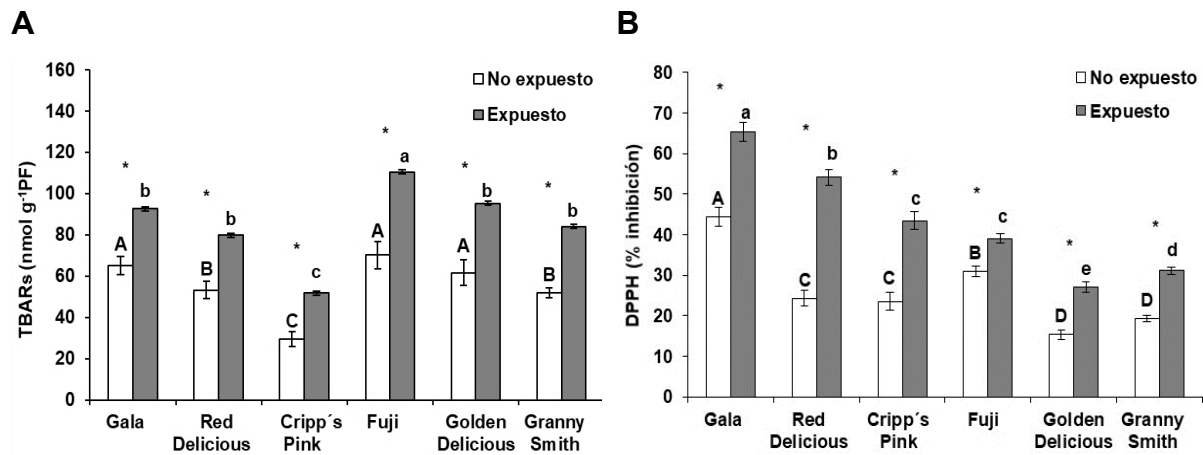


Figura 3.4: Peroxidación de lípidos expresada en especies reactivas al ácido tiobarbitúrico-TBARs (A) y capacidad antioxidante en función de la inhibición del radical 2,2-difenil-1picrilhidrazilo (DPPH) (B) en tejidos expuestos y no expuestos a estrés por elevada radiación solar de frutos de seis cultivares de manzana (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Fuji, Golden Delicious y Granny Smith). Las barras indican la media ($n=5$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras (mayúsculas para tejidos no expuestos y minúsculas para tejidos expuestos) presentan diferencias estadísticamente significativas entre variedades; (*) sobre el par de barras indica diferencias significativas entre tejidos no expuestos y expuestos para una misma variedad (DGC; $P \leq 0,05$).

Enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes estudiadas presentaron, en general, mayor actividad en los tejidos expuestos a alta radiación solar. Las enzimas SOD, APX y GR registraron mayor actividad en todas las variedades, mientras que CAT sólo lo hizo en Gala. En las variedades Gala, Red Delicious y Cripp's Pink la actividad de SOD superó el aumento en un orden de magnitud en los tejidos expuestos al sol respecto a los no expuestos. En las otras variedades, si bien el incremento de actividad fue elevado no llegó a superar el orden de magnitud (Figura 3.5 A). La actividad basal de la APX y el incremento inducido por la exposición a alta radiación solar fue diferente según la variedad estudiada. El aumento fue significativo en Gala, Red Delicious y Cripp's Pink, mientras que, en Fuji, Golden Delicious y Granny Smith no se determinaron cambios significativos (Figura 3.5 B). La actividad basal de la enzima GR fue igual en todas las variedades, registrando en promedio $23,1 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PF}$, aumentando

significativamente en promedio a $62,3 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PF}$ en los tejidos expuestos (Figura 3.5 C). La actividad de la enzima CAT fue diferente según la variedad tratada, registrándose un incremento por exposición al sol solamente en la variedad Gala, mientras que en las restantes variedades no se observaron cambios significativos (Figura 3.5 D).

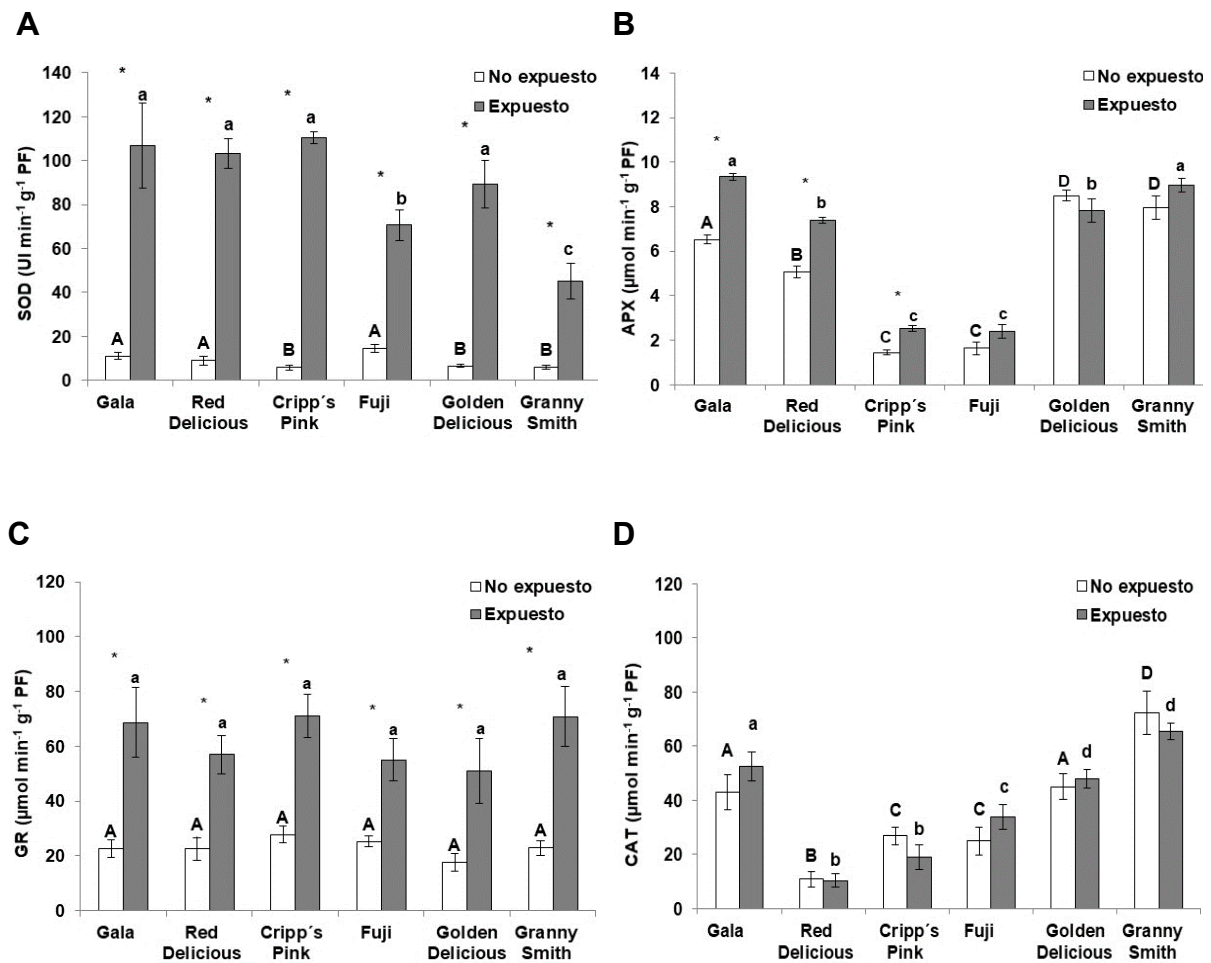


Figura 3.5: Enzimas del metabolismo antioxidante superóxido dismutasa-SOD (A), catalasa-CAT (B), ascorbato peroxidasa-APX (C) y glutatión reductasa-GR (D) en tejidos expuestos y no expuestos a estrés por elevada radiación solar de frutos de seis cultivares de manzana (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Fuji, Golden Delicious y Granny Smith). Las barras indican la media ($n=5$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras (mayúsculas para tejidos no expuestos y minúsculas para tejidos expuestos) presentan diferencias estadísticamente significativas entre variedades; (*) sobre el par de barras indica diferencias significativas entre tejidos no expuestos y expuestos para una misma variedad (DGC; $P \leq 0,05$).

Concentración de hormonas

El contenido basal (tejidos no expuestos al sol) de poliaminas y emisión de etileno fue mayor en las variedades Gala, Red Delicious, Cripp's Pink y Fuji, mientras que en Golden Delicious y Granny Smith el contenido de poliaminas totales fue significativamente menor e inclusive no se detectó emisión de etileno. Para las variedades rojas las poliaminas totales variaron en torno a un valor de $412 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$, mientras que en Golden Delicious y Granny Smith el valor medio fue de $250 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$. La producción de ABA presentó un comportamiento inverso, observándose mayor contenido basal, promedio de $18 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PS}$, en las variedades Golden Delicious y Granny Smith, respecto de $7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PS}$ en el resto de las variedades estudiadas (Figura 3.6). Por lo tanto, las variedades que naturalmente tienen mayor contenido de poliaminas totales y emisión de etileno, presentan menor contenido de ABA.

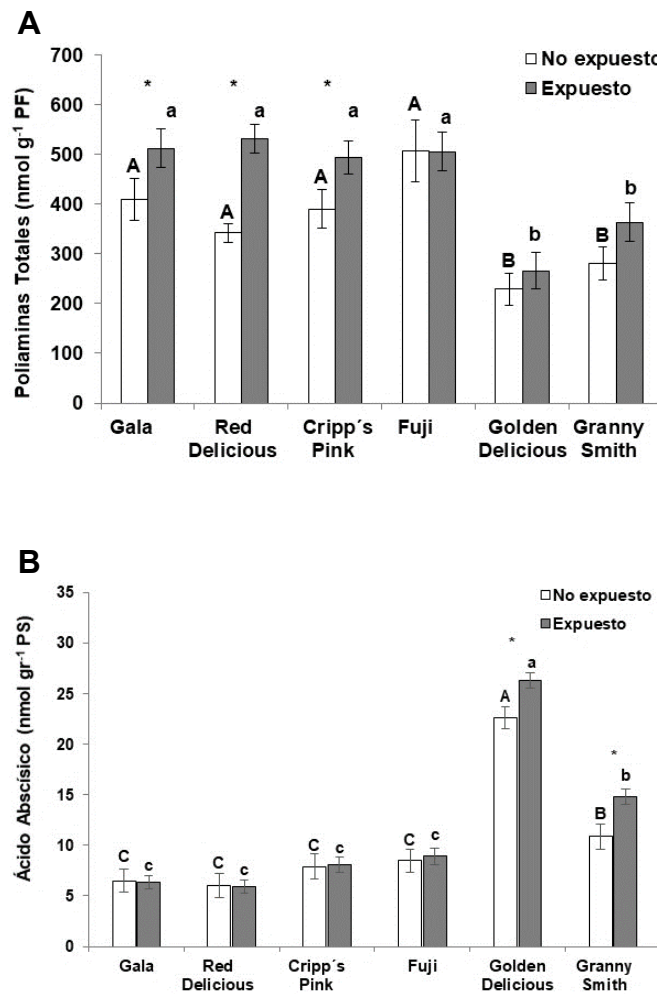


Figura 3.6: Concentración de Poliaminas Totales (A) y Acido Abscísico (B) en tejidos expuestos y no expuestos a estrés por elevada radiación solar de frutos de seis cultivares de manzana (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Fuji, Golden Delicious y Granny Smith). Las barras indican la media ($n=5$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras (mayúsculas para tejidos no expuestos y minúsculas para tejidos expuestos) presentan diferencias estadísticamente significativas entre variedades; (*) sobre el par de barras indica diferencias significativas entre tejidos no expuestos y expuestos para una misma variedad (DGC; $P \leq 0,05$).

La respuesta de síntesis de hormonas frente a la exposición a elevada radiación solar en los tejidos de la piel de los frutos fue diferente según la variedad estudiada. En las variedades Gala, Red Delicious y Cripp's Pink se registró aumento significativo de poliaminas y emisión de etileno, mientras que no se observaron cambios en el contenido de ABA (Figura 3.6 y 3.7). Inversamente, las variedades Golden Delicious y Granny Smith reaccionaron incrementando el contenido de ABA, sin modificar la

concentración de poliaminas ni la emisión de etileno. En la variedad Fuji no se registró reacción en las hormonas estudiadas respecto a la exposición al sol.

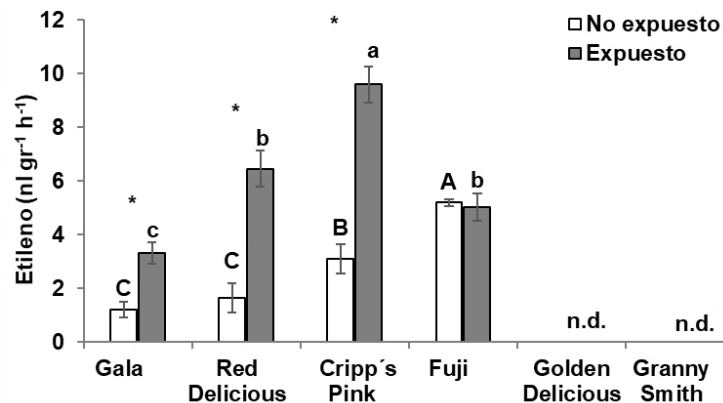


Figura 3.7: Emisión de Etileno en frutos con tejidos expuestos y no expuestos a estrés por elevada radiación solar de seis cultivares de manzana (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Fuji, Golden Delicious y Granny Smith). Las barras indican la media ($n=3$) \pm D.E. Letras distintas sobre las barras (mayúsculas para frutos no expuestos y minúsculas para frutos con tejidos expuestos) presentan diferencias estadísticamente significativas entre variedades; (*) sobre el par de barras indica diferencias significativas entre frutos con tejidos no expuestos y expuestos a elevada radiación solar para una misma variedad (DGC; $P \leq 0,05$).

3.2.2. Selección de variables con mayor potencial descriptivo de la reacción de los tejidos de los frutos de manzana a estrés por elevada radiación solar

En la Figura 3.8 se observa el ACP indicando que entre las componentes CP1 y CP2 (cada una expresada en un eje) se explica el 63% de variabilidad de la respuesta. La componente CP1 está relacionada con la hidratación de los tejidos y la respuesta oxidativa de los mismos frente a la exposición a alta radiación solar. En cambio, la CP2 está relacionada con el color y cambios en la condición hormonal expresada

fundamentalmente por poliaminas totales y ABA, cuyos coeficientes de correlación con CP2 son -0,86 y 0,80, respectivamente (Tabla 3.2).

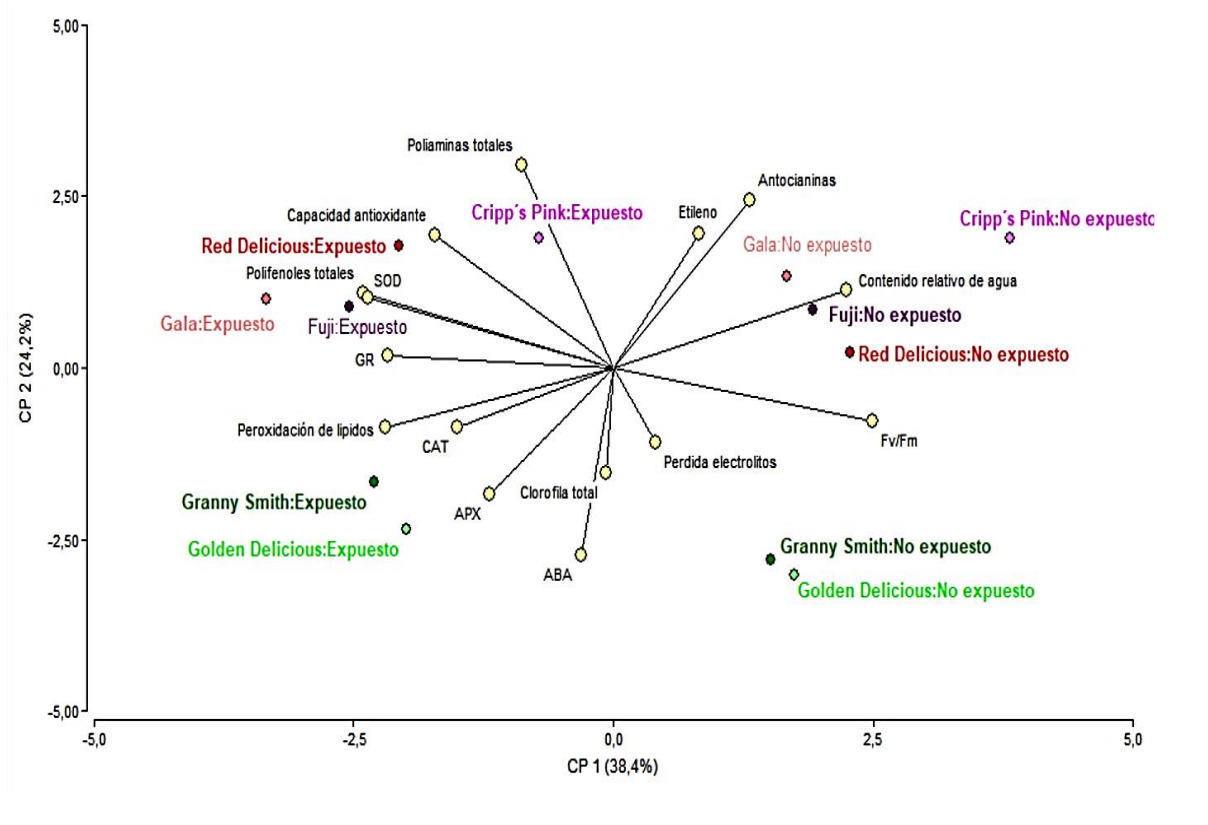


Figura 3.8: Gráfico biplot de las componentes principales determinadas en tejidos expuestos y no expuestos a estrés por elevada radiación solar de frutos de seis cultivares de manzana (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink, Fuji, Golden Delicious y Granny Smith).

