



Facultad de  
Ciencias Agrarias  
y Forestales



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

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

**Daño por sol en peras: Efecto del estrés por alta temperatura y radiación e influencia del calcio sobre el metabolismo de la pared celular y la conservación postcosecha**

**Tesista:** Ing. Agr. Nazarena Spera

**Director:** Dr. Pedro Marcos Civello

**Co directora:** Dra. Graciela María Colavita

**Asesora Académica:** Dra. Lorenza Costa

**2023**

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

**“DAÑO POR SOL EN PERAS: Efecto del estrés por alta temperatura y radiación e influencia del calcio sobre el metabolismo de la pared celular y la conservación postcosecha”**

**Tesista**

Ing. Agr. Nazarena Spera

(Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue, CONICET-UNCo)

**Director**

Dr. Pedro Marcos Civello

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

**Co directora**

Dra. Graciela María Colavita

(Facultad de Ciencias Agrarias, UNCo; Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue, CONICET-UNCo)

**Asesora Académica**

Dra. Lorenza Costa

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

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

**JURADOS DE TESIS**

Dra. Ing. Agr. M. Dolores Raffo Benegas

(INTA, EEA Alto Valle)

Dr. Guillermo R. Pratta

(Facultad de Ciencias Agrarias, UNR; Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario, CONICET-UNR)

Dr. Ariel Vicente

(Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; Laboratorio de Investigaciones en Productos Agroindustriales, CONICET-UNLP)

Fecha de presentación: Noviembre,2023

*Dedicado a...*  
*... mi nona Nelly, en particular;*  
*...mi amada familia, en su totalidad.*

## AGRADECIMIENTOS

La concreción de esta Tesis ha sido posible gracias al apoyo y la colaboración de muchas personas que me fueron brindando, en el camino del hacer, su tiempo, su afecto y su conocimiento. A todas ellas, les quiero expresar mi agradecimiento por compartir conmigo estos años de andar y desandar un sendero lleno de desafíos e interrogantes, pero al mismo tiempo de entusiasmo y generosidad.

A la Universidad Nacional de La Plata, Universidad Nacional del Comahue, Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC, CONICET-UNCo) e Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE, CONICET-UNLP) por la posibilidad que me brindaron para realizar mis estudios doctorales.

A la empresa Tres ASES S.A. por permitir la utilización de sus chacras para los experimentos y de sus cámaras frigoríficas para la conservación de las muestras.

Un agradecimiento especial al Dr. P. Marcos Civello, por haber aceptado la dirección de la presente tesis, por sus observaciones enriquecedoras, por el esfuerzo y el tiempo dedicados para la realización de esta investigación, sin mencionar el apoyo y la paciencia sostenidas durante este proceso.

A la Dra. Graciela M. Colavita, mi co directora (mi jefecita), por brindarme su afecto además de su tiempo, por transmitir generosamente su experiencia invaluable, y porque supo crear solidariamente espacios de reflexión y de formación ética y profesional.

A la Dra. Lorenza Costa, por su acompañamiento y asesoramiento a lo largo de todo este tiempo.

A mis amigas y colegas, Laura I. Vita y Nidia F. Gonzalez, por colaborar en el campo y en el laboratorio, pero, sobre todo, por su presencia constante y su cálido estímulo, sobre todo en momentos de desasosiego, alentándome a seguir adelante.

A Mauro Perini e Ignacio Sin, por la paciencia y el tiempo que dedicaron en la capacitación de técnicas esenciales para el desarrollo de este trabajo.

A Ximena Mondaca, Facundo Gonzalez y Alén Martin por su colaboración en los muestreos de campo y en las largas jornadas de laboratorio.

A la Mg. Julia Ousset, por su ayuda indispensable para el desarrollo de los estudios de expresión de genes. Y a todas las chicas de CONITREK (Juli, Ceci, Male, Nati, Coqui y Fla) quienes hicieron más divertidos los días de estudio y de trabajo.

A los técnicos de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agrarias (Marito, Ceci y Facu) por toda la predisposición que siempre han tenido.

Y por sobre todo a mi amada FAMILIA, que me brinda su amor, acompañamiento y cariño incondicionalmente en cada camino que elijo seguir. ¡Sin ustedes nada de esto podría ser posible, porque son la energía que me impulsa a ir por más todos los días!

## PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en la presente tesis han sido publicados en revistas científicas con referato, y en congresos y jornadas de índole tanto nacional como internacional. También se ha colaborado con miembros del grupo de investigación realizando trabajos por fuera del plan de la presente tesis.

### Trabajos publicados en revista inherentes a la presente tesis

- Spera, Nazarena; Laura I. Vita; Pedro M. Civello; Colavita, Graciela M. (2023). Estado oxidativo y calidad de frutos de pera variedad Beurré D'Anjou con "blush". *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 39 (1):12-22. ISSN 0719-3890 online. <https://doi.org/10.29393/CHJAA39-2EONG40002>. Disponible online desde el 27/04/2023
- Spera, Nazarena; Laura I. Vita; Pedro M. Civello; Colavita, Graciela M. (2023) Antioxidant response y quality of sunburn Beurré D'Anjou pears (*Pyrus communis* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 198 (107706). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107703>. Disponible online desde el 14/04/2023.
- Spera, Nazarena; Ousset, Julia; Pedro M. Civello; Colavita, Graciela M. (2023). "Changes in cell walls on fruit skin of Beurré D'Anjou pears (*Pyrus communis* L.) associated with sunburn injury". *Scientia Horticulturae* 307 (111524): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111524>. Disponible online desde el 15/09/2022.

### Trabajos publicados en revistas como colaboración

- Vita, Laura I.; Maiale, Santiago; Spera, Nazarena; Colavita, Graciela M. (2019). Changes in polyamine levels on sunburn apple skin. *Acta Horticulturae*. 1261:273-280. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2019.1261.39>.

### Presentaciones a congresos y jornadas

- Spera, Nazarena; Vita, Laura I.; Civello, P. Marcos; Colavita, Graciela M. "Sunburn effect on cell wall of pear skin during post-harvest ripening". XXXIV Argentinian meeting of plant physiology, RAFV. 24 al 27 de septiembre de 2023. Santa Fe, Argentina. **Participación:** Poster.
- Vita, Laura I.; Spera, Nazarena; Colavita, Graciela M. "Evolución poscosecha del contenido de poliaminas libres en manzana var. Granny Smith con daño por sol". IV Congreso Argentino de Biología y tecnología Postcosecha. 30 de agosto al 1 de septiembre de 2023. La Plata, Argentina. **Participación:** Poster.
- Spera, Nazarena; Vita, Laura I.; Civello, P. Marcos; Colavita, Graciela M. "Physiological y biochemical changes related to oxidative metabolism in the

- skin of sunburn pear fruits*". 2022. XVIII Brazilian Congress of Plant Physiology y I Ibero-latinoamerican Congress of Plant Biology. 6 al 9 Septiembre de 2022. Porto Alegre, Brasil. **Participación:** Poster.
- Buet, Agustina; Morell, Malena, Spera, Nazarena; Vita, Laura I.; Colavita, Graciela M.; Galatro, Yrea. "*Effect of pre-storage treatment with a nitric oxide donor on the postharvest quality of cherry fruits*". XXXIII Argentinian meeting of plant physiology, RAFV. 13 al 17 de septiembre de 2021. Santa Fe, Argentina. **Participación:** Poster.
  - Spera, Nazarena; Civello, P. Marcos; Colavita, Graciela M. "*Degradación de la pared celular durante el climaterio de peras D'Anjou expuestas a alta radiación solar*". II Congreso Argentino de Biología y Tecnología Postcosecha. 11 al 13 de septiembre de 2019. Santiago del Estero, Argentina. **Participación:** Poster y resumen publicado en Actas de Congreso (pag. 67).
  - Spera, Nazarena; Vita, Laura I.; Colavita, Graciela, M. "*Oxidative metabolism in skin of pear fruits exposed to high solar radiation stress*". XXXII Reunión Argentina, XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal, Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. 11 al 15 de noviembre de 2018. Córdoba, Argentina. **Participación:** Expositora, poster y resumen publicado en Actas de Congreso (pag. 151).
  - Colavita, Graciela M.; Spera, Nazarena; González, Nidia; Curetti, Mariela. "*Effects of exogenous applications of abscisic acid in antioxidant metabolism y photosynthesis of apple trees*". XXXII Reunión Argentina XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. 11 al 15 de noviembre de 2018. Córdoba, Argentina. **Participación:** poster y resumen publicado en Actas de Congreso (pag. 49).
  - Castro, Andrea; Spera, Nazarena; Curetti, Mariela; Colavita, Graciela M. "*Effect of abscisic acid exogenous application in apple trees antioxidant metabolism y photosynthesis*". XII Reunión de Biología Vegetal. 4-7 de diciembre de 2017. Villarica, Chile. **Participación:** poster y resumen en Actas de Congreso (pag. 46). <http://www.biologiavegetal.cl/wp-content/uploads/2017/08/XII-RBV-ABSTRACT-BOOK-2017.pdf>