De las correlaciones observadas para CP1, las variables que mejor explican el comportamiento de los tejidos frente a estrés por elevada radiación solar son: contenido relativo de agua, polifenoles totales, fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm), peroxidación de lípidos, capacidad antioxidante, las enzimas SOD y GR. Los valores de variable originales que correlacionan mejor con CP2 son antocianinas monoméricas totales y las hormonas poliaminas totales y ácido abscísico (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Coeficientes de correlaciones de las componentes principales CP1 (38,4%) y CP2 (24,2%) con las variables de respuesta originales. Correlación cofenética= 0,908.

VARIABLES DE RESPUESTA	CP 1	CP 2
Contenido relativo de agua	0,83	0,33
Perdida de Electrolitos	0,15	-0,32
Antocianinas monoméricas totales	0,48	0,72
Polifenoles totales	-0,89	0,32
Clorofila total	-0,03	-0,45
Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> (Fv/Fm)	0,92	-0,22
Peroxidación de lípidos	-0,81	-0,26
Capacidad antioxidante	-0,63	0,57
Actividad enzima SOD	-0,87	0,30
Actividad enzima CAT	-0,55	-0,26
Actividad enzima APX	-0,44	-0,54
Actividad enzima GR	-0,80	0,05
Poliaminas totales	-0,33	0,86
Etileno exógeno	0,31	0,57
Ácido abscísico	-0,11	-0,80

3.2.3. Agrupamiento de cultivares de manzana por similitud en la reacción de los tejidos de los frutos al estrés por elevada radiación solar

El agrupamiento de variedades según su respuesta fisiológica y oxidativa se realizó en función a las variables de respuesta cuyos coeficientes de correlación con CP1 fueron mayor o igual a 0,80 (contenido relativo de agua, polifenoles totales, Fv/Fm, peroxidación de lípidos, las enzimas SOD y GR). También se introdujo en el análisis de agrupamiento la concentración de poliaminas totales y de ácido abscísico debido a que correlacionan en más del 80 % con la CP2 (Tabla 3.2).

El resultado indica que dentro de cada grupo formado por exposición (expuestos y no expuestos) se produce una primera separación, dejando un conjunto con características similares formado por Granny Smith y Golden Delicious y otro por las variedades de frutos de piel roja. Dentro de los tejidos no expuestos de las variedades

rojas el asociamiento por similitud se da en dos grupos, uno formado por Red Delicious y Cripp's Pink y otro constituido por Gala y Fuji. El agrupamiento en los tejidos expuestos de las variedades de piel roja se diferencia del obtenido en tejidos no expuestos. En los primero se observa un grupo formado por Red Delicious y Gala que tienen similitud con Fuji, separándose de Cripp's Pink (Figura 3.9).

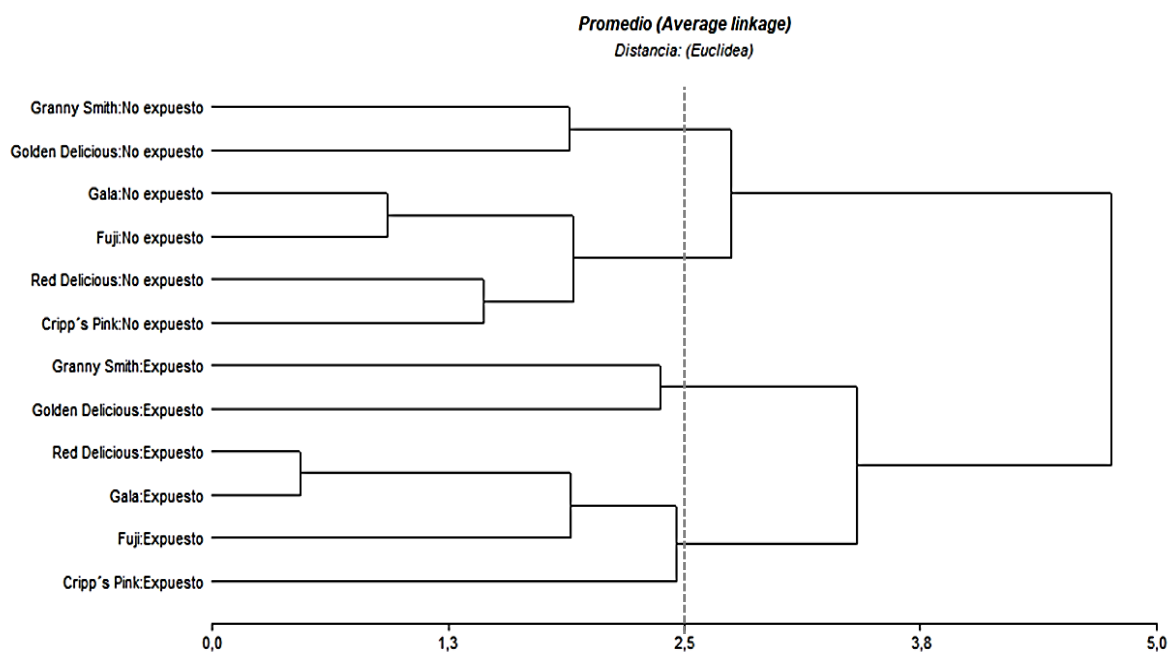


Figura 3.9: Agrupamiento de variedades de manzana por similitud en la reacción de los tejidos de los frutos al estrés por elevada radiación solar y temperatura. Método basado en los promedios (Average linkage) y distancia Euclídea. La línea punteada indica el 50% de la distancia máxima divisoria de grupos.

3.3. DISCUSIÓN

El ACP es una herramienta estadística cuyo objetivo es describir la estructura de variación de un conjunto de datos generando nuevas variables (componentes principales) no correlacionadas y que se expresan como una combinación lineal de las variables originales (de la Fuente Fernández, 2011). Este método junto a la construcción de gráficos conocidos como biplot (diagrama de dispersión que representa la distribución conjunta de tres o más variables), son técnicas de reducción de dimensión que permiten, con pérdida mínima de información, examinar todos los

datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables (Balzarini y col., 2008). Mediante estas técnicas se pudo reducir la información proporcionada por las variables de respuesta a dos componentes que se relacionan en 62,6 % a la respuesta de los frutos de diferentes variedades de manzana a estrés por alta radiación solar. La primera componente (CP1) contiene el 38,4 % de la información y separa la respuesta de los tejidos expuestos a elevada radiación solar y temperatura de los no expuestos. La segunda componente (CP2) representa el 24,2% de la información y se asocia al comportamiento hormonal en respuesta a la exposición al sol de los tejidos.

La caracterización inicial comprendía el análisis de 15 variables de respuesta. Observando los coeficientes de correlación entre las componentes principales y las variables originales estandarizadas se pueden identificar las variables con mayor contribución en la explicación de la variabilidad entre observaciones en el eje asociado a una componente principal (Balzarini y col., 2008), lo que permitió descartar 4 variables de respuesta. Esas variables fueron pérdida de electrolitos, clorofilas totales y actividad de las enzimas CAT y APX, cuyos grados de asociación con una componente principal fueron menor o igual a 55 %.

La pérdida de electrolitos no aporta información sustancial debido a que en el presente estudio se trabajó con tejidos que presentaban síntomas de estrés por elevada radiación solar correspondiente a nivel subletal (Felicetti y Schrader, 2008a). Estos resultados corroboran que el nivel de estrés por elevada radiación solar al que estuvieron sometidos los frutos durante su desarrollo fue leve y no fue suficiente para provocar daño en las membranas celulares.

En coincidencia con otros trabajos realizados en manzana se observó una reducción de clorofilas totales en los tejidos expuestos al sol, fundamentalmente en frutos de piel verde (Merzlyak y col., 2002; Chen y col., 2008; Tartachnyk y col., 2012), pero esta variación aporta sólo 15% a la CP1 y 32% a CP2. Lo mismo sucede con la actividad de las enzimas CAT y APX. Si bien, estos resultados coinciden con estudios realizados por Ma y Cheng (2004) en que la actividad de la enzima APX aumenta por estrés por alta radiación solar en manzanas, se muestra que existe un aumento significativo solamente en tres de las seis variedades analizadas. Por otra parte, la enzima CAT es sensible a la luz y se foto-inactiva (Shang y Feierabend, 1999). En tal sentido, el incremento de la actividad de CAT fue significativo sólo en una variedad.

Estos resultados coinciden con otros trabajos que indican que CAT no es una enzima importante en la fotoprotección en la piel de manzana (Cheng y Ma 2004; Chen y col., 2008).

Una vez reducido el número de variables de respuesta a las 11 que mejor expresan la variabilidad en los datos, se procedió a un análisis de Conglomerados. Este tipo de procedimiento estadístico permite agrupar objetos descritos por un conjunto de valores de varias variables, tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos (Balzarini y col., 2008). En el dendrograma resultante se visualizan dos grupos bien definidos, determinando que independientemente de la variedad, las características de los tejidos no expuestos a estrés por alta radiación solar son diferentes a las de los expuestos. Esta diferenciación estuvo relacionada a cambios en variables fisiológicas (contenido relativo de agua y F_v/F_m) y a variables que describen el sistema antioxidante. Una vez diferenciados los tejidos por exposición, se presentaron asociaciones entre variedades que se repitieron de la misma manera tanto en tejidos no expuestos como expuestos. Las variedades verdes se agruparon separadas de las rojas en función, principalmente, al comportamiento observado en el contenido de hormonas.

Los tejidos no expuestos de todas las variedades registraron un estado de hidratación de 96,4 % en promedio, lo que se asocia a células que no sufrieron estrés por elevada temperatura, ni radiación (Racskó y col., 2005). En cambio, en tejidos expuestos al sol se registró mayor deshidratación en la variedad Fuji seguida de Golden Delicious y Granny Smith. La deshidratación ocasionada por la exposición al sol se relacionó directamente con la susceptibilidad de las variedades al daño por sol que hemos evaluado en trabajos previos realizados en la región del Alto Valle de Río Negro (Colavita, 2008). Estos resultados coinciden y amplían estudios previos reportados por Torres y col. (2013), quienes observaron menor contenido relativo de agua en tejidos con daño por sol en la variedad Fuji.

La intensidad de la radiación necesaria para alcanzar el nivel de saturación para el proceso de fotosíntesis es variable entre distintos órganos y tejidos. En el caso de las áreas verdes de frutos de calabaza (*Cucurbita pepo*) se determinó que la fotosíntesis alcanza el máximo a una intensidad de radiación fotosintéticamente activa de $500 \mu\text{mol de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Aschan y Pfan, 2003). En hojas (órganos adaptados a la fotosíntesis) de manzanas el nivel de saturación se alcanza próximo a $800 \mu\text{mol}$

$\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Tartachnyk y Blanke, 2004). Durante el desarrollo de los frutos de manzanas cultivadas en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén los tejidos expuestos al sol habitualmente están sometidos a flujos fotónicos de aproximadamente $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Capítulo 2, 2.2.1). Estos valores indican que los frutos estudiados han soportado ambientes de radiación solar estresante. La eficiencia cuántica máxima del fotosistema II, evaluada a través de la fluorescencia de la clorofila *a* (Fv/Fm) se ha reportado como un buen indicador de estrés por sol en manzanas (Chen y col., 2008; Seo y col., 2008). Los datos experimentales obtenidos en este estudio revelaron que los tejidos expuestos presentaron una eficiencia cuántica significativamente menor que la correspondiente a los tejidos no-expuestos, lo cual se verificó en todas las variedades analizadas. Los resultados indicaron que la pérdida de integridad del fotosistema II por exposición de los tejidos a estrés fue significativa en todas las variedades. No obstante, se encontró que la disminución en Fv/Fm en las variedades Gala y Red Delicious fue mayor que en el resto. Esto coincide con lo descrito por Glenn y Yuri (2013), quienes reportaron que en la variedad Gala el aumento de radiaciones UV y PAR redujeron Fv/Fm en mayor medida que en la variedad Granny Smith.

Las antocianinas son un tipo de flavonoides que actúan como filtros naturales de radiaciones solares con efecto antioxidante, además de dar color a la piel del fruto (Vanderauwera y col., 2005; Solovchenko y Merzlyak, 2008; Martínez-Cruz y col., 2011). Investigaciones realizadas con mutantes naturales de peras 'Red Anjou' y 'Green Anjou' indicaron que los frutos de piel roja tienen mayor capacidad antioxidante debido a la posibilidad de sintetizar antocianinas (Li y col., 2008). En el caso de manzanas, en todas las variedades de piel roja se observó degradación de antocianinas en los tejidos con síntomas de estrés por exposición a elevada radiación solar, independientemente de la concentración que presentaran los tejidos no expuestos. A resultados similares arribaron Felicetti y Schrader (2008) trabajando con diferentes grados de daño por sol en manzanas variedad Fuji. Una posible explicación es que las altas temperaturas alcanzadas en el fruto, producto de la elevada radiación que causa daño por sol, producen degradación de las antocianina en la piel de la fruta (Mori y col., 2007).

En los tejidos expuestos al sol la energía radiante incidente puede superar a los mecanismos de disipación y conducir a la formación de EROs, generando una

situación desfavorable (Foyer y Harbinson, 1994; Müller y col., 2001; Muñoz y Munné-Bosch, 2018). Al igual que otros investigadores (Yuri y col., 2014; Zhao y col., 2016) se observó un aumento de la capacidad antioxidante en los tejidos expuestos al sol. Sin embargo, los resultados obtenidos midiendo peroxidación lipídica indican que dicho incremento no fue suficiente para evitar la peroxidación de los lípidos de la membrana celular, produciendo sustancias características como el malodialdehído y 4-hidroxi-alquenes que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (Hodges y col., 1999; Pospíšil, 2016). En los tejidos expuestos al sol la peroxidación de lípidos llegó a ser 40% mayor que en los no expuestos.

Las plantas sometidas a estrés oxidativo incrementan el contenido de sustancias antioxidantes, entre ellas los polifenoles que actúan quelando metales de transición y secuestrando EROs (Sharma y col., 2012). Por esta razón es bien conocido el valor nutricional que aportan los polifenoles presentes en la piel de las manzanas para proteger contra el estrés oxidativo (Vieira y col., 2009; Raudone y col., 2016). Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por diferentes autores, donde el incremento significativo en el contenido de polifenoles fue una respuesta común en todas las variedades de manzana analizadas (Hernandez y col., 2014; Yuri y col., 2014; Zupan y col., 2014).

La variación en el patrón de enzimas antioxidantes también indicó que los tejidos expuestos al sol respondieron al estrés oxidativo generado por la elevada radiación solar. La mayor expresión de esta reacción antioxidante la registraron las enzimas SOD y GR. La actividad de la enzima SOD aumentó en 10 veces y este aumento fue acompañado por un incremento de 2,7 veces de la actividad GR que es la enzima encargada de mantener elevado el contenido de glutatión reducido en la célula, tomando electrones del NAD(P)H₂, permitiendo así operar el ciclo del glutatión-ascorbato (Noctor y col., 2011).

Si bien los cambios en el sistema antioxidante frente a la exposición a elevada radiación solar contribuyeron a definir los dos conglomerados más distanciados (tejidos expuestos y no expuestos), las modificaciones en el contenido de hormonas significaron el mayor aporte en la diferenciación de grupos por variedades. Un criterio arbitrario de corte frecuentemente utilizado es trazar una línea de referencia en un punto igual al 50% de la distancia máxima divisoria de grupos (Balzarini y col., 2008). Aquí, el valor corresponde aproximadamente a 2,5 y tanto en los tejidos no expuestos,

como expuestos divide claramente dos conglomerados; un grupo lo constituyen las variedades de piel roja que se separan de las verde y verde-amarilla. Estas últimas son las variedades Granny Smith y Golden Delicious cuyos frutos presentaron un comportamiento hormonal frente al estrés por elevada radiación solar inverso al registrado en las variedades rojas (Gala, Red Delicious, Cripp's Pink y Fuji).

Comparado a las variedades rojas, Granny Smith y Golden Delicious presentaron mayor estrés oxidativo (medido en términos de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico) asociado a que desarrollaron menor capacidad antioxidante. Si bien en los tejidos expuestos estas variedades presentaron niveles de polifenoles similares al resto de las variedades, la menor capacidad antioxidante puede haber estado relacionada a que no sintetizaron antocianinas, incrementaron en promedio un 50% menos la actividad de enzima SOD y no aumentaron la actividad de CAT ni APX.

Analizando los resultados respecto al contenido basal de las tres hormonas estudiadas y la reacción de los tejidos frente a elevada radiación solar, Golden Delicious y Granny Smith registran un comportamiento opuesto al de las variedades rojas. Estas últimas muestran una situación y dinámica hormonal que les aportarían mejores características para reaccionar al estrés impuesto. Los tejidos no expuestos de Gala, Red Delicious y Cripp's Pink presentaron mayor contenido de poliaminas y, a su vez, cuando fueron sometidos a estrés registraron un aumento significativo de las mismas. El incremento de poliaminas, en ambientes con elevada radiación actúan reduciendo las condiciones de estrés, interactúan con macromoléculas cargadas negativamente secuestrando radicales libres, modulando canales iónicos y estabilizando membranas, ácidos nucleicos y proteínas (Kuznetsov y Shevyakova, 2007; Calzadilla y col., 2014; Minocha y col., 2014; Pottosin, 2015).

Los frutos de las variedades rojas que presentaron síntomas de daño leve por sol sintetizaron etileno, mientras que en Golden Delicious y Granny Smith no se registró producción de esta hormona. Estos resultados coinciden con Torres y col. (2013) que reportaron incremento en la concentración interna de etileno en tejidos de manzanas rojas que presentaban moderado síntoma de daño por sol. El etileno es una hormona relacionada con la maduración, pero se ha encontrado que los factores de transcripción relacionados a etileno ERFs se activan no sólo durante el desarrollo sino también en situaciones de estrés (Lara y Vendrell, 2000; Wang y col., 2013). La posibilidad de sintetizar etileno frente a estrés por sol pondría a las variedades rojas

en ventaja respecto de las verdes dado que el etileno actúa regulando positivamente proteínas de choque térmico (Li y col., 2011), síntesis de antocianinas (Jiang y Joyce, 2003; Lewis y col., 2011) y mecanismos de secuestro de EROs (Zhang y col., 2016).

Estudios realizados con aplicaciones de ABA exógeno indicaron que esta hormona podría inducir la síntesis de etileno en frutos como frutilla (Jiang y Joyce, 2003) y manzana (Lara y Vendrell, 2000). No obstante, investigaciones realizadas por Yu y col. (2019) en plántulas de *Arabidopsis thaliana* demostraron que el etileno actúa antagónicamente con el ABA en la regulación de la biosíntesis de ácido ascórbico. En situaciones de estrés, el ABA inhibe la síntesis de ácido ascórbico aumentando la acumulación de especies reactivas de oxígeno, mientras que el etileno actúa de manera inversa. En las variedades Golden Delicious y Granny Smith no se detectó emisión de etileno, y fueron las que mayor concentración de ABA presentaron en los tejidos no expuestos, la cual a su vez se incrementó significativamente con la exposición al sol.

Si bien, en las variedades de piel roja se determinó que las aplicaciones exógenas de ABA incrementan el contenido de ácido ascórbico, polifenoles, y antocianinas (Iams y col., 2009), estudios realizados por Mupambi y col. (2018) sugieren que en variedades verdes como Granny Smith podrían regular negativamente la síntesis de antioxidantes.

CONCLUSIÓN

Los tejidos de manzana expuestos a elevada radiación solar y temperatura que presentan daño por sol leve difieren de los sanos tanto desde el punto de vista fisiológico como bioquímico. Estas diferencias están asociadas a la hidratación de los tejidos, la integridad del fotosistema II, la repuesta antioxidante y la concentración de hormonas.

En las variedades de manzanas de piel roja respecto de las verde y verde-amarillenta la intensidad de los mecanismos para afrontar las condiciones ambientales que producen daño por sol es diferente. En este estudio, las variedades de manzanas rojas presentaron mayor capacidad de adaptación a alta intensidad solar y temperatura que Granny Smith y Golden Delicious. Esta característica se asoció a una mayor capacidad de sintetizar sustancias antioxidantes como polifenoles y antocianinas, sumado a mayor actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GR y a

la posibilidad de incrementar la concentración de hormonas involucradas en mecanismos para reducir el estrés.

Por lo tanto, las variedades de manzana que presentan distinta susceptibilidad de los frutos al desarrollo de la fisiopatía daño por sol difieren en las respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés por alta radiación solar combinado con elevada temperatura.

CAPÍTULO IV

**Efecto de ABA exógeno sobre las defensas antioxidante,
calidad de frutos y fisiología de manzanos cultivados bajo
elevada radiación solar y temperatura**

INTRODUCCIÓN

Las plantas, siendo organismos sésiles, no pueden desplazarse para evitar condiciones ambientales adversas, lo que llevó evolutivamente a que hayan desarrollado mecanismos para sobrevivir. Dentro de ellos, la participación de las hormonas vegetales como moduladores de procesos han sido consideradas fundamentales. El ácido abscísico (ABA) es una hormona central en los procesos de las plantas asociados a la resistencia frente a estrés abiótico (Chen y col., 2020).

Se ha reportado que el ABA regula aspectos del desarrollo de la planta en respuesta a las tensiones ambientales desfavorables como sequía, elevada salinidad, temperatura extremas, alta radiación y metales pesados (Vishwakarma y col., 2017). En condiciones de estrés ambiental, la expresión de genes relacionados con el estrés se regula rápidamente. Aplicando ABA exógeno se han observado cambios similares en la expresión de genes a los registrados en la respuesta natural frente al estrés. Estos resultados indican que el estrés ambiental acentúa la producción de ABA y que en la respuesta adaptativa del desarrollo de la planta participa activamente la síntesis de ABA (Hong y col., 2013). Frente a condiciones ambientales adversas que promueven estrés oxidativo, se ha determinado que el ABA modula la expresión de genes relacionados a la síntesis de enzimas y componentes no-enzimáticos antioxidantes (Li y col., 2010; Ibrahim y Jaafar, 2013).

Por otra parte, se ha documentado que el ABA tiene participación en los mecanismos de respuesta a condiciones de estrés abiótico en frutos (Leng y col., 2014). La función protectora del ABA en frutos expuestos a alta radiación solar podría estar relacionada a la activación del sistema antioxidante y a mecanismos reguladores de la síntesis de etileno (Lara y Vendrell, 2000), el cual está asociado al proceso de maduración y síntesis de antocianinas y sustancias fenólicas, tal como fue observado en frutos de frutillas por Jiang y Joyce (2003). En uva de mesa se ha determinado que la aplicación exógena de ABA durante el desarrollo del fruto intensifica el color de las bayas (Cantín y col., 2007; Lurie y col., 2010), induce incremento de compuestos fenólicos (Ruiz-García y col., 2013), y aumenta la capacidad antioxidante y la síntesis de antocianinas (Quiroga y col., 2009; Sandhu y col., 2011). Si bien en uva se ha comprobado que las aplicaciones exógenas de ABA producen incremento en

antocianinas y fenoles y así aumento de defensas antioxidantes, en frutos de manzana existen pocos reportes. Al respecto, Iamsub y col. (2008) observaron que la aplicación exógena de ABA provocaba una disminución del número de frutos afectados por alta radiación solar. No obstante, existen controversias sobre la posible acción de aplicaciones exógenas de ABA para disminuir daño de sol en frutos. Mientras trabajos realizados en manzana cv. Tsugaru, Yataka y Fuji indican que el ABA exógeno atenuó el daño de sol (Iamsub y col. 2009), no se detectó dicho efecto en trabajos realizados en cv. Granny Smith (Mupambi y col., 2018).

El ABA está involucrado en la respuesta de las hojas a la exposición solar aumentando enzimas antioxidantes y pigmentos fotoprotectores (Alonso y col., 2015), a la vez que incrementa la translocación de fotoasimilados, debido al aumento del área del floema y del contenido de translocadores de azúcares (Murcia y col., 2016). No obstante, se sabe que la acumulación de ABA en las células oclusivas disminuye la conductancia estomática, lo cual afecta el intercambio gaseoso y por lo tanto disminuye la fotosíntesis neta (Taiz y Zeiger, 2006; Li y col, 2010). Pese a los posibles efectos positivos que se están empezando a estudiar en la promoción de calidad en frutos, las aplicaciones exógenas de ABA impactan en aspectos vegetativos de la planta. Por lo tanto, la evaluación del efecto del ABA sobre parámetros foliares, fuente de fotoasimilados para los frutos, es importante a la hora de definir una práctica tecnológica en base a aplicación exógena de esta hormona.

Según lo propuesto por los informes de Racsko y Schrader (2012) y Chen y col. (2020) es perentorio descifrar el papel del ABA en diversos procesos fisiológicos de las plantas para proporcionar bases teóricas que permitan diseñar tratamientos para mejorar la producción, calidad y resistencia de los cultivos.

Objetivo

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de aplicaciones exógenas de ABA sobre la promoción de defensas antioxidantes, la calidad de los frutos y variaciones en los aspectos vegetativos de las plantas de manzanos cultivados en condiciones de elevada radiación solar y temperatura.

Hipótesis

Las aplicaciones exógenas de ABA incrementan la capacidad de respuesta antioxidante, afectan la calidad de los frutos y modifican parámetros vegetativos en plantas de manzanas cultivadas en condiciones de estrés por elevada radiación solar y temperatura.

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. Sitio de estudio, condiciones climáticas

El estudio fue llevado a cabo en una parcela de manzanos plantados a una distancia de 3 m entre plantas y 4 m entre filas. La parcela estaba constituida por manzanos de la variedad Red Delicious (frutos rojos) y Granny Smith (frutos verdes), plantados en 3 filas alternadas de cada variedad. La parcela recibió las pautas de cultivo y tecnología establecidas por los estándares de INTA, estación Alto Valle. El estudio fue en la temporada de crecimiento 2017-18 en los meses de diciembre, enero y febrero. Las temperaturas máximas registradas en la estación meteorológica EEA-Alto Valle-Cinco Saltos (38° 50' 41" S; 68° 04' 09" W; 282 msnm) durante el periodo fueron de 34,8 °C, 39,4 °C y 37,7 °C para diciembre, enero y febrero respectivamente. La radiación media máxima durante esos meses fue de 1995 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las determinaciones de condiciones ambientales se realizaron con las metodologías y el instrumental detallados en la sección Materiales y Métodos Generales.

4.1.2. Material vegetal y sistema experimental

El tratamiento consistió en pulverizaciones de solución acuosa de ácido abscísico S-ABA (*ProTone SL*[™], Valent BioSciences, Libertyville, IL, USA) a una concentración de 1500 μM . Se realizó una aplicación por mes, durante diciembre, enero y febrero a 5 árboles de cada variedad, y como control se marcaron 5 árboles de iguales características a los tratados. Cada árbol constituyó una repetición y estuvo separado de los otros tratamientos por al menos 3 árboles para evitar posibles interferencias. Las aplicaciones se realizaron hasta previo punto de goteo con pulverizador de mochila a explosión 3,8 hp, 362d28 (Husqvarna, Suecia). El diseño experimental fue completamente aleatorizado. En la región del Alto valle el clima es

árido, por lo tanto, las pulverizaciones se realizaron al atardecer, para aprovechar las condiciones de mayor humedad relativa, temperaturas entre 25 a 30 °C y menor incidencia de viento.

4.1.3. Determinaciones de variables de respuesta

4.1.3.1. Parámetros evaluados en frutos

Los parámetros fisiológicos y bioquímicos evaluados en la piel de frutos se midieron sobre frutos sanos (DS-0, Figura 4.2) tomando muestras de tejidos de la cara expuesta y no expuesta al sol de un mismo fruto. En cada una de ellas se evaluó: peroxidación de lípidos, capacidad antioxidante (DPPH), fenoles totales, antocianinas, clorofila, carotenos, contenido relativo de agua (CRA), Fv/Fm y pérdida de electrolitos. Estas metodologías están detalladas en el capítulo Materiales y Métodos Generales.

Al momento de la fecha de cosecha comercial se evaluaron los índices de calidad en muestras de 20 frutos por tratamiento. Los índices de calidad evaluados fueron:

Firmeza de pulpa

La firmeza de la pulpa se determinó a través de un presiómetro Effegi modelo 327, Italia, con émbolo de 11,1 mm. Se retiró la epidermis y se realizaron dos lecturas en la zona ecuatorial de los frutos (Mitcham y col., 1996). Los resultados fueron expresados en Newton (N).

Sólidos solubles

La determinación de la concentración de sólidos solubles se realizó extrayendo gotas de jugo de pulpa que se colocaron dentro de un refractómetro ERMA (0-32%) Tokio, Japón y los resultados se expresaron en grados Brix (Mitcham y col., 1996).

Acidez total titulable

La acidez titulable se midió en 20 manzanas a las cuales se extrajo el jugo de pulpa mediante extractor centrifugo, luego se tomó 10 ml y tituló con NaOH 0,1N hasta

pH 8,2 medido con un pHmetro digital. La acidez total titulable y se expresó como % de ácido málico (Mitcham y col., 1996).

Degradación de almidón

La cuantificación de la degradación de almidón se realizó a través de la prueba con reactivo de Lugol (0,33% p/v de I₂ + 0,66% p/v de KI). Los frutos fueron cortados en la región ecuatorial y la mitad que contenía el pedúnculo fue sumergida en la solución de Lugol durante un minuto. Cuando se retiraron de la solución, los frutos teñidos fueron comparados con los valores de la carta del test de degradación de almidón del INTA, donde 0% indica la ausencia de degradación (contenido máximo de almidón), mientras que 100% indica la total degradación (ausencia de almidón en la muestra).

Tamaño de fruto

Para la evaluación del tamaño de frutos se analizó la totalidad de los frutos de las 5 plantas tratadas y las 5 controles, pesando cada fruto con una balanza Ohaus, CR621, Ohaus, USA (2000 g ± 1 g) y midiendo diámetro con calibre electrónico marca Güss. La carga frutal fue de 330-350 frutos por planta.

Color de frutos

El color de la epidermis fue medido sobre 20 frutos controles y tratados, con un colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Tokyo, Japan), para lo cual se obtuvieron dos registros por medición. Se trabajó en el espacio de color representado en coordenadas cilíndricas denominado CIE-L* C* h°. En este espacio de color, L* indica luminosidad y va de 0 (negro) a 100 (blanco), C* (Croma) mide la saturación o cercanía al color puro, y h° (Hue) es el ángulo de tonalidad que indica la sensación de color dominante (Figura 4.1). El colorímetro fue calibrado con una superficie estándar en el blanco (provista por los fabricantes del aparato) (McGuire, 1992).

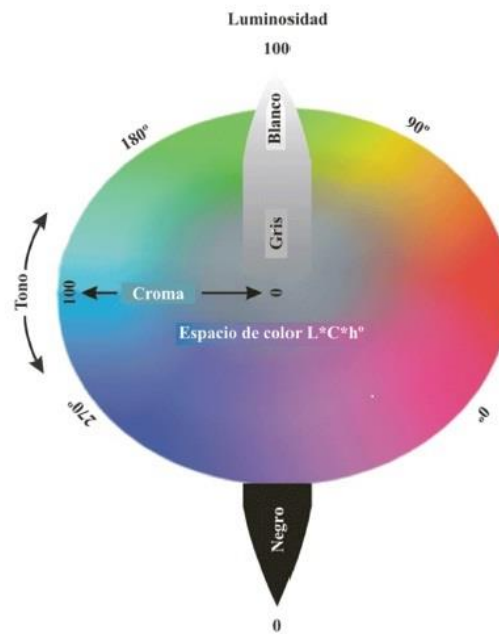


Figura 4.1: Representación del espacio cromático cilíndrico CIE-L*a*b*. Imagen tomada de Padrón Pereira y col. (2012)

Incidencia de daño por sol

Para determinar la incidencia de daño por sol se clasificaron visualmente 350 frutos de 5 plantas por tratamiento y 5 plantas control. La clasificación de los frutos se realizó según tres niveles de síntoma de daño por sol (Figura 4.2) correspondientes a DS-0 (fruto sano), DS-2 (fruto con daño leve, presentaban una leve a moderada coloración bronceada-amarillenta en la zona afectada) y DS-4 (fruto con daño grave, presentaban desde coloración bronceada a necrosis).



Figura 4.2: Frutos de manzana var. Granny Smith (verde) y Red Delicious (rojo) con distintos niveles de síntomas de daño por sol en frutos. DS-0, fruto sin daño; DS-2, frutos con daño por sol leve; DS-4, frutos con daño por sol grave. Adaptada de Felicetti y Shrader (2008b).

4.1.3.2. Parámetros evaluados para aspectos vegetativos

Entre las 13:00-14:00 horas se recolectaron hojas completamente expandidas y de mitad del brote vegetativo, se acondicionaron en cámara húmeda y se llevaron al laboratorio. Se utilizaron 6 hojas por tratamiento para evaluar CRA, pérdida de electrolitos, peroxidación de lípidos, capacidad antioxidante, concentración de clorofila y Fv/Fm. Estos parámetros se evaluaron según las metodologías descritas en la sección Materiales y Métodos Generales.

Fotosíntesis neta y variables asociadas

Las mediciones de intercambio gaseoso se realizaron entre las 12:00-14:00 horas, sobre 10 hojas sanas, intactas, de la mitad del brote, completamente expandidas y expuestas al sol (PAR 2600 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ubicadas en la cara norte de la fila de plantación. La concentración de CO₂ de referencia fue 390 ppm. El área foliar evaluada fue de 2,5 cm² y la temperatura de la hoja fue de 32±2°C. El instrumental utilizado fue un analizador infrarrojo de gases (IRGA) en sistema abierto de tipo diferencial con un medidor Ciras-2 (PP Systems, Amesbury, USA). Las

variables obtenidas fueron fotosíntesis neta (P_n), tasa de transpiración (EVAP), conductancia estomática (g_s) y concentración de CO_2 interno (C_i).