# INDICE

ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. El cultivo de la pera en Argentina.....	1
1.1. Relevancia productiva y económica.....	1
1.2. Características edafo-climáticas del Alto Valle.....	2
1.3. Variedades de peras cultivadas en la región.....	4
1.4. Características generales de los frutos de pera.....	5
2. Daño por sol en frutos de pera.....	7
2.1. Factores incidentes en el desarrollo del daño por sol.....	9
2.2. Daño oxidativo y sistema de defensa.....	10
2.3. Caracterización de daño por sol en frutos.....	13
3. La pared celular.....	16
3.1. Componentes de la pared celular primaria.....	17
3.1.1. Celulosa.....	17
3.1.2. Hemicelulosas.....	18
3.1.3. Pectinas.....	18
3.1.4. Otros componentes de la pared celular.....	19
3.2. Modelo e interacciones de la pared celular.....	20
3.3. Enzimas modeladoras de la pared celular.....	21
3.4. Cambios en la pared celular durante la maduración de los frutos.....	22
3.5. Cambios adaptativos en la pared celular frente a estrés abiótico.....	24
4. El calcio.....	26
4.1. El calcio y la pared celular.....	26
4.2. El calcio y el estrés abiótico.....	27
4.3. El calcio en los frutos.....	28
5. Fundamentos de la elección del tema de tesis.....	29
5.1. Hipótesis y objetivos.....	31
5.1.1. Hipótesis.....	31
5.1.2. Objetivo general.....	31
5.1.3. Objetivos específicos.....	32

MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Sitio de estudio y condiciones meteorológicas.....	33
1.1. Elección de la variedad de estudio .....	34
1.2. Escala para la clasificación de daño por sol .....	34
1.3. Diseño experimental y muestreo .....	36
1.3.1. Sistemas experimentales.....	36
1.3.1.1 Sistema experimental A: Frutos con daño por sol en cosecha bajo distintos tratamientos de fertilización cálcica.....	36
1.3.1.2. Sistema experimental B: Exposición de frutos a un evento de estrés por elevada radiación y temperatura.....	38
1.3.1.2.1. Determinación del tiempo de exposición a la luz solar directa .....	38
1.3.1.2.2. Experimentos de exposición a la luz solar directa para la determinación de la expresión de genes de enzimas relacionados a los componentes de la pared celular .....	40
1.3.1.3. Sistema experimental C: Evolución de la maduración de frutos con daño por sol y bajo distintos tratamientos de fertilización cálcica luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional .....	42
2. Material vegetal .....	42
3. Parámetros evaluados en campo .....	43
3.1. Carga total, peso y diámetro de frutos .....	43
3.2. Incidencia del daño por sol.....	44
4. Evaluación de índices de madurez y calidad.....	44
4.1. Cuantificación del color superficial de la piel .....	44
4.2. Firmeza de pulpa .....	45
4.3. Degradación de almidón .....	45
4.4. Contenido de sólidos solubles .....	46
4.5. Acidez titulable.....	46
4.6. Tasa de producción de etileno .....	46
5. Determinaciones fisiológicas y bioquímicas .....	47
5.1. Pérdida de electrolitos .....	47
5.2. Contenido relativo de agua (CRA) .....	48
5.3. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos .....	48
5.4. Peroxidación de lípidos de membranas.....	49
5.5. Metabolitos antioxidantes .....	50
5.5.1. Obtención del extracto metanólico ácido .....	50
5.5.2. Capacidad antioxidante .....	50
5.5.3. Polifenoles totales .....	51