Con el fin de ampliar el análisis de aspectos vegetativos, se seleccionaron 20 ramas por tratamiento y se midieron el **área foliar** (determinada con un medidor de área foliar, LI-3100, LI-COR, USA), **largo total de la rama** y **largo de la primera filotaxis**. También se evaluó:

Materia seca de las hojas

Se utilizó la totalidad de las hojas de cada rama, se las secó en estufa a $80^\circ C$ hasta lograr peso constante (aproximadamente 48 h) y se determinó el contenido de materia seca.

Índice SPAD

Para evaluar el índice SPAD se hicieron 4 determinaciones por hoja, en 20 hojas por tratamiento, utilizando un medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Minolta, Japón).

Densidad estomática

La densidad estomática se analizó en 10 hojas por tratamiento. En cuatro zonas internervales de cada hoja se contó la cantidad de estomas por campo óptico mediante imágenes de microscopio binocular (Axio Lab A1, Carl Zeiss, Alemania) con resolución 40X. Se calculó el área con un portaobjeto micrómetro y se determinó la densidad estomática por mm^2 .

4.1.4. Análisis estadístico

Las pruebas de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas se determinaron por el test de Lilliefors y de Levene, respectivamente. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa InfoStat (2016). Los datos de las variables de respuesta fueron sometidos a Análisis de la Varianza (ANOVA) y en todos los casos en los cuales se comparaban las medias de las variables de interés, se realizaron pruebas de DGC con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$).

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Estado oxidativo y fisiológico de los tejidos de piel de frutos

A continuación, se detallan los resultados obtenidos respecto a la evaluación de los parámetros oxidativos y fisiológicos en piel de frutos expuestos y no expuestos al sol y el efecto de la aplicación de ABA en los mismos.

Tabla 4.1: Efecto de la aplicación de ABA en el metabolismo oxidativo de piel de frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith expuestos y no expuestos a elevada radiación solar y temperatura. Peroxidación de lípidos de membranas celulares fue medido por especies reactivas al ácido tiobarbiturico, TBARs y capacidad antioxidante determinada usando diphenylpicryl-hydrazyl, DPPH. Los parámetros fueron medidos en momento de cosecha.

Variedad	Tratamiento	TBARs (nmol g ⁻¹ PF)		DPPH (% Inhibición)		Fenoles totales (mg GAE g ⁻¹ PF)	
		Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto
		Red Delicious	Control	193,3 a	137,2 a	32,6 a	32,3 a
	ABA	183,6 a	135,2 a	32,7 a	28,7 a	364,9 a	270,1 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,0520</i>	<i>0,7702</i>	<i>0,9721</i>	<i>0,1652</i>	<i>0,8102</i>	<i>0,1241</i>
Granny Smith	Control	155,5 a	146,1 a	27,4 a	23,3 a	566,1 a	367,5 a
	ABA	128,3 b	107,0 b	23,8 b	25,4 a	568,5 a	418,6 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,0278</i>	<i>0,0489</i>	<i>0,0145</i>	<i>0,1275</i>	<i>0,9755</i>	<i>0,4192</i>

Los valores son la media ($n=5$). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

Los tejidos de piel de fruto expuestos al sol de ambas variedades de manzana presentaron una tendencia a mayor peroxidación de lípidos y concentración de polifenoles tanto en frutos control como tratados con ABA (Tabla 4.1). Estos resultados están en coincidencia con los reportados en el capítulo 1 en el cual se determinó que tejidos con síntomas leves de estrés por elevada radiación solar tenían aumentados los parámetros oxidativos de los tejidos.

Analizando los tejidos expuestos al sol, la aplicación exógena de ABA en Red Delicious no produjo una atenuación significativa de la peroxidación de lípidos, sólo

se registró una reducción del 5%. No obstante, en la variedad Granny Smith la aplicación de ABA disminuyó significativamente la peroxidación lipídica, siendo un 17 % menor en tejidos expuestos y 33% menor en tejidos no-expuestos. El menor estado oxidativo registrado en los tejidos expuestos de frutos de Granny Smith tratados con ABA fue acompañado de una capacidad antioxidante similar a la observada en los tejidos no expuestos al sol. El contenido de polifenoles totales no fue afectado por el tratamiento con ABA en ninguna de las dos variedades (Tabla 4.1).

Tabla 4.2: Efecto de la aplicación de ABA en la integridad de membranas celulares, el contenido relativo de agua (CRA) y estado del fotosistema FS II en tejidos de piel de frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith expuestos y no expuestos a elevada radiación solar y temperatura. Los parámetros fueron medidos en momento de cosecha.

Variedad	Tratamiento	Pérdida electrolitos (%)		CRA (%)		Fv/Fm	
		Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto
Red Delicious	Control	38,2 a	33,4 a	95,2 a	93,8 a	0,82 a	0,81 a
	ABA	38,5 a	36,8 a	93,1 a	93,8 a	0,80 a	0,80 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,6290</i>	<i>0,3200</i>	<i>0,3420</i>	<i>0,4620</i>	<i>0,2441</i>	<i>0,4994</i>
Granny Smith	Control	44,9 a	49,8 a	93,1 a	92,8 a	0,79 a	0,83 a
	ABA	42,1 a	48,4 a	95,0 a	93,1 a	0,79 a	0,84 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,4830</i>	<i>0,4300</i>	<i>0,4930</i>	<i>0,1940</i>	<i>0,7906</i>	<i>0,5377</i>

Los valores son la media ($n=15$). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

Otros parámetros medidos para caracterizar el efecto del tratamiento con ABA fueron la pérdida de electrolitos, CRA y la integridad del fotosistema II, evaluada mediante la relación Fv/Fm (Tabla 4.2). La disminución en la peroxidación de lípidos de membrana observada en los frutos tratados con ABA en la variedad Granny Smith no fue acompañada por cambios en la integridad de membrana. En general la aplicación de ABA no afectó a la pérdida de electrolitos de las membranas celulares, y los porcentajes de pérdida variaron entre 38,5 a 33,4 en Red Delicious y entre 49,8 a 42,1 en Granny Smith (Tabla 4.2). La hidratación de los tejidos no fue afectada por

el tratamiento, siendo el contenido relativo de agua en promedio de 94%. La aplicación de ABA no afectó la integridad del fotosistema II, tanto en tejidos expuestos como no expuestos en ninguna de las dos variedades (Tabla 4.2).

Tabla 4.3: Efecto de la aplicación de ABA en pigmentos de piel de frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith expuestos y no expuestos a elevada radiación solar y temperatura.

Variedad	Tratamiento	Clorofilas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)		Carotenos ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)		Antocianinas (mg Cy3-glu g^{-1} PF)	
		Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto	Expuesto	No expuesto
Red Delicious	Control	32,0 a	30,1 a	8,3 a	5,7 a	15,7 a	15,3 a
	ABA	24,2 b	24,1 b	6,0 b	4,6 b	28,8 b	16,7 a
	<i>P (Trat.)</i>	0,0486	0,0062	0,0338	0,017	0,0413	0,1599
Granny Smith	Control	77,3 a	74,4 a	15,1 a	11,9 a	nd	nd
	ABA	74,4 a	70,2 a	14,8 a	11,8 a	nd	nd
	<i>P (Trat.)</i>	0,6747	0,5605	0,8031	0,8669		

Los valores son la media ($n=5$). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$); n.d.=no detectado; Cy3-glu= Cianidina 3-glucósido.

En la Tabla 4.3 se muestra el contenido de pigmentos en respuesta al tratamiento. El contenido de clorofila fue menor en los frutos tratados con ABA. Este efecto fue significativo en la variedad Red Delicious y estuvo acompañado por disminución de carotenoides. En los tejidos expuestos al sol, el tratamiento con ABA produjo mayor contenido de antocianinas, siendo 28,8 mg (Cy3-glu) g^{-1} PF, mientras que, en los controles se registró 15,7 mg (Cy3-glu) g^{-1} PF. Este último valor fue próximo al contenido de antocianinas de los tejidos no-expuestos independientemente del tratamiento.

4.2.2. Calidad de frutos

El tratamiento con ABA no afectó el tamaño de frutos en la variedad Red Delicious, mientras que en Granny Smith lo disminuyó un 8% (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Efecto de la aplicación de ABA en parámetros morfológicos y visuales de calidad a cosecha de frutos de manzana cultivar Red Delicious y Granny Smith.

Variedad	Tratamiento	Peso fruto (g)	Diámetro (mm)	Colorimetría		
				L*	h°	C*
Red Delicious	Control	164,2 a	70,0 a	36,0 a	28,8 a	30,0 a
	ABA	170,8 a	70,9 a	39,5 b	30,7 a	32,9 b
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,0803</i>	<i>0,0801</i>	<i>0,0182</i>	<i>0,6885</i>	<i>0,0462</i>
Granny Smith	Control	182,5 a	74,9 a	56,6 a	121,8 a	30,6 a
	ABA	166,6 b	72,8 b	55,9 a	120,2 a	31,5 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i><0,0001</i>	<i><0,0001</i>	<i>0,0696</i>	<i>0,3705</i>	<i>0,1547</i>

Los valores indican la media ($n=200$ para peso y diámetro; $n=20$ para color) Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$); L*=Luminosidad; C*= saturación; h°= ángulo Hue (color).

Respecto al color, en Red Delicious el ABA no promovió cambios en el color (ángulo h°), pero incrementó significativamente la luminosidad (L*) y definición (C*) (Tabla 4.4), lo cual coincide con el aumento de la concentración de antocianinas registrado en estos frutos (Tabla 4.3). En cambio, en frutos de la variedad Granny Smith no se observaron cambios en el color.

Bajo las condiciones de elevada radiación solar y temperatura registradas durante el período de desarrollo de los frutos, el tratamiento con ABA no fue efectivo en reducir la incidencia ni la severidad del daño de sol tanto en Red Delicious como en Granny Smith (Figura 4.3).

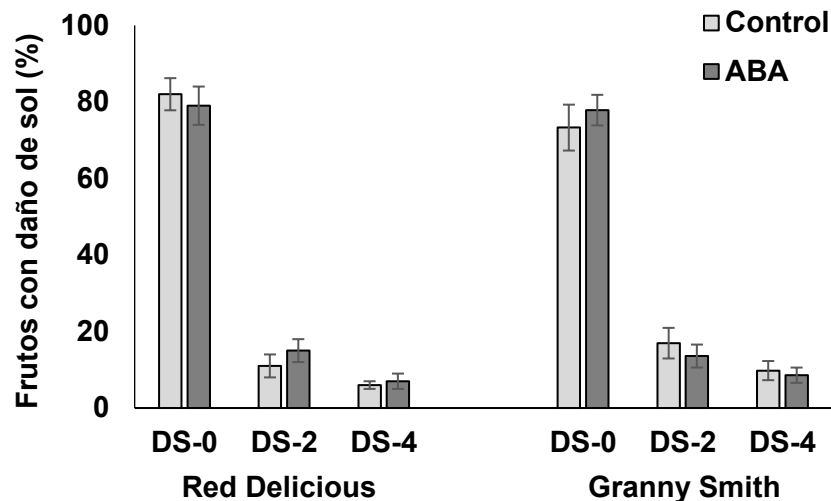


Figura 4.3: Efecto de la aplicación de ABA en la incidencia de daño de sol en frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith, en momento de cosecha. DS= daño de sol; 0 (sin daño), 2 (daño leve) y 4 (daño grave). Las barras indican la media ($n=350$) \pm D.E.

Los índices fisicoquímicos de calidad no fueron afectados por el tratamiento con ABA en ninguna de las variedades estudiadas (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Efecto de la aplicación de ABA en los índices fisicoquímicos de madurez de frutos de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith en momento de cosecha

Variedad	Tratamientos	Firmeza de pulpa (N)	Sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix)	Acido Málico (g l^{-1})	Índice de almidón (%)
Red Deliciosos	Control	68,3 a	10,9 a	2,7 a	25 a
	ABA	67,9 a	9,9 a	2,8 a	30 a
	<i>P (Trat.)</i>	0.6946	0.6224	0.2245	0.7747
Granny Smith	Control	63.4 a	10,2 a	8,5 a	11 a
	ABA	63.8 a	10,3 a	8,4 a	12 a
	<i>P (Trat.)</i>	0.7835	0.6779	0.3224	0.7850

Los valores son la media ($n=20$). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

4.2.3. Estado oxidativo y fisiológico de los tejidos de hojas

Las aplicaciones exógenas de ABA no afectaron la peroxidación de lípidos ni la capacidad antioxidante de hojas en ninguna de las dos variedades estudiadas. El contenido de polifenoles presentó tendencia a la disminución como consecuencia del tratamiento con ABA, fue significativo en la variedad Red Delicious (Tabla 4.6).

Tabla 4.6: Efecto de la aplicación de ABA en el metabolismo oxidativo de tejidos de hojas de árboles de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith.

Variedad	Tratamiento	TBARs (nmol g ⁻¹ PF)	DPPH (% Inhibición)	Fenoles totales (mg GAE g ⁻¹ PF)
Red Delicious	Control	64,6 a	38,1 a	24,9 a
	ABA	57,8 a	34,8 a	18,66 b
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,1867</i>	<i>0,3394</i>	<i>0,0044</i>
Granny Smith	Control	52,4 a	50,2 a	27,5 a
	ABA	41,9 a	42,9 a	23,6 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,1956</i>	<i>0,2176</i>	<i>0,6560</i>

Peroxidación de lípidos de membranas celulares fue medido por especies reactivas al ácido tiobarbiturico, TBARs y capacidad antioxidante determinada usando diphenylpicryl-hydrazyl, DPPH. Los valores son la media (n=5). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

Tanto la integridad del fotosistema FS II, así como el contenido de pigmentos fotosintéticos no fue afectado por el tratamiento con ABA (Tabla 4.7). Estos parámetros se presentaron dentro de los valores normales para manzana.

Tabla 4.7: Efecto de la aplicación de ABA en la integridad del fotosistema FS II y pigmentos fotosintéticos de hojas de manzanas variedades Red Delicious y Granny Smith.

Variedad	Tratamiento	Fv/Fm	SPAD	Clorofilas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	Carotenos ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)
Red Delicious	Control	0,82 a	40 a	480 a	91 a
	ABA	0,83 a	41 a	530 a	98 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,0558</i>	<i>0,7457</i>	<i>0,1021</i>	<i>0,1717</i>
Granny Smith	Control	0,82 a	45 a	440 a	84 a
	ABA	0,82 a	42 a	450 a	87 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,8832</i>	<i>0,3305</i>	<i>0,6437</i>	<i>0,5122</i>

Los valores son la media (n=15 para Fv/Fm y SPAD; n=5 para clorofilas y carotenos). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

El ABA disminuyó la fotosíntesis neta en ambas variedades. Luego de tres días de la aplicación se registró un descenso de actividad fotosintética igual a 45% en la variedad Red Delicious y 48% en Granny Smith. El efecto se prolongó por al menos una semana. Transcurridos diez días de la aplicación de ABA, aumentó la tasa fotosintética en las hojas tratadas, pero todavía fue significativamente menor a la detectada en las hojas control (Figura 4.4).

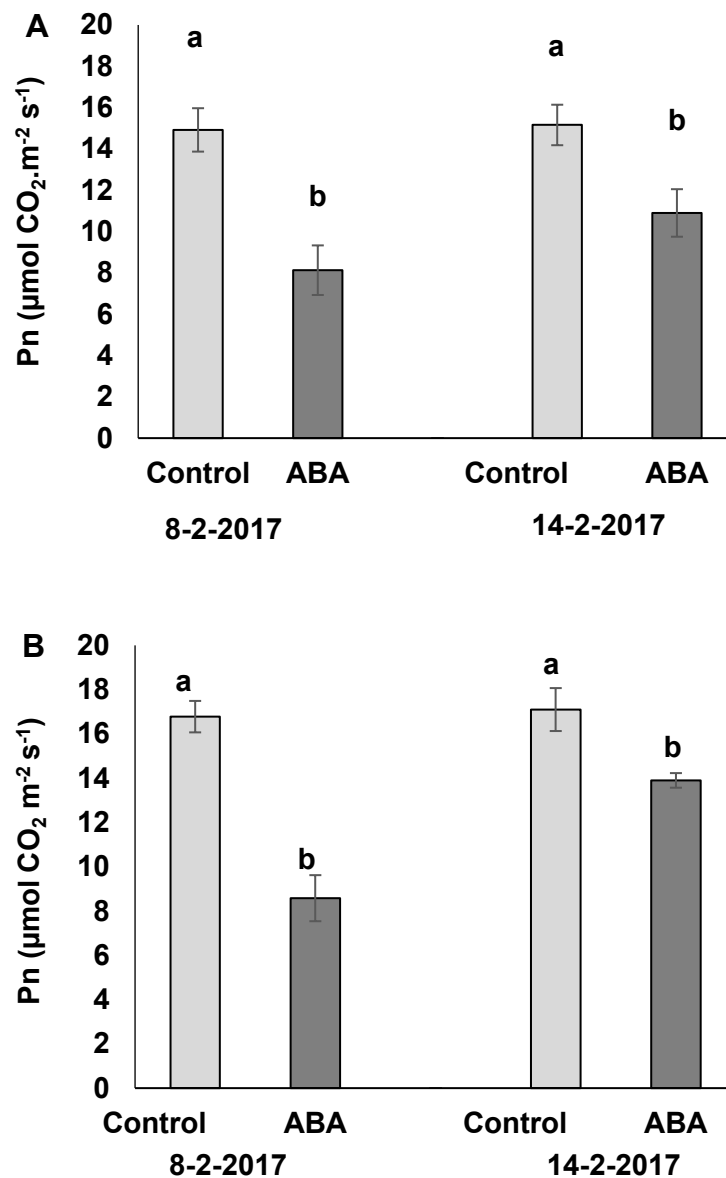


Figura 4.4: Efecto de la aplicación de ABA en la fotosíntesis neta (Pn) de hojas de manzana variedad Red Delicious (A) y Granny Smith (B), a los tres (8-2-2017) y diez (14-2-2017) días de realizado el tratamiento. Las barras indican la media ($n=10$) \pm D.E. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

El tratamiento con ABA no afectó el contenido relativo de agua de los tejidos foliares, ni la densidad de estomas. Aunque el número de estomas no experimentó cambios por el tratamiento, la apertura de los mismos si fue afectada por la aplicación de ABA. Esta situación se vio con mayor efecto en Granny Smith que descendió $105,2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mientras que en Red Delicious la disminución fue de $73,3 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Efecto de la aplicación de ABA en parámetros de estado hídrico e integridad celular de hojas de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith.