5.5.4. Antocianinas monoméricas totales .....	51
5.6. Enzimas antioxidantes .....	52
5.6.1. Obtención de los extractos enzimáticos .....	52
5.6.2. Determinación de la actividad de SOD .....	52
5.6.3. Determinación de actividad de CAT .....	54
5.6.4. Determinación de actividad de APX .....	54
5.6.5. Cuantificación del contenido de proteínas .....	55
6. Obtención, fraccionamiento y análisis de la pared celular .....	55
6.1. Obtención del residuo insoluble en alcohol .....	56
6.2. Determinación del contenido de almidón .....	57
6.3. Eliminación de almidón .....	57
6.4. Obtención de las fracciones enriquecidas de pectinas .....	57
6.5. Obtención de la fracción enriquecida de hemicelulosas .....	58
6.6. Obtención de la fracción enriquecida de celulosa .....	58
6.7. Determinación de ácidos urónicos .....	58
6.8. Determinación de azúcares neutros .....	59
6.9. Determinación del contenido de lignina .....	59
6.10. Determinación del contenido de calcio .....	60
7. Análisis anatómico de la epidermis .....	61
8. Evaluación de la expresión genes de enzimas de la pared celular .....	63
8.1. Selección y análisis de cebadores ( <i>primers</i> ) .....	63
8.2. Electroforesis en geles de agarosa .....	65
8.3. Obtención de muestras .....	65
8.4. Extracción de ARN .....	65
8.5. Puesta a punto de <i>primers</i> en PCR punto final .....	66
8.6. Tratamiento con nucleasas de ADN .....	66
8.7. Retrotranscripción .....	66
8.8. Puesta a punto de <i>primers</i> en Real-Time PCR .....	67
8.8.1. Validación de primers para Real-Time PCR: rango dinámico y eficiencia de los primers .....	67
8.9. Determinación de la expresión de genes en piel de pera Anjou .....	67
9. Análisis estadístico .....	68
CAPÍTULO 1: Caracterización de la piel de frutos de peras con distintos niveles de daño por sol en la cosecha .....	69
1.1. INTRODUCCIÓN .....	69

1.1.1. Hipótesis.....	71
1.1.2. Objetivo específico .....	71
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1.2.1. Material vegetal .....	71
1.2.2. Medida de variables .....	71
1.2.3. Análisis estadístico .....	72
1.3. RESULTADOS .....	72
1.3.1. Color e índices de madurez de los frutos .....	72
1.3.2. Características anatómicas de la piel de los frutos .....	75
1.3.3. Pigmentos de la piel .....	79
1.3.4. Estado hídrico de la piel .....	80
1.3.5. Metabolismo oxidativo de la piel .....	81
1.3.6. Componentes de la pared celular de la piel .....	85
1.4. DISCUSIÓN.....	90
1.4.1. El daño por sol modifica la composición de pigmentos de la piel alterando el color.....	90
1.4.2. El daño por sol afecta la calidad interna de los frutos de pera .....	93
1.4.3. El daño por sol altera la estructura de las células de la piel de los frutos.....	94
1.4.4. Los frutos con daño por sol sufrieron daño oxidativo, pero presentan mayor capacidad antioxidante como resultado de la activación del sistema de defensa .....	96
1.4.5. En la piel de frutos con daño por sol, las paredes celulares sufren cambios en su contenido, composición y distribución.....	98
1.5. CONCLUSIÓN .....	102
CAPÍTULO 2: Determinación de cambios en la expresión génica de enzimas relacionadas a los componentes de la pared celular en la piel de frutos de pera con diferentes niveles de daño por sol y durante la exposición a elevada radiación solar .....	104
2.1. INTRODUCCIÓN .....	104
2.1.1. Hipótesis.....	107
2.1.2. Objetivo específico .....	108
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
2.2.1. Material vegetal .....	108
2.2.2. Medida de variables .....	109
2.2.3. Análisis estadístico .....	109
2.3. RESULTADOS .....	109
2.3.1. Análisis de cebadores .....	109
2.3.2. Ensayo A: Expresión de genes en frutos con distintos niveles de daño por sol .....	110

2.3.2.1. Expresión de genes asociados a la biosíntesis de lignina .....	110
2.3.2.2. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de pectinas.....	111
2.3.2.3. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de cadenas laterales .....	112
2.3.2.4. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de hemicelulosas .....	113
2.3.2.5. Expresión de genes asociados con modificación de la pared celular.....	113
2.3.3. Ensayo B: Expresión de genes durante la exposición a elevada radiación solar .....	114
2.3.3.1. Determinación de las condiciones óptimas para promover el estrés por elevada radiación solar en frutos de pera .....	114
2.3.3.2. Expresión de genes durante la exposición a elevada radiación solar .....	115
2.3.3.2.1. Expresión de genes asociados a la biosíntesis de lignina.....	115
2.3.3.2.2. Expresión de genes asociados con la degradación de pectinas .....	116
2.3.3.2.3. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de cadenas laterales .....	117
2.3.3.2.4. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de hemicelulosas .....	118
2.3.3.2.5. Expresión de genes asociados con modificación la pared celular.....	118
2.3.3.2.6. Estado de los tejidos de piel de pera post-exposición a la luz solar directa en campo .....	119
2.4. DISCUSIÓN.....	121
2.4.1. La expresión de genes de enzimas asociadas a la pared celular se ve alterada en la piel de los frutos con daños por sol.....	121
2.4.2. La expresión de genes de enzimas asociadas a remodelación de la pared celular se reduce durante la exposición a luz solar directa .....	125
2.5. CONCLUSIÓN .....	127
CAPÍTULO 3: Efecto de la exposición precosecha a elevada radiación solar y temperatura sobre parámetros asociados a la maduración postcosecha de frutos de pera.....	128
3.1. INTRODUCCIÓN .....	128
3.1.1. Hipótesis.....	130
3.1.2. Objetivo específico .....	130
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	130
3.2.1. Material Vegetal .....	130
3.2.2. Medida de variables .....	130
3.2.3. Análisis estadístico .....	131
3.3. RESULTADOS .....	131
3.3.1. Determinación de los estadios madurativos .....	131
3.3.2. Evolución de la calidad de los frutos con daño por sol durante la maduración.....	132
3.3.3. Evolución del metabolismo oxidativo de la piel durante la maduración .....	135
3.3.4. Evolución de los componentes de pared celular durante la maduración .....	139

3.4. DISCUSIÓN.....	147
3.4.1. Las diferencias en los índices de calidad en los tejidos con daño por sol se reducen durante la maduración.....	147
3.4.2. Los tejidos con daño por sol se ven menos afectados por los procesos oxidativos de la maduración.....	150
3.4.3. El desmontaje de la pared celular durante la maduración se ve ralentizado en los tejidos con daño por sol.....	152
3.5. CONCLUSIÓN.....	156
CAPÍTULO 4. Agrupación de los frutos de pera Anjou con daño por sol según la similitud en composición y comportamiento madurativo.....	157
4.1. INTRODUCCIÓN.....	157
4.1.1. Hipótesis.....	159
4.1.2. Objetivo específico.....	159
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	159
4.2.1. Material vegetal y variables de análisis.....	159
4.2.2. Medida de variables.....	159
4.2.3. Análisis estadísticos.....	160
4.3. RESULTADOS.....	160
4.3.1. Análisis multivariado en los tejidos con daño por sol a cosecha.....	160
4.3.1.1. Variables respuestas que determinan diferencias entre los tejidos con daño por sol.....	160
4.3.1.2. Agrupamiento de los tejidos con daño por sol en cosecha.....	162
4.3.2. Análisis multivariado en los tejidos con daño durante la maduración.....	163
4.3.2.1. Variables respuestas que determinan diferencias entre los tejidos con daño por sol durante distintas etapas de la maduración.....	163
4.3.1.2. Agrupamiento de los tejidos con daño por sol en relación con su comportamiento durante la maduración.....	165
4.4. DISCUSIÓN.....	167
4.4.1. Los tejidos con daños por sol <i>blush</i> y leve presentan un comportamiento metabólico similar en cosecha.....	167
4.4.2. Los tejidos con daño por sol presentan un comportamiento diferencial respecto de los tejidos sanos durante la maduración.....	170
4.5. CONCLUSIÓN.....	172
CAPÍTULO 5. Efecto de aplicaciones de calcio por suelo en la incidencia del daño por sol en frutos durante la cosecha y postcosecha.....	173
5.1. INTRODUCCIÓN.....	173
5.1.1. Hipótesis.....	174