Variedad	Tratamiento	CRA (%)	g_s (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	Estomas (estomas mm ⁻²)
Red Delicious	Control	63,75 a	165,8 a	368,7 a
	ABA	61,96 a	92,5 b	364,3 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,7329</i>	<i>0,001</i>	<i>0,7812</i>
Granny Smith	Control	59,59 a	168,8 a	605,7 a
	ABA	54,75 a	63,6 b	585,5 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,3034</i>	<i>0,0003</i>	<i>0,4860</i>

Los valores son la media ($n=15$ para CRA y $n=10$ para g_s y estomas). Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$)

El crecimiento de los brotes del año, según la medición del largo de la primera filotaxis, no fue afectado por el tratamiento. No obstante, la disminución de la conductancia estomática y la fotosíntesis causaron una reducción del área foliar relativa a una unidad de longitud de brote. La disminución fue significativa en ambas variedades siendo de 2,7 cm² cm⁻¹ en Red Delicious y de 4,2 cm² cm⁻¹ en Granny Smith. Otro parámetro vegetativo que fue afectado por el tratamiento fue la masa foliar específica a una unidad de superficie. En Red Delicious la reducción fue de 0,5 mg cm⁻² y en Granny Smith fue 1,1 mg cm⁻², siendo esta última, estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Efecto de la aplicación de ABA en la expresión vegetativa de árboles de manzana variedad Red Delicious y Granny Smith.

Variedad	Tratamiento	Largo filotaxis apical (cm)	AF/largo brote (cm ² cm ⁻¹)	Masa foliar específica (mg cm ⁻²)
Red Delicious	Control	5,7 a	16,5 a	9,0 a
	ABA	5,6 a	13,8 b	8,5 a
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,876</i>	<i>0,0372</i>	<i>0,0564</i>
Granny Smith	Control	4,4 a	25,3 a	9,8 a
	ABA	5,1 a	21,1 b	8,7 b
	<i>P (Trat.)</i>	<i>0,1739</i>	<i>0,0498</i>	<i>0,0193</i>

Los valores indican la media. Letras distintas para los valores de una misma columna, dentro de una misma variedad, indican diferencias significativas (DGC; $P \leq 0,05$).

4.3. DISCUSIÓN

Las aplicaciones exógenas de ABA han demostrado que inducen la síntesis de compuestos antioxidantes en frutos. Se han reportado efectos positivos en trabajos realizados en uvas (Cantín y col., 2007; Quiroga y col., 2009; Sandhu y col., 2011; Ruiz-García y col., 2013), mientras que existen controversias en los resultados obtenidos en manzanas. Estudios realizados con el fin de disminuir el impacto de estrés por elevada radiación solar y atenuar la incidencia de frutos con daño por sol informan resultados dispares. Iamsub y col. (2009) observaron que la aplicación exógena de ABA disminuyó el daño por sol en las variedades de manzanas Tsugaru, Yataka y Fuji, mientras que investigaciones realizadas en Granny Smith no obtuvieron resultados positivos (Mupambi y col., 2018).

En los tejidos de piel de frutos desarrollados bajo las condiciones de elevadas temperaturas y radiación solar del Alto Valle de Río Negro y Neuquén las aplicaciones de ABA indujeron diferente respuesta antioxidante según la variedad estudiada. El tratamiento con ABA exógeno no cambió el estado oxidativo de las membranas celulares en Red Delicious, mientras que en la variedad Granny Smith atenuó el estrés oxidativo medido por la peroxidación de los lípidos. La respuesta diferente podría estar asociada a que la variedad Granny Smith además de tener menor capacidad antioxidante se caracteriza por tener un 60% más de ABA que Red Delicious, datos presentados en el capítulo 3 y que coinciden con registros informados por Kondo y col. (1991) y Lara y Vendrell (2000). Por otra parte Jiang y Zhang (2001) reportaron que en hojas de maíz, la respuesta antioxidante inducida por ABA exógeno depende de las concentraciones aplicadas. Aplicaciones de ABA en el rango de concentraciones 10 a 100 μM estimulan la respuesta de defensa antioxidante, mientras que concentraciones mayores a 1000 μM pueden provocar aumento de EROS. Las dos variedades fueron tratadas con igual concentración de ABA exógeno (1500 μM) por lo tanto, la proporción de ABA respecto de la concentración endógena fue menor en Granny Smith que en Red Delicious. Posiblemente en Granny Smith la concentración de ABA aplicada haya sido de magnitud adecuada para inducir respuesta antioxidante manifestándose con mayor intensidad en los tejidos expuestos a la radiación solar. En los mismos la disminución de peróxidos lipídicos no fue

acompañada de modificación en la concentración de fenoles totales, coincidiendo con otros trabajos realizados en la misma variedad de manzana (Mupambi y col., 2018).

El tratamiento con ABA exógeno generó cambios en la concentración de pigmentos, mientras que los parámetros fisiológicos de los tejidos de la piel de los frutos (integridad de membranas, estado hídrico y eficiencia del fotosistema II) no fueron afectados. El color de los frutos está asociado a diferencias en la concentración de pigmentos fotosintéticos y en la capacidad de sintetizar antocianinas (Merzlyak y col., 2008). Granny Smith, de piel verde, presentó más del doble de pigmentos fotosintéticos que Red Delicious, de superficie roja. El tratamiento con ABA no afectó la concentración de clorofilas y carotenos en la variedad de piel verde. No obstante, en Red Delicious se detectó una reducción significativa de pigmentos fotosintéticos, difiriendo con los resultados obtenidos por Iamsub y col., 2009. Esta diferencia puede deberse a que estos investigadores trabajaron en las variedades Tsugaru y Sensyu (variedades rojas), indicando que el efecto del tratamiento con ABA sobre los pigmentos fotosintéticos del fruto depende de la variedad estudiada (Merzlyak y col., 2002).

Por otra parte, está demostrado que el ABA induce la actividad de la enzima Fenilalanina Amonio-liasas (PAL), clave para la síntesis de antocianinas (Jiang y Joyce, 2003; Ibrahim y Jaafar, 2013). Esto coincide con informes que indican que el ABA exógeno aumenta la concentración de antocianinas en los frutos (Peppi y col., 2006; Quiroga y col., 2009; Berli y col., 2010; Sandhu y col., 2011; Setha, 2012; Alonso y col., 2016). Estudios recientes realizados por An y col., 2018 revelan que el factor de transcripción MdMYB1 de manzana activa la biosíntesis de antocianinas en respuesta a ABA. Nuestros resultados concuerdan con Iamsub y col., 2009 y con An y col., 2018, en que el ABA incrementa la síntesis de antocianinas, en la superficie expuesta al sol en frutos de manzanas rojas.

La acumulación de antocianinas, regulada por el complejo proteico MYB hélice-loop-hélice (bHLH)/WD40, es considerada como la principal responsable del atractivo color rojo de los frutos de manzana (Peng y Moriguchi, 2013). En la variedad Red Delicious el aumento de antocianinas fue acompañado por un incremento en la definición y luminosidad del color, sin afectar los índices físicoquímicos de madurez ni el tamaño, lo que representa una mejora en la calidad de los frutos. No obstante, no se registró atenuación de daño de sol, aunque las antocianinas actúan como un filtro

de luz interno que llena el vacío de absorción de clorofila en la región verde-naranja del espectro visible, y por lo tanto protegen al fruto del estrés inducido por la luz (Merzlyak y Chivkunova, 2000). A diferencia de Iamsub y col. (2008) en el presente estudio no se detectó atenuación de daño por sol en la variedad de frutos rojos lo que coincide con reportes de Mupambi y col. (2014) que expresan que las aplicaciones de ABA exógeno no mejoran esta afección en la variedad Granny Smith.

Estudios realizados en uvas indican que las aplicaciones de ABA estimulan la traslocación de fotoasimilados incrementando el tamaño de las bayas (Quiroga y col., 2009; Murcia y col., 2016), pero en manzanas pareciera no suceder lo mismo. El ABA exógeno no afectó el tamaño de frutos en Red Delicious, pero en la variedad Granny Smith se registró significativa disminución de peso y diámetro, coincidiendo con determinaciones realizadas por Mupambi y col. (2014). Estos resultados están relacionados con que en hoja el ABA exógeno no alteró parámetros oxidativos, pero disminuyó la actividad fotosintética. Esta reducción en la producción de fotoasimilados afectó negativamente el peso de frutos, así como el área y masa foliar, incidiendo con mayor intensidad en la variedad Granny Smith. La disminución de la fotosíntesis estuvo relacionada con menor provisión de CO₂ debido a que la conductancia estomática se redujo a más de la mitad en las plantas tratadas. El tratamiento con ABA no modificó el número de estomas, lo cual sugiere que la conductancia estomática disminuyó debido al cierre de los mismos. Está bien documentado que el ABA está involucrado en la activación del cierre de estomas, fundamentalmente en respuesta a estrés por déficit hídrico (Lee y Luan, 2012; Alonso y col., 2016; Rattanakon y col., 2016). Los resultados obtenidos coinciden con estudios realizados en hojas de trigo y yerba mate (Travaglia y col., 2010; Sansberro y Mroginski, 2004) y en manzana (Mupambi y col., 2018), en que el ABA exógeno induce cierre estomático y produce disminución de la fotosíntesis neta. Este efecto se atenuó transcurrida una semana de la aplicación, y según reportes de otros investigadores desaparece transcurridos aproximadamente 20 días (Murcia y col., 2016; Mupambi y col., 2018)

CONCLUSIÓN

En frutos de manzana las aplicaciones exógenas de ABA tendieron a atenuar el daño oxidativo en los tejidos expuestos a alta radiación solar. Esta atenuación no se relacionó con aumento de compuestos fenólicos, pero en la variedad Red Delicious

incrementó la síntesis de antocianinas que aumentó la calidad de los frutos mejoró la coloración, sin generar cambios en los otros índices de madurez. No obstante, el ABA exógeno disminuyó la calidad de frutos de la variedad Granny Smith debido a la reducción del tamaño. La conclusión más destacada de este estudio es que la atenuación del daño oxidativo y el incremento de síntesis de antocianinas (en Red Delicious) fueron insuficientes para disminuir el daño de sol en frutos ocasionado por las condiciones de elevada radiación solar del ambiente de la Norpatagonia. En las plantas que recibieron tratamiento con ABA se determinó que el proceso de fotosíntesis fue afectado negativamente debido a menor apertura de estomas. Esta situación influyó en la expresión vegetativa de las plantas manifestado principalmente por una disminución en el área foliar específica.

Las aplicaciones exógenas de ABA no incrementaron la capacidad de respuesta antioxidante en tejido de frutos y hojas de manzana expuestos a elevada radiación solar y temperatura y además modificaron negativamente la fotosíntesis disminuyendo parámetros vegetativos asociados.

CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En la presente tesis se propuso ‘Estudiar la respuesta antioxidante, el desarrollo de pigmentos y cambios hormonales, que presentan los frutos de variedades de manzana con diferente susceptibilidad al daño por sol, cultivadas bajo estrés por alta radiación solar’. La fisiopatía daño por sol impacta negativamente en la producción y economía de zonas productoras de manzanas. En especial en las regiones situadas en climas áridos y semi-áridos y debido al incremento del calentamiento climático global. El trabajo realizado aportó nuevos conocimientos fisiológicos y bioquímicos sobre la interacción metabólica-ambiental y como esto resultó determinante en la fisiopatía daño por sol. Por otra parte, avanzó sobre la investigación en el uso de hormonas vegetales para innovar en estrategias de mitigación de daño por sol en frutos.

Cabe destacar que se utilizaron sistemas experimentales que permitieron evaluar los factores ambientales estresantes a campo, y que los frutos se mantuvieron unidos a la planta hasta el momento de ser recolectados para los análisis de laboratorio. Los estudios se hicieron en los tejidos con daño por sol desarrollado ‘*in situ*’, de modo de obtener información en condiciones ambientales semejantes a las que experimenta el fruto en situaciones reales. Este avance metodológico permitiría utilizar los resultados de la tesis para futuras aplicaciones prácticas.

El fotosistema II fue el sistema que se degradó más rápidamente durante la exposición a un evento de elevada radiación solar combinado con altas temperaturas. La peroxidación de lípidos se incrementó progresivamente, y si bien aumentó la respuesta antioxidante, la misma no fue suficiente para contrarrestar la tensión ambiental recibida, por lo cual se desarrollaron síntomas de daño por sol en el fruto.

La respuesta antioxidante y hormonal varió según la manera en que se generaron las condiciones de estrés. Frente a una exposición a elevada radiación solar y temperatura impuestas abruptamente se produjo una rápida activación SOD, desactivación de CAT y desfasajes en las enzimas del ciclo del ascorbato-glutation. En cambio, la exposición paulatina y gradual a las condiciones de estrés durante el desarrollo de los frutos provocó una respuesta adaptativa y en general aumentaron los compuestos antioxidantes no enzimáticos, la actividad de la mayoría de las enzimas antioxidantes, la concentración de poliaminas, los niveles de ABA y la emisión de etileno. Estas respuestas presentaron variaciones particulares para cada

variedad. Cabe señalar que este es el primer trabajo de investigación realizado en manzanas sometidas a estrés por elevada y temperatura en el cual se analiza el contenido y posible rol de las poliaminas.

Se determinó experimentalmente que el sistema antioxidante, la concentración de poliaminas y ABA y la emisión de etileno presentó diferencias en función al nivel de síntoma de daño por sol y entre las distintas variedades de manzanas.

En este trabajo se analizaron seis variedades de manzanas, bajo las mismas metodologías, lo que permitió revelar características propias de respuesta en el desarrollo de daño por sol para cada una de ellas. Se determinó que las variedades de manzanas rojas presentaron mayor capacidad de adaptación a la alta intensidad solar y temperatura que las variedades Granny Smith y Golden Delicious. Esta característica se asoció a una mayor capacidad de sintetizar sustancias antioxidantes como polifenoles y antocianinas, sumado a mayor actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GR y a la posibilidad de incrementar la concentración de hormonas involucradas en mecanismos para reducir el estrés.

Se avanzó en las bases para innovar sobre prácticas de mitigación de daño por sol mediante la aplicación de ABA en pre-cosecha. Si bien las aplicaciones con ABA no disminuyeron significativamente la incidencia de daño por sol, los tratamientos provocaron una atenuación de los procesos oxidativos de membranas y un incremento de la síntesis de antocianinas en variedades de piel roja.

En resumen, esta tesis aporta al conocimiento científico de los mecanismos subyacentes en la respuesta de los tejidos de manzanas al estrés por elevada radiación y temperatura. Por otra parte, proporciona información básica para desarrollar nuevas herramientas y estrategias agronómicas para mitigar el daño por sol.

ASPECTOS DE INTERÉS PARA FUTURAS LÍNEAS DE ESTUDIO

Algunos aspectos que podrían resultar de interés a la hora de realizar futuros estudios que contribuirían a complementar la información generada se expresan a continuación.

En la presente tesis se logró agrupar las diferentes variedades de manzanas que presentan a nivel bioquímico respuestas similares a alta radiación y temperatura. Resultaría importante profundizar los estudios a nivel molecular para tener un conocimiento más profundo de los mecanismos que confieren resistencia. Lo que permitiría seleccionar y desarrollar nuevas variedades de manzanas que sean adaptadas a regiones con climas favorables para generar daño por sol.

Debido a que se comprobó que el estrés por elevada radiación y temperatura induce el incremento en poliaminas en los tejidos de manzanas sería importante profundizar en las vías de regulación de síntesis de estas sustancias. De esta manera se podría investigar la posible aplicación de sustancia que estimulen el aumento de poliaminas endógenas, así como, experimentar con técnicas de aplicación exógena.

En los trabajos presentados se demostró que el ABA incrementa el contenido de antocianinas en manzanas de variedades rojas. Las antocianinas además de actuar como antioxidantes, son filtro natural de las radiaciones solares. Por lo tanto, sería importante continuar con investigaciones al respecto tanto a nivel metabólico como agronómico.

Los resultados obtenidos han demostrado que la respuesta al estrés por elevada radiación y temperatura difieren si la exposición es repentina o paulatina a lo largo del crecimiento del fruto. Sería importante desarrollar conocimiento sobre los umbrales y límites de exposición y temperatura necesarios para lograr una respuesta de aclimatación inducida. Desde el punto de vista práctico esto sería fundamental dado que en la actualidad se están adoptando sistemas de mallas media-sombra que atenúan las radiaciones solares con capacidad de ser desplegados y retraídos rápidamente.

Dado que la interacción genómico-medio ambiente es determinante en la composición de los tejidos vegetales, sería beneficioso realizar estudios que determinen exhaustivamente el aumento de calidad nutricional de los frutos con síntomas leves de daño por sol. Estos frutos, que sólo presentan un leve cambio en la coloración de la piel, según nuestros estudios tienen mayor cantidad de antioxidantes. Esto permitiría mejorar el precio de mercado de frutos que en la actualidad se venden en categorías de calidad inferior o directamente son descartados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abassi, N.A., Kushad, M.M., Endress, A.G., 1998. Active oxygen-scavenging enzymes activities in developing apple flowers and fruits. *Sci. Hortic.* 74, 183-194. doi:10.1016/S0304-4238(98)00077-6
- Almeselmani, M., Deshmukh, P.S., Sairam, R.K., Kushwaha, S.R., Singh, T.P., 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Sci.* 171, 382–388. doi:10.1016/j.plantsci.2006.04.009
- Alonso, R., Berli, F.J., Bottini, R., Piccoli, P., 2015. Acclimation mechanisms elicited by sprayed abscisic acid, solar UV-B and water deficit in leaf tissues of field-grown grapevines. *Plant Physiol. Biochem.* 91, 56–60. doi:10.1016/j.plaphy.2015.03.011
- Alonso, R., Berli, F.J., Piccoli, P., Bottini, R., 2016. Ultraviolet-B radiation, water deficit and abscisic acid: a review of independent and interactive effects on grapevines. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 28, 11–22. doi:10.1007/s40626-016-0053-y
- Alvarez, H.L., Di Bella, C.M., Colavita, G.M., Oricchio, P., Strachnoy, J., 2015. Comparative effects of kaolin and calcium carbonate on apple fruit surface temperature and leaf net CO₂ assimilation. *J. Appl. Hortic.* 17, 176–180.
- An, J.P., Yao, J.F., Xu, R.R., You, C.X., Wang, X.F., Hao, Y.J., 2018. Apple bZIP transcription factor MdbZIP44 regulates abscisic acid-promoted anthocyanin accumulation. *Plant Cell Environ.* 41, 2678–2692. doi:10.1111/pce.13393
- Anuario Estadístico SENASA, 2019, General Roca, Río Negro, Argentina. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anuario_estadistico_2019_crpn_senasa.pdf
- Apel, K., Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

- Artola, J.M., 2019. Clusterización y cadena de valor para la exportación de manzanas del Alto Valle de Rio Negro. Universidad Nacional de La Plata. doi.org/10.35537/10915/114271
- Asada K., 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 355, 1419-1431. doi: 10.1098/rstb.2000.0703.
- Aschan, G., Pfanz, H., 2003. Non-foliar photosynthesis - A strategy of additional carbon acquisition. Flora 198, 81–97. doi:10.1078/0367-2530-00080
- Asensi-Fabado, M.A., Cela, J., Müller, M., Arrom, L., Chang, C., Munné-Bosch, S., 2012. Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (ein3-1) mutant of *Arabidopsis thaliana* exposed to salt stress. J. Plant Physiol. 169, 360–368. doi:10.1016/j.jplph.2011.11.007
- Atkinson, N.J., Urwin, P.E., 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. J. Exp. Bot. 63, 3523–3544. doi:10.1093/jxb/ers100
- Azcón-Bieto, J., Talón, M., 2008. Fundamentos de fisiología vegetal, 2da ed, McGrawHill. Mc Graw Hill Education. Interamericana, Madrid, España.
- Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A., Robledo, C.W., 2008. InfoStata Manual del Usuario. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Barasu, P.D., Steyn, W.J., Schmeisser, M., Midgley, S.J.E., 2020. Sensitivity of apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit peel to high irradiance and temperature as influenced by a range of rootstocks in South Africa. Acta Hort. 1281, 297–306. doi:10.17660/ActaHortic.2020.1281.41
- Barber, H.N., Sharpe, P.J.H., 1971. Genetics and physiology of sunscald of fruits. Agric. Meteorol. 8, 175–191.
- Bartoli, C.G., Casalongue, C.A., Simontacchi, M., Marquez-Garcia, B., Foyer, C.H., 2013. Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. Environ. Exp. Bot. 94, 73–88. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.05.003

- Benegas, R., Rodriguez, A., 2007. Factores que afectan el porcentaje de fruta asoleada en manzanos cv. Fuji en el alto valle de Río Negro y Neuquén. *Ria* 36, 131–146. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86436108>
- Benezer-benezer, M., Castro Mercado, E., García Pineda, E., 2008. Production of reactive oxygen species during the resistance expression of plants to diseases. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26, 56–61.
- Benítez, C.E., 2001. Cosecha y Poscosecha de Peras y Manzanas en los valles irrigados de la Patagonia, 1st ed. INTA, General Roca, Río Negro, Argentina.
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari D Bertelli, M., 2004. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J. Food Sci.* 69, 164–169. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x
- Berli, F.J., Moreno, D., Piccoli, P., Hespagnol-Viana, L., Silva, M.F., Bressan-Smith, R., Cavagnaro, J.B., Bottini, R., 2010. Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet- absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell Environ.* 33, 1–10. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02044.x
- Bi, X., Zhang, J., Chen, C., Zhang, D., Li, P., Ma, F., 2014. Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. *Food Chem.* 152, 205–209. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.088
- Bitrián, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio, A.F., Alcázar, R., 2012. Polyamines under abiotic stress: Metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. *Metabolites* 2, 516–528. doi:10.3390/metabo2030516
- Blackhall, V., Orioli, G.A., Colavita, G.M., 2020. Special issue in honour of Prof. Reto J. Strasser JIP-test parameters to study apple peel photosystem II behavior under high solar radiation stress during fruit development. *Photosynthetica* 58, 129–137. doi:10.32615/ps.2019.159
- Blanke, M., Lenz, F., 1989. Fruit photosynthesis. *Plant. Cell Environ.* doi:10.1111/j.1365-3040.1989.tb01914.x

- Boneh, U., Biton, I., Zheng, C., Schwartz, A., Ben-Ari, G., 2012. Characterization of potential ABA receptors in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep.* 31, 311–321. doi:10.1007/s00299-011-1166-z
- Bowler, C., Van Montagu, M., Dirk, I., 1992. Superoxide dismutase and abiotic stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Brestic, M., Zivcak, M., 2013. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in plants: protocols and applications., in: Rout, G.R., Das, A.B. (Eds.), *Molecular Stress Physiology of Plants*. Springer India, Dordrecht, pp. 87–131. doi:10.1007/978-81-322-0807-5
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd ed. John Wiley & Sons.
- Calvo, G., Candan, A.P., 2012. INTA, Centro Regional Patagonia Norte Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Allen, Río Negro, Argentina. <https://inta.gob.ar/documentos/indices-de-cosecha-en-manzana>
- Calvo, G., Colodner, A., Candan, A., 2012. Cosecha y poscosecha de frutos de pepita, Poscosecha. INTA, Centro Regional Patagonia Norte Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Allen, Río Negro, Argentina. <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39093.pdf>
- Calvo, G., Sozzi, G.O., 2009. Effectiveness of 1-MCP treatments on 'Bartlett' pears as influenced by the cooling method and the bin material. *Postharvest Biol. Technol.* doi:10.1016/j.postharvbio.2008.06.011
- Calzadilla, P.I., Gazquez, A., Maiale, S.J., Ruiz, O.A., Bernardina, M.A., 2014. Polyamines as indicators and modulators in the abiotic stress in plants, in: Anjum, N.A., Gill, S.S., Gill, R. (Eds.), *Plant Adaptation to Environmental Change*. CAB International, Chascomús, Buenos Aires, Argentina, pp. 109–128. doi:10.1079/9781780642734.0109

- Cámara Argentina de Fruticultores Integrados, 2020. Producción argentina de peras y manzanas. Cipolletti. Río Negro, Argentina. <http://www.cafi.org.ar/nuestra-produccion/>
- Campestre, M.P., Bordenave, C.D., Origone, A.C., Menéndez, A.B., Ruiz, O.A., Rodríguez, A.A., Maiale, S.J., 2011. Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. *J. Plant Physiol.* 168, 1234–1240. doi:10.1016/j.jplph.2011.01.007
- Cantín, C.M., Fidelibus, M.W., Crisosto, C.H., 2007. Application of abscisic acid (ABA) at veraison advanced red color development and maintained postharvest quality of 'Crimson Seedless' grapes. *Postharvest Biol. Technol.* 46, 237–241. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.05.017
- Chaves-Barrantes, N.F., Gutiérrez-Soto, M.V., 2016. Respuestas al estrés por calor en los cultivos. I. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos. *Agron. Mesoam.* 28, 237. doi:10.15517/am.v28i1.21903
- Chen, C., Li, H., Zhang, D., Li, P., Ma, F., 2013. The role of anthocyanin in photoprotection and its relationship with the xanthophyll cycle and the antioxidant system in apple peel depends on the light conditions. *Physiol. Plant.* 149, 354–366. doi:10.1111/ppl.12043
- Chen, C., Zhang, D., Li, P., Ma, F., 2012. Partitioning of absorbed light energy differed between the sun-exposed side and the shaded side of apple fruits under high light conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 60, 12–17. doi:10.1016/j.plaphy.2012.07.016
- Chen, K., Li, G.J., Bressan, R.A., Song, C.P., Zhu, J.K., Zhao, Y., 2020. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *J. Integr. Plant Biol.* 62, 25–54. doi:10.1111/jipb.12899
- Chen, L.S., Cheng, L., 2009. Photosystem 2 is more tolerant to high temperature in apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves than in fruit peel. *Photosynthetica* 47, 112–120. doi:10.1007/s11099-009-0017-4

- Chen, L.S., Li, P., Cheng, L., 2008. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta* 228, 745–756. doi:10.1007/s00425-008-0776-3
- Chen, W., Zhang, M., Zhang, G., Li, P., Ma, F., 2019. Differential regulation of anthocyanin synthesis in apple peel under different sunlight intensities. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–13. doi:10.3390/ijms20236060
- Cheng, L., Ma, F., 2004. Diurnal operation of the xanthophyll cycle and the antioxidant system in apple peel. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129, 313–320. doi.org/10.21273/JASHS.129.3.0313
- Colamarino, I., 2010. Informe Sectorial N ° 6 de las Cadenas de Origen Agrícola y Forestal – Pomáceas.
- Colavita, G.M., 2008. Evaluación de la incidencia de asoleado en la producción de manzanas en la región del Alto Valle del río Negro. *Frutic. Divers. INTA* 58, 16–23.
- Colavita, G.M., Curetti, M., Raffo, D., Sosa, M.C., Vita, L.I., 2020. Apple, in: Debashis, M., Wermund, U., Phavaphutanon, L., Cronje, R. (Eds.), *Temperate Fruits Production, Processing, and Marketing*. Apple Academic Press Inc., p. 566. ISBN: 9781003045861
- Contreras, C., Zoffoli, J.P., Alcalde, J.A., Ayala, M., 2008. Evolución del daño por insolación de manzanas ‘Granny Smith’ durante el almacenaje refrigerado. *Cienc. e Investig. Agrar.* 35, 147–157. doi:10.4067/S0718-16202008000200004
- Cui, M., Lin, Y., Zu, Y., Efferth, T., Li, D., Tang, Z., 2015. Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis*. *J. Plant Biol.* 58, 193–201. doi:10.1007/s12374-014-0302-z
- Curry, E., Arey, B., 2010. Apple cuticle: the perfect interface, in: Michael T. Postek, Dale E. Newbury, S. Frank Platek, D.C.J. (Ed.), *Proceedings of SPIE*. Bellingham, WA, USA, pp. 7729 1P–1. doi:10.1117/12.853913

- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. doi:10.3390/molecules15107313
- Dansa, A.M., 2018. Perfil de mercados de manzana y pera. Buenos Aires, Argentina. https://magyp.gob.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil_manzanas_peras.pdf
- De la Fuente Fernández, S., 2011. Análisis Componentes Principales. Madrid, España. Fac. Ciencias Económicas y Empresariales UAM. Madrid, España. <http://www.fuenterrebollo.com/Economicas/ECONOMETRIA/MULTIVARIANT E/ACP/ACP.pdf>
- Demidchik, V., 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.* 109, 212–228. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.06.021
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 599–626.
- Di Rienzo, J., Guzmán, A., Casanoves, F., 2002. A multiple comparisons method base on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J. Agric. Biol. Environ. Stat* 7, 129–142. doi.org/10.1198/10857110260141193
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2016. InfoStat, versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V., Gomez-Cadenas, A., 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography – Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8437–8442. doi:10.1021/jf050884b
- Dussi, M.C., Giardina, G., Sosa, D., González Junyent, R., Zecca, A., Reeb, P.R., 2005. Shade nets effect on canopy light distribution and quality of fruit and spur

- leaf on apple cv. Fuji. Spanish J. Agric. Res. 3, 253. doi:10.5424/sjar/2005032-144
- Emmons, C.L., Peterson, D.M., Paul, G.L., 1999. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. J. Agric. Food Chem. 47, 4894–4898. doi:10.1021/jf990530i
- Fariduddin, Q., Varshney, P., Yusuf, M., Ahmad, A., 2013. Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. J. Plant Interact. 8, 1–16. doi:10.1080/17429145.2012.716455
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E., 2008(a). Photooxidative sunburn of apples: characterization of a third type of apple sunburn. Int. J. Fruit Sci. 8, 160–172. doi:10.1080/15538360802526472
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E., 2008(b). Changes in pigment concentrations associated with the degree of sunburn browning of ‘Fuji’ apple. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 133, 27–34. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.013
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E., 2009a. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. I. Chlorophylls and carotenoids. Plant Sci. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.013
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E., 2009b. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. II. Phenolics. Plant Sci. 176, 84–89. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.010
- Feng, F., Li, M., Ma, F., Cheng, L., 2013. Phenylpropanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure. Plant Physiol. Biochem. 69, 54–61. doi:10.1016/j.plaphy.2013.04.020
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2011. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. Plant Physiol. 155, 2–18. doi:10.1104/pp.110.167569

- Foyer, C.H., Shigeoka, S., 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 155, 93–100. doi:10.1104/pp.110.166181
- Fujita, M., Shinozaki, K., 2015. Polyamine Transport Systems in Plants, in: Kusano, T., Suzuki, H. (Eds.), *Polyamines*. Springer Japan, Japan, pp. 179–185. doi:10.1007/978-4-431-55212-3
- Galvez-Valdivieso, G., Fryer, M.J., Lawson, T., Slattery, K., Truman, W., Smirnoff, N., Asami, T., Davies, W.J., Jones, A.M., Baker, N.R., Mullineaux, P.M., 2009. The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. *Plant Cell* 21, 2143–62. doi:10.1105/tpc.108.061507
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gindaba, J., Wand, S.J.E., 2005. Comparative effects of evaporative cooling, kaolin particle film, and shade net on sunburn and fruit quality in apples. *HortScience* 40, 592–596. doi.org/10.21273/HORTSCI.40.3.592
- Giusti, M., Wrolstad, R., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 0–13. doi:10.1002/0471142913.faf0102s00
- Glenn, D.M., Yuri, J.A., 2013. Photosynthetically active radiation (PAR) × ultraviolet radiation (UV) interact to initiate solar injury in apple. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 162, 117–124. doi:10.1016/j.scienta.2013.07.037
- González Moreno, S., Perales Vela, H., Salcedo Alvarez, M., 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev. Educ. Bioquímica* 27, 119–129. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDREVISTA=278&IDARTICULO=37206&IDPUBLICACION=3953>

- Grace, S.C., Logan, B. a., 1996. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol.* 112, 1631–1640. doi:112/4/1631 [pii]
- Gupta, K., Dey, A., Gupta, B., 2013. Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol. Plant.* 35, 2015–2036. doi:10.1007/s11738-013-1239-4
- Handa, A.K., Mattoo, A.K., 2010. Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 540–546. doi:10.1016/j.plaphy.2010.02.009
- Handa, A.K., Tiznado-Hernández, M.E., Mattoo, A.K., 2012. Fruit development and ripening: A molecular perspective, in: *Plant Biotechnology and Agriculture*. Elsevier Inc., pp. 405–424. doi:10.1016/B978-0-12-381466-1.00026-2
- He, L., Ban, Y., Inoue, H., Matsuda, N., Liu, J., Moriguchi, T., 2008. Enhancement of spermidine content and antioxidant capacity in transgenic pear shoots overexpressing apple spermidine synthase in response to salinity and hyperosmosis. *Phytochemistry* 69, 2133–2141. doi:10.1016/j.phytochem.2008.05.015
- Hengari, S., Theron, K.I., Midgley, S.J.E., Steyn, W.J., 2014a. Response of apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit peel photosystems to heat stress coupled with moderate photosynthetic active radiation at different fruit developmental stages. *Sci. Hortic.* 178, 154–162. doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.019
- Hengari, S., Theron, K.I., Midgley, S.J.E., Steyn, W.J., 2014b. The effect of high UV-B dosage on apple fruit photosystems at different fruit maturity stages. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 170, 103–114. doi:10.1016/j.scienta.2014.02.037
- Henríquez, C., Almonacid, S., Chiffelle, I., Valenzuela, T., Araya, M., Cabezas, L., Simpson, R., Speisky, H., 2010. Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chil. J. Agric. Res.* 70, 523–536. doi:10.4067/s0718-58392010000400001