5.1.2. Objetivo específico .....	174
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	174
5.2.1. Material Vegetal .....	174
5.2.2. Medida de variables .....	175
5.2.3. Análisis estadístico .....	175
5.3. RESULTADOS .....	176
5.3.1. ETAPA 1: COSECHA .....	176
5.3.1.1. Efecto del calcio sobre la productividad del monte y la incidencia del daño por sol .....	176
5.3.1.2. Índices de madurez y metabolismo oxidativo de tejidos con daño por sol bajo fertilizaciones con calcio .....	178
5.3.1.3. Composición de la pared celular de la piel de tejidos con daño por sol y fertilizados con calcio en precosecha .....	181
5.3.2. ETAPA 2: POSTCOSECHA.....	187
5.3.2.1. Evolución de la calidad y el metabolismo oxidativo de frutos con daño por sol y fertilizados con calcio durante la maduración.....	187
5.3.2.2. Cambios en los componentes de la pared celular de la piel durante la maduración de frutos con daño por sol y fertilizados con calcio .....	194
5.4. DISCUSIÓN.....	203
5.4.1. Fertilizaciones con calcio incrementan la capacidad antioxidante de la piel de frutos de pera Anjou aliviando la incidencia de daño por sol leve en campo .....	203
5.4.2. Fertilizaciones con calcio promueven modificaciones en la matriz pectínica y hemicelulosas de la pared celular de la piel de frutos de pera Anjou .....	206
5.4.3. Fertilizaciones de calcio retrasan la solubilización de pectinas en la pared celular de la piel de pera Anjou durante la maduración .....	208
5.4.4. Fertilizaciones de calcio no afectan el metabolismo oxidativo en la piel de frutos de pera Anjou durante maduración .....	211
5.5. CONCLUSIONES .....	213
CONCLUSIONES Y FUTUROS CAMPOS DE INVESTIGACION .....	214
BIBLIOGRAFÍA.....	217

## ABREVIATURAS

Ác. Ma. eq.: Ácido málico equivalente  
AC: Análisis de Conglomerados  
ACP: Análisis de Componentes Principales  
AG: Ácido galacturónico  
AN: Azúcares neutros  
ANOVA: Análisis de varianza  
APX: Ascorbato peroxidasa  
ARA: Arabinosa  
ARF:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas  
AU: Ácidos urónicos  
CAD: Cinamil alcohol deshidrogenasa  
CAT: Catalasa  
cDNA: DNA complementario  
Cef: Conductividad eléctrica final  
Cei: Conductividad eléctrica inicial  
CEL: Celulasas  
CRA: Contenido relativo de agua  
CROMA: Saturación del tono  
CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio  
Cyn-3-gluc: Cianidina-3-glucósido  
DDPF: Días después de plena floración  
DEA: Dietanolamina  
DHAR: Deshidroascorbato reductasa  
DMSO: Dimetil sulfóxido  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
DPPH: 2,2-difenil-2-picrilhidrazil  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
END: Endo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanasas  
EROs: Especies Reactivas de Oxígeno  
EXN: Endo-xilanasas  
EXP: Expansinas  
F-C: Reactivo de Folin-Ciocalteu  
FD: Factor de dilución  
G: Glucosa  
GAE: Ácido gálico equivalente  
GAL: Galactosa  
 $\beta$ -GAL:  $\beta$ -L-galactosidasas  
GH: Glutación reductasa  
HG: Homogalacturonano  
HR: Humedad Relativa  
HUE: Ángulo de matriz o tono  
L: Luminosidad  
LTGA: Complejo lignina-ácido tioglicólico  
MDA: Malondialdehído  
MDHAR: Monodeshidroascorbato reductasa