- Hernandez, O., Torres, C.A., Moya-León, M.A., Opazo, M.C., Razmilic, I., 2014. Roles of the ascorbate-glutathione cycle, pigments and phenolics in postharvest “sunscald” development on “granny smith” apples (*Malus domestica* Borkh.). Postharvest Biol. Technol. doi:10.1016/j.postharvbio.2013.08.003
- Hodges, D.M., 2003. Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops, Postharvest Oxidative stress in horticultural crops. Food Products Press, London, Oxford, UK. doi:10.1201/9781482277982
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207, 604–611. doi:10.1007/s004250050524
- Hodges, D.M., Forney, C.F., Wismer, W.V., 2001. Antioxidant responses in harvested leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 126, 611–617. doi.org/10.21273/JASHS.126.5.611
- Hong, J.H., Seah, S.W., Xu, J., 2013. The root of ABA action in environmental stress response. Plant Cell Rep. 32, 971–983. doi:10.1007/s00299-013-1439-9
- Iamsub, K., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H., Kamuro, Y., 2008. Improvement of fruit quality by S-ABA and the fertilizer formulated K, P, Mg, Bo, Mn containing S-ABA as pre-harvest application on peaches and apples. Acta Hortic. 804, 219–224. doi:10.17660/ActaHortic.2008.804.29
- Iamsub, K., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H., Kamuro, Y., 2009. Alleviating sunburn injury in apple fruit using natural and fertilizer forms of S-abscisic acid and its underlying mechanism. J. Food, Agric. Environ. 7, 446–452. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.319.7519&rep=rep1&type=pdf>
- Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z.E., 2013. Abscisic acid induced changes in production of primary and secondary metabolites, photosynthetic capacity, antioxidant capability, antioxidant enzymes and lipoxygenase inhibitory activity of

-
- Orthosiphon stamineus* Benth. *Molecules* 18, 7957–7976. doi:10.3390/molecules18077957
- Jackson, J.E., 2003. *The Biology of Apples and Pears*. Cambridge University Press, Cambridge. doi:10.1017/CBO9780511542657
- Jia, H.-F., Chai, Y.-M., Li, C.-L., Lu, D., Luo, J.-J., Qin, L., Shen, Y.-Y., 2011. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol.* 157, 188–199. doi:10.1104/pp.111.177311
- Jiang, M., Zhang, J., 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol.* 42, 1265–1273. doi:10.1093/pcp/pce162
- Jiang, Y., Huang, B., 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Sci.* 41, 436–442. doi:10.2135/cropsci2001.412436x
- Jiang, Y., Joyce, D.C., 2003. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regul.* 39, 171–174. doi:10.1023/A:1022539901044
- Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeyen, M., Mullineaux, P., 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* 214, 751–758. doi:10.1007/s004250100667
- Jordán, M., Casaretto, J., 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico, in: Squeo, F.A., Cardemil, L. (Eds.), *Fisiología Vegetal*. Universidad de La Serena, La Serena, Chile, pp. 1–28.
- Kalaji, H.M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L., Goltsev, V., Guidi, L., Jajoo, A., Li, P., Losciale, P., Mishra, V.K., Misra, A.N., Nebauer, S.G., Pancaldi, S., Penella, C., Pollastrini, M., Suresh, K., Tambussi, E., Yanniccari, M., Zivcak, M., Cetner, M.D., Samborska, I.A., Stirbet, A., Olsovska, K., Kunderlikova, K., Shelonzek, H., Rusinowski, S., Bąba, W., 2017.

- Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel, Photosynthesis Research. doi:10.1007/s11120-016-0318-y
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., Altabella, T., Galston, A.W., 2003. Polyamines in plants: An overview. *J. Cell Mol. Biol.* 2, 1–12.
- Kondo, S., Uthaibutra, J., Gemma, H., 1991. Comparison of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid, abscisic acid and anthocyanin content of some apple cultivars during fruit growth and maturation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60, 505–511. doi:10.2503/jjshs.60.505
- Kuznetsov, V. V, Shevyakova, N.I., 2007. Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress* 1, 50–71.
- Lal, N., Sahu, N., 2017. Management strategies of sunburn in fruit crops. A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 6, 1126–1138. doi:10.20546/ijcmas.2017.606.131
- Lara, I., Vendrell, M., 2000. Changes in abscisic acid levels, ethylene biosynthesis, and protein patterns during fruit maturation of ‘Granny Smith’ apples. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 125, 183–189. doi:10.21273/JASHS.125.2.183
- Larkindale, J., Knight, M.R., 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.* 128, 682–695. doi:10.1104/pp.010320
- Lee, S.C., Luan, S., 2012. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell Environ.* 35, 53–60. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02426.x
- Leng, P., Yuan, B., Guo, Y., Chen, P., 2014. The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 65, 4577–4588. doi:10.1093/jxb/eru204
- Lewis, D.R., Ramirez, M. V., Miller, N.D., Vallabhaneni, P., Keith Ray, W., Helm, R.F., Winkel, B.S.J., Muday, G.K., 2011. Auxin and ethylene induce flavonol

- accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant Physiol.* 156, 144–164. doi:10.1104/pp.111.172502
- Li, P., Castagnoli, S., Cheng, L., 2008. Red “Anjou” pear has a higher photoprotective capacity than green ‘Anjou’. *Physiol. Plant.* 134, 486–498. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01155.x
- Li, P., Ma, F., Cheng, L., 2013. Primary and secondary metabolism in the sun-exposed peel and the shaded peel of apple fruit. *Physiol. Plant.* 148, 9–24. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01692.x
- Li, S., Fu, Q., Chen, L., Huang, W., Yu, D., 2011. Arabidopsis thaliana WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta* 233, 1237–1252. doi:10.1007/s00425-011-1375-2
- Li, Y.-Y., Mao, K., Zhao, C., Zhao, X.-Y., Zhang, H.-L., Shu, H.-R., Hao, Y.-J., 2012. MdCOP1 Ubiquitin E3 Ligases interact with MdMYB1 to regulate light-induced anthocyanin biosynthesis and red fruit coloration in apple. *Plant Physiol.* 160, 1011–1022. doi:10.1104/pp.112.199703
- Li, Z., Zhao, X., Sandhu, A.K., Gu, L., 2010. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6503–6509. doi:10.1021/jf1006962
- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J.P., Bouzayen, M., 2015. Ethylene control of fruit ripening: Revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiol.* 169, 2380–2390. doi:10.1104/pp.15.01361
- Liu, X., Huang, B., 2000. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Sci.* 40, 503–510. doi:doi:10.2135/cropsci2000.402503x
- Liu, Y., Che, F., Wang, L., Meng, R., Zhang, X., Zhao, Z., 2013. Fruit coloration and anthocyanin biosynthesis after bag removal in non-red and red apples (*Malus × domestica* Borkh.). *Molecules* 18, 1549–1563. doi:10.3390/molecules18021549

- Lu, X., Ma, Y., Liu, X., 2014. Effects of hydrogen peroxide accumulation, lipid peroxidation, and polyphenol oxidation during superficial scald development in 'Fuji' apples. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 55, 299–307. doi:10.1007/s13580-014-0112-8
- Lurie, S., Lichter, A., Kaplunov, T., Zutahy, Y., Oren-Shamie, M., Ovadia, R., 2010. Improvement of 'crimson seedless' grape colour by abscisic acid treatment. *Acta Hort.* 880, 183–190. doi:10.17660/ActaHortic.2010.880.20
- Ma, F., Cheng, L., 2003. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Sci.* 165, 819–827. doi:10.1016/S0168-9452(03)00277-2
- Ma, F., Cheng, L., 2004. Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophyll cycle and the ascorbate-glutathione cycle. *Plant Sci.* 166, 1479–1486. doi:10.1016/j.plantsci.2004.01.024
- Macedo-Márquez, A., 2012. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 15, 97–103. doi:10.22201/fesz.23958723e.2012.2.61
- Mapelli, S., Brambilla, I.M., Radyukina, N.L., Reggiani, R., 2008. Free and bound polyamines changes in different lants as a consequence of Uv-B. *Gen. Appl. Plant Physiology, special issue*, 34, 55-66. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.398.9670&rep=rep1&type=pdf>
- Martínez-Cruz, N. del S., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M.J., Morales, C.R.M., Oranday-Cárdenas, A., Adriana Núez-González, M., Eufemia Morales-Rubio, M., 2011. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 42, 66–71. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000400007

- Mattoo, A.K., Lieberman, M., 1977. Localization of the ethylene-synthesizing system in apple tissue. *Plant Physiol.* 60, 794–799. doi:10.1104/pp.60.5.794
- McGuire, R.G., 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27, 1254–1255. doi.org/10.21273/HORTSCI.27.12.1254
- Mendoza, A., 2021. ¿Cuál es la fruta más consumida en el mundo? *La Noticia*, 12/5/2021. <https://lanoticia.com/noticias/cual-es-la-fruta-mas-consumida-en-el-mundo/> consultado 11/11/21.
- Melnyk, O., Drozd, O., Boicheva, N., Zhmudenko, Y., Melnyk, I., Khudik, L., Remeniuk, L., Vykhatniuk, L., 2014. Ethylene emission of apples treated with 1-methylcyclopropene during storage. *J. Hortic. Res.* 22, 109–112. doi:10.2478/johr-2014-0013
- Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., 2000. Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 55, 155–163. doi:10.1016/S1011-1344(00)00042-7
- Merzlyak, M.N., Melø, T.B., Naqvi, K.R., 2008. Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: Signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. *J. Exp. Bot.* 59, 349–359. doi:10.1093/jxb/erm316
- Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E., Chivkunova, O.B., 2002. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 679–684. doi:10.1016/S0981-9428(02)01408-0
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ.* 33, 453–467. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x
- Minocha, R., Majumdar, R., Minocha, S.C., 2014. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship, in: Tiburcio, A.F., Alcázar, R. (Eds.), *Plant*

- Polyamines in Stress and Development. *Frontiers in Plant Science*, pp. 6–22. doi:10.3389/978-2-88919-303-5
- Mishra, N.P., Mishra, Ranjit, K., Singha, G.S., 1993. Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol.* 102, 903–910. doi:10.1104/pp.102.3.903
- Mitcham, B., 2002. *Fruit Physiological Disorders : Apples Sunburn (Sunscald)*. Davis, California, USA. http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fruit_Physiological_Disorders/?uid=4&ds=822
- Mitcham, B., Cantwell, M., Kader, A., 1996. Methods for Determining Quality of Fresh Commodities 1–5. <https://ucanr.edu/datastoreFiles/608-295.pdf>
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02312-9.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F., 2011. ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci.* doi:10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Morales-Quintana, L., Waite, J.M., Kalcsits, L., Torres, C.A., Ramos, P., 2020. Sun injury on apple fruit: Physiological, biochemical and molecular advances, and future challenges. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. doi:10.1016/j.scienta.2019.108866
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Hashizume, K., Kitayama, M., 2007. Effect of high temperature on anthocyanin composition and transcription of flavonoid hydroxylase genes in “Pinot noir” grapes (*Vitis vinifera*). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 82, 199–206. doi:10.1080/14620316.2007.11512220
- Munné-Bosch, S., Vincent, C., 2019. Physiological Mechanisms Underlying Fruit Sunburn. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 38, 140–157. doi:10.1080/07352689.2019.1613320

- Muñoz, P., Munné-Bosch, S., 2018. Photo-oxidative stress during leaf, flower and fruit development. *Plant Physiol.* doi:10.1104/pp.17.01127
- Mupambi, G., Reynolds, J.S., Steyn, W.J., 2014. Foliar S-ABA application does not reduce sunburn in 'Granny Smith' apple. *Acta Hort.* 1042, 303–309. doi:10.17660/ActaHortic.2014.1042.36
- Mupambi, G., Schmeisser, M., Dzikiti, S., Reynolds, S., Steyn, W.J., 2018. Ineffectiveness of foliar S-ABA application as an apple sunburn suppressant explained through effects on peel biochemistry and leaf ecophysiology. *Sci. Hortic.* 232, 256–263. doi:10.1016/j.scienta.2018.01.021
- Murcia, G., Pontin, M., Reinoso, H., Baraldi, R., Bertazza, G., Gómez-Talquenca, S., Bottini, R., Piccoli, P.N., 2016. ABA and GA3 increase carbon allocation in different organs of grapevine plants by inducing accumulation of non-structural carbohydrates in leaves, enhancement of phloem area and expression of sugar transporters. *Physiol. Plant.* 156, 323–337. doi:10.1111/ppl.12390
- Musacchi, S., Serra, S., 2018. Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 234, 409–430. doi:10.1016/j.scienta.2017.12.057
- Nambara, E., Marion-Poll, A., 2005. Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 165–185. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046
- Naschitz, S., Naor, A., Sax, Y., Shahak, Y., Rabinowitch, H.D., 2015. Photo-oxidative sunscald of apple: Effects of temperature and light on fruit peel photoinhibition, bleaching and short-term tolerance acquisition. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 197, 5–16. doi:10.1016/j.scienta.2015.11.003
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Foyer, C.H., 2011. Glutathione. *Arab. B.* doi:10.1199/tab.0142
- Oh, H.D., Yu, D.J., Chung, S.W., Chea, S., Lee, H.J., 2018. Abscisic acid stimulates anthocyanin accumulation in 'Jersey' highbush blueberry fruits during ripening. *Food Chem.* 244, 403–407. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.051

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO UTF ARG, 2015. Regionalización de los Sistemas de Riego Provincia del Neuquén. Documento de Trabajo N°14 : Neuquén, Argentina. <https://docplayer.es/44712576-Documento-de-trabajo-n-14-regionalizacion-de-los-sistemas-de-riego-provincia-del-neuquen.html>
- Padrón Pereira, C.A., Padrón León, G., Montes Hernández, A.I., Oropeza González, R.A., 2012. Determinación del color en epicarpio de tomates. Agron. Costarric. 36, 97–111.
- Pál, M., Szalai, G., Janda, T., 2015. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. Plant Sci. 237, 16–23. doi:10.1016/j.plantsci.2015.05.003
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Anal. Biochem. 154, 536–541. doi:10.1016/0003-2697(86)90026-6
- Pastori, G.M., Foyer, C.H., 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. Plant Physiol. 129, 460 LP – 468. doi:10.1104/pp.011021
- Peleg, Z., Blumwald, E., 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. Curr. Opin. Plant Biol. 14, 290–295. doi:10.1016/j.pbi.2011.02.001
- Peng, J., Li, Z., Wen, X., Li, W., Shi, H., Yang, L., Zhu, H., Guo, H., 2014. Salt-induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis*. PLoS Genet. 10. doi:10.1371/journal.pgen.1004664
- Peng, T., Moriguchi, T., 2013. The molecular network regulating the coloration in apple. Sci. Hortic. (Amsterdam). 163, 1–9. doi:10.1016/j.scienta.2013.06.005
- Peppi, M.C., Fidelibus, M.W., Dokoozlian, N., 2006. Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of 'Flame Seedless' grapes. HortScience 41, 1440–1445. doi:10.21273/HORTSCI.41.6.1440

- Polito, V.S., Larson, K.D., Pinney, K., 2002. Anatomical and histochemical factors associated with bronzing development in strawberry fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127, 355–357. doi:10.21273/jashs.127.3.355
- Pospíšil, P., 2016. Production of reactive oxygen species by Photosystem II as a response to light and temperature stress. *Front. Plant Sci.* 7, 1–12. doi:10.3389/fpls.2016.01950
- Pottosin, I., 2015. Polyamine action on plant ion channels and pumps, in: Kusano, T., Suzuki, H. (Eds.), *Polyamines*. Springer, Japan, pp. 229–241. doi:10.1007/978-4-431-55212-3
- Preston, K.A., Johnson, J.R., 2007. Physiology of sunburn development in apples. Department of Horticulture and Landscape Architecture, Pullman, Washington, USA. *Good Fruit Grower* 1–4.
- Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., Li, H.Y., 2008. Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 2–18. doi:10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x
- Quiroga, A.M., Berli, F.J., Moreno, D., Cavagnaro, J.B., Bottini, R., 2009. Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard-grown wine grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set with no negative effects on anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine. *J. Plant Growth Regul.* 28, 28–35. doi:10.1007/s00344-008-9070-7
- Racsko, J., Schrader, L.E., 2012. Sunburn of apple fruit: historical background, recent advances and future perspectives. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 455–504. doi:10.1080/07352689.2012.696453
- Rattanakon, S., Ghan, R., Gambetta, G.A., Deluc, L.G., Schlauch, K.A., Cramer, G.R., 2016. Abscisic acid transcriptomic signaling varies with grapevine organ. *BMC Plant Biol.* 16, 72. doi:10.1186/s12870-016-0763-y
- Raudone, L., Raudonis, R., Liaudanskas, M., Viskelis, J., Pukalskas, A., Janulis, V., 2016. Phenolic profiles and contribution of individual compounds to antioxidant

- activity of apple powders. *J. Food Sci.* 81, C1055–C1061. doi:10.1111/1750-3841.13277
- Rodriguez, A., Muñoz, A., 2006b. Síntesis Agrometeorológica para el período 1990 - 2004 EEA INTA Alto Valle, in: (INTA), I. de T.A. (Ed.), Boletín de Divulgaciones Técnicas N°53; 38. EEA Alto Valle.CR Patagonia Norte.General Roca, Argentina, pp. 1–50. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-sintesis_agrometeorologica_1990-2004.pdf
- Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., 2013. Increasing the phenolic compound content of grapes by preharvest application of abscisic acid and a combination of methyl jasmonate and benzothiadiazole. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3978–3983. doi:10.1021/jf400631m
- Sah, S.K., Reddy, K.R., Li, J., 2016. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Front. Plant Sci.* 7, 1–26. doi:10.3389/fpls.2016.00571
- Sandhu, A.K., Gray, D.J., Lu, J., Gu, L., 2011. Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. *Food Chem.* 126, 982–988. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.105
- Sansberro, P.A., Mroginski, L.A., 2004. Foliar sprays with ABA promote growth of *Ilex paraguariensis* by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regul.* 105–111. doi: 10.1023/B:GROW.0000017476.12491.02
- Schaedle, M., Bassham, J., 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol.* 82, 351–6. doi:10.1104/pp.82.2.351
- Schrader, L.E., 2011. Scientific basis of a unique formulation for reducing sunburn of fruits. *HortScience* 46, 6–11. doi:10.21273/hortsci.46.1.6
- Schrader, L.E., Kahn, C.B., Sun, J., Xu, J., Zhang, J., Felicetti, D.A., 2011. Effects of high temperature and high solar irradiance on sunburn, quality, and skin

- pigments of apple fruit. *Acta Hortic.* 903, 1025–1039. doi:10.17660/ActaHortic.2011.903.144
- Schrader, L.E., Sun, J., Zhang, J., Felicetti, D., Tianz, J., 2008. Heat and light-induced apple skin disorders: Causes and prevention, in: *Acta Horticulturae*. doi:10.17660/ActaHortic.2008.772.5
- Schrader, L.E., Sun, J., Zhang, J., Seo, J.H., Jedlow, L., Felicetti, D., 2004. Fruit skin disorders, Washington Tree Fruit Postharvest Conference. Washington.
- Schrader, L.E., Zhang, J., Duplaga, W.K., 2001. Two types of sunburn in apple caused by high fruit surface (peel) temperature. *Plant Heal. Prog.* 10, 1–5. doi:10.1094/PHP-2001-1004-01-RS
- Schrader, L.E., Zhang, J., Sun, J., 2003. Environmental stresses that cause sunburn of apple. *Acta Hortic.* 618, 397–405. doi:10.17660/ActaHortic.2003.618.47
- Seo, J.H., Sun, J., Schrader, L., Tian, J., 2008. Use of chlorophyll fluorescence to assess heat stress in apple fruit. *Acta Hortic.* 772, 279–282. doi:10.17660/ActaHortic.2008.772.44
- Serradell, M.D.L.A., Rozenfeld, P.A., Martínez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R., Añón, M.C., 2000. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): Characterisation and partial purification. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1421–1427. doi:10.1002/1097-0010(200007)80:9<1421::AID-JSFA649>3.0.CO;2-K
- Shang, W., Feierabend, J., 1999. Dependence of catalase photoinactivation in rye leaves on light intensity and quality and characterization of a chloroplast-mediated inactivation in red light. *Photosynth. Res.* 59, 201–213. doi:10.1023/A:1006139316546
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26. doi:10.1155/2012/217037

- Shelp, B.J., Deyman, K.L., DeEll, J.R., Bozzo, G.G., 2019. Polyamine homeostasis in apple fruit stored under multiple abiotic stresses. *Can. J. Plant Sci.* 99, 88–92. doi:10.1139/cjps-2018-0173
- Shewfelt, R.L., Purvis, A.C., 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *HortScience* 30, 197–205.
- Singh, D., D Sharma, D., Singh, G., Kumar Thakur, K., Kumari, S., 2019. Physiological disorders and their management in apple and pear fruits production, in: Singh, Anurag (MGKVP University, Varanasi, U.P., I. (Ed.), *Advanced Botany Volume - 1*. AkiNik Publications, New Delhi, India, pp. 39–66.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simonič, M., Knez, Ž., 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 89, 191–198. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.025
- Smirnoff, N., 2014. Plant stress physiology. *eLS Subj. area Plant Sci.* doi:10.1002/9780470015902.a0001297.pub2
- Solovchenko, A.E., Merzlyak, M.N., 2008. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants 55, 719–737. doi:10.1134/S1021443708060010
- Storti, L., 2016. *Informes de Cadenas de Valor: Frutícola - Manzana y Pera*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/complejo_fruta_pepita.pdf
- Sozzi, G. O., 2007. Fisiología de la maduración de los frutos de especies leñosas. En Sozzi, G. O., ed. *Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento*. Buenos Aires: Facultad de Agronomía. pp. 667-687.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A., 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient, in: George C. Papageorgiou and Govindje (Ed.), *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, The Netherlands., pp. 321–362.

- Sun, S., Xin, L., Gao, H., Wang, J., Li, P., 2014. Response of phenolic compounds in 'Golden Delicious' and 'Red Delicious' apples peel to fruit bagging and subsequent sunlight re-exposure. *Scientia* 168, 161–167. doi:10.1016/j.scienta.2014.01.031
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G., 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell Environ.* 35, 259–270. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x
- Suzuki, N., Mittler, R., 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signalling and destruction. *Physiol. Plant.* 126, 41–51. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00582.x
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R., 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol.* 203, 32–43. doi:10.1111/nph.12797
- Szabó, I., Bergantino, E., Giacometti, G.M., 2005. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Rep.* 6, 629–634. doi:10.1038/sj.embor.7400460
- Taiz, L., Zeiger, E., 2006. *Fisiología Vegetal*, 3er ed. Universitat Jaume, Castellon de las Palmas, España.
- Takahashi, S., Badger, M.R., 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage 53–60. doi:10.1016/j.tplants.2010.10.001
- Takahashi, S., Murata, N., 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* 13, 178–182. doi:10.1016/j.tplants.2008.01.005
- Takahashi, T., Tong, W., 2015. Regulation and diversity of polyamine biosynthesis in plants, in: Kusano, T., Suzuki, H. (Eds.), *Polyamines*. Springer Japan, Japan, pp. 27–44. doi:10.1007/978-4-431-55212-3_3 27
- Tartachnyk, I., Kuckenber, J., Yuri, J.A., Noga, G., 2012. Identifying fruit characteristics for non-invasive detection of sunburn in apple. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 134, 108–113. doi:10.1016/j.scienta.2011.11.009

- Tartachnyk, I., Blanke, M.M., 2004. Effect of delayed fruit harvest on photosynthesis, transpiration and nutrient remobilization of apple leaves. *New Phytol.* 164, 441–450. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01197.x
- Tiburcio, A.F., Alcázar, R., 2014. Plant polyamines in stress and development. *Frontiers in Plants Science*. doi:10.3389/978-2-88919-303-5
- Toivonen, P.M.A., Hodges, D.M., 2011. Abiotic stress in harvested fruits and vegetables, in: Shanker Arun (Ed.), *Abiotic stress in plants - mechanisms and adaptations*. Headquarters IntechOpen Limited, London, SE1 9SG, UNITED KINGDOM. doi:10.5772/22524
- Toranzo, J., 2016. *Producción mundial de manzanas y peras*. Ediciones INTA, Allen, Río Negro, Argentina. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_produccion-mundial-de-manzanas-y-peras_0.pdf
- Torres, C.A., Sepulveda, A., Gonzalez-Talice, J., Yuri, J.A., Razmilic, I., 2013. Fruit water relations and osmoregulation on apples (*Malus domestica* Borkh.) with different sun exposures and sun-injury levels on the tree. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 161, 143–152. doi:10.1016/j.scienta.2013.06.035
- Torres, C.A., Sepúlveda, G., Kahlaoui, B., 2017. Phytohormone interaction modulating fruit responses to photooxidative and heat stress on apple (*Malus domestica* Borkh.). *Front. Plant Sci.* 8, 1–11. doi:10.3389/fpls.2017.02129
- Toumi, I., Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Bouamama, B., Salem-fnayou, A. Ben, Ghorbel, Abdel Wahed Mliki, A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2010. Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. *J. Plant Physiol.* 167, 529–525. doi:10.1016/j.jplph.2009.10.022
- Travaglia, C., Reinoso, H., Cohen, A., Luna, C., Tommasino, E., Castillo, C., Bottini, R., 2010. Exogenous ABA increases yield in field-grown wheat with moderate water restriction. *J. Plant Growth Regul.* 29, 366–374. doi:10.1007/s00344-010-9147-y

- Treutter, D., 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regul.* 34, 71–89. doi:10.1023/A:1013378702940
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., Khanizadeh, S., 2005. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agric. Food Chem.* 53, 4989–4995. doi:10.1021/jf048289h
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Grisse, W., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol.* 139, 806–821. doi:10.1104/pp.105.065896
- Verma, V., Ravindran, P., Kumar, P.P., 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 16, 1–10. doi:10.1186/s12870-016-0771-y
- Vieira, F.G.K., Borges, G.D.S.C., Copetti, C., Amboni, R.D.D.M.C., Denardi, F., Fett, R., 2009. Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 122, 421–425. doi:10.1016/j.scienta.2009.06.012
- Vieira, F.G.K., Copetti, C., Da Silva Campelo Borges, G., Gonzaga, L.V., Da Costa Nunes, E., Fett, R., 2009. Activity and contents of polyphenols antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. *Arch. Latinoam. Nutr.* 59, 101–106.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M., Sharma, S., 2017. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. *Front. Plant Sci.* 8, 1–12. doi:10.3389/fpls.2017.00161
- Vita, L.I., Maiale, S.J., Spera, N., Colavita, G.M., 2019. Changes in polyamine levels on sunburn apple skin. *Acta Hortic.* 273–280. doi:10.17660/actahortic.2019.1261.39

- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199–223. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.05.011
- Wand, S.J.E., van den Dool, K., Smit, A., Steyn, W.J., 2008. Heat injury thresholds in apples measured using chlorophyll fluorescence are influenced by orchard heat reduction technologies. *Acta Hortic.* 772, 273–277. doi:10.17660/ActaHortic.2008.772.43
- Wang, F., Cui, X., Sun, Y., Dong, C.H., 2013. Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Rep.* doi:10.1007/s00299-013-1421-6
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5
- Watkins, C.B., Bowen, J.H., Walker, V.J., 1989. Assessment of ethylene production by apple cultivars in relation to commercial harvest dates. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 17, 327–331. doi:10.1080/01140671.1989.10428052
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313. doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- Wen, X.P., Ban, Y., Inoue, H., Matsuda, N., Kita, M., Moriguchi, T., 2011. Antisense inhibition of a spermidine synthase gene highlights the role of polyamines for stress alleviation in pear shoots subjected to salinity and cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 72, 157–166. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.03.001
- Wu, L., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, X.C., Huang, R., 2008. Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol.* 148, 1953–1963. doi:10.1104/pp.108.126813

- Wünsche, J.N., Bowen, J., Ferguson, I., Woolf, A., 2004. Sunburn on apples - Causes and control mechanisms. *Acta Hort.* 636, 631–636. doi:10.17660/ActaHortic.2004.636.78
- Xia, X.J., Zhou, Y.H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C.H., Yu, J.Q., 2015. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 66, 2839–2856. doi:10.1093/jxb/erv089
- Xiong, L., Zhu, J.-K., 2003. Update on abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 133, 29–36. doi:10.1104/pp.103.025395.mutant
- You, J., Chan, Z., 2015. Ros regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Front. Plant Sci.* 6, 1–15. doi:10.3389/fpls.2015.01092
- Yu, Y., Wang, J., Li, S., Kakan, X., Zhou, Y., Miao, Y., Wang, F., Qin, H., Huang, R., Zhang, H., Li, A., Zhang, Z.F.Z., Huang, Z., Lu, P., Zhang, D., Liu, X., Zhang, Z.F.Z., Huang, R., 2019. Ascorbic acid integrates the antagonistic modulation of ethylene and abscisic acid in the accumulation of reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 179, 1861–1875. doi:10.1104/pp.18.01250
- Yuri, J.A., 2001. Boletín Técnico Centro Pomaceas; Golpe de sol. Talca, Chile. http://pomaceas.utralca.cl/wp-content/uploads/2016/06/2001_01_01.pdf
- Yuri, J.A., Neira, A., Fuentes, M., Sáez, B., Razmilic, I., Palomo, I., 2014. Chemical and antioxidant characterization of different apple cultivars in Chile. *J. Food, Agric. & Environ.* 12, 150–154. <http://world-food.net/.../27.pdf>
- Yuri, J.A., Neira, A., Maldonado, F., Quilodrán, Á., Simeone, D., Razmilic, I., Palomo, I., 2014. Total phenol and quercetin content and antioxidant activity in apples in response to thermal, light stress and to organic management. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 87, 131–138. doi:10.5073/JABFQ.2014.087.020
- Zeevaart, J.A.D., Creelman, R.A., 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 439–473. doi:10.1146/annurev.pp.39.060188.002255

-
- Zhang, H., Li, A., Zhang, Z., Huang, Z., Lu, P., Zhang, D., Liu, X., Zhang, Z.F., Huang, R., 2016. Ethylene response factor TERF1, regulated by ETHYLENE-INSENSITIVE3-like factors, functions in reactive oxygen species (ROS) scavenging in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Sci. Rep.* 6, 1–10. doi:10.1038/srep29948
- Zhang, J., Niu, J., Duan, Y., Zhang, M., Liu, J., Li, P., Ma, F., 2015. Photoprotection mechanism in the 'Fuji' apple peel at different levels of photooxidative sunburn. *Physiol. Plant.* 154, 54–65. doi:10.1111/ppl.12272
- Zhang, Linsen, Li, X., Zhang, Lixin, Li, B., Han, M., Liu, F., Zheng, P., Alva, A.K., 2014. Role of abscisic acid (ABA) in modulating the responses of two apple rootstocks to drought stress. *Pakistan J. Bot.* 46, 117–126.
- Zhang, M., Yuan, B., Leng, P., 2009. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *J. Exp. Bot.* 60, 1579–1588. doi:10.1093/jxb/erp026
- Zhao, J., Xie, X., Shen, X., Wang, Y., 2016. Effect of sunlight-exposure on antioxidants and antioxidant enzyme activities in 'D' Anjou' pear in relation to superficial scald development. *Food Chem.* 210, 18–25. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.045
- Zivcak, M., Brestic, M., Kalaji, H.M., Govindjee, 2014. Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: Is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with protection against excess of light? *Photosynth. Res.* 119, 339–354. doi:10.1007/s11120-014-9969-8
- Zupan, A., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., 2014. Individual phenolic response and peroxidase activity in peel of differently sun-exposed apples in the period favorable for sunburn occurrence. *J. Plant Physiol.* 171, 1706–1712. doi:10.1016/j.jplph.2014.08.010

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

En revistas científicas

Colavita, G.M., Guiamet, J.J. and Civello, P.M. (2020). Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant response and quality of apple exposed to high solar radiation stress. *Acta Hort.* 1289, 27-34. DOI: 10.17660/ActaHortic.2020.1289.4

Blackhall V., Orioli G.A., Colavita G.M. (2020). JIP-test parameters to study apple peel photosystem II behavior under high solar radiation stress during fruit development. *Photosynthetica* 58 (Special Issue): 129-137. DOI: 10.32615/ps.2019.159

Vita, L.I., Maiale, S.J., Spera, N. and Colavita, G.M. (2019). Changes in polyamine levels on sunburn apple skin. *Acta Hort.* 1261, 273-280
DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1261.39

En actas de congresos

Colavita G.M., Guiamet J.J., Civello P.M. "Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant response and quality of apple fruits exposed to high solar radiation stress" IV Balkan Symposium on Fruit Growing, 14-18 September, Istanbul, Turkey, 2019.

Vita L.I., Venturino A., Colavita G.M. "Oxidative stress due to high solar radiation increases free polyamines content in apple skin" IV Balkan Symposium on Fruit Growing, 14-18 September, Istanbul, Turkey, 2019.

Vita L.I., Maiale S., Spera N., Colavita G.M. "Changes in polyamine levels on sunburn apple skin". I International Apple Symposium, ISHS, 10-16/10/2016, Shaanxi, China.

Colavita G., Vita L., Gomila T., Civello P. "Changes in antioxidants components during cold storage on apple (*Malus domestica*, cv granny smith) grown under different solar radiation". III International Symposium on Postharvest Pathology, ISHS, 7-11/06/2015, Bari, Italia.