msnm: Metros sobre el nivel del mar  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido  
O: Oeste  
PAL: Fenilalanina amoniasa  
PAR: Radiación fotosintéticamente activa  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PF: Peso fresco  
PG: Poligalacturonasa  
PL: Pectato liasas  
PME: Pectin metil esterases  
PS: Peso seco  
PSA: Pectinas Solubles en Agua  
PSE: Pectinas Solubles en EDTA  
PSH: Pectinas Solubles en Ácido  
PTM: Peso a turgencia máxima  
PVPP: Polivinil-polipirrolidona  
RG1: Rhamnogalacturonano tipo I  
RG2: Rhamnogalacturonano tipo II  
Rha: Ramnosa  
RIA: Residuo Insoluble en Alcohol  
RNA: Ácido ribonucleico  
rpm: Revoluciones por minuto  
S: Sur  
SEM: Microscopía Electrónica por Barrido  
SOD: Superóxido dismutasa  
TBA: Ácido tiobarbitúrico  
TCA: Ácido tricloroacético  
TEA: Trietanolamina  
TSF: Temperatura Superficial del Fruto  
UV: Radiación ultravioleta  
v/v: volumen/volumen  
VE: Volumen de extracción  
W: Watt  
x g: Fuerza centrífuga  
XEH: Xiloglucano endohidrolasa  
XET: Xiloglucano endotransglicosilasas  
XG: Xiloglucano  
XIL: Xilosidasas  
XTH: Xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasas  
 $\alpha$ -L-ARA:  $\alpha$ -L-arabino  
 $\beta$ -D-GAL:  $\beta$ -D-galactano

## RESUMEN

El Alto Valle de Río Negro, en el norte de la Patagonia, es la principal región productora de peras (*Pyrus communis* L.) para exportación de Argentina. La calidad de su producción la sitúa competitivamente en el tercer puesto a nivel mundial. Una de las causas de pérdida de productividad de peras es la fisiopatía asociada a manchas amarillo-marrón en la cara expuesta al sol y que se denominado comúnmente daño por sol. Este síntoma es considerado un defecto en la calidad del fruto y por lo tanto impacta en los rendimientos comerciales. Este desorden fisiológico se desarrolla debido a condiciones de elevada radiación solar y temperatura que provocan un desbalance oxidativo en los tejidos, afectando especialmente, la piel de los frutos que actúa como principal barrera biofísica. A pesar de la importancia de esta fisiopatía en la calidad de la fruta, no existen estudios en pera que profundicen el análisis de posibles cambios en la pared celular como respuesta al estrés por elevada radiación solar. Esta información podría proporcionar nuevos enfoques para comprender los mecanismos subyacentes que promueven el daño por sol y la capacidad de adaptación de los frutos. Agronómicamente, estos conocimientos podrían favorecer el desarrollo de estrategias para mitigar o reducir pérdidas productivas. Por esta razón, el propósito de esta tesis ha sido determinar el efecto del estrés por elevada radiación solar y temperatura sobre la pared celular de la piel de frutos de pera, con distintos niveles de daño por sol al momento de la cosecha y durante la maduración postcosecha. Asimismo, se evaluó el efecto de aplicaciones de calcio como estrategia para reducir la incidencia del daño por sol y determinar sus posibles efectos en el metabolismo de la pared celular frente a situaciones de estrés por elevada radiación solar. Para el desarrollo de la investigación se seleccionó la variedad Beurré D'Anjou, debido a que es la tercera más producida en el Alto Valle, y cuya orientación comercial se destina principalmente al mercado internacional. Por otra parte, es una de las variedades más susceptible al desarrollo de daño por sol debido a su cosecha tardía (primera quincena de febrero). Los ensayos se llevaron a cabo en plantas de pera en plena producción y los resultados presentados corresponden a los frutos recolectados durante la temporada 2018/2019. Los resultados indicaron que el daño por sol genera cambios a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y transcripcional en los frutos. Estas modificaciones expresan adaptaciones a las condiciones desfavorables del entorno, como incremento en la capacidad antioxidante (aumento de metabolitos y enzimas antioxidantes), modificación de la estructura de la pared celular (cambios en la distribución de ramificaciones de pectinas e incremento del contenido de hemicelulosas y de lignina) y aumento de la expresión de genes relacionados con la modificación de la pared celular (GAL; ARF, XET y EXP). Por otro lado, los resultados cuestionan la idea preestablecida de que frutos con daño por sol presentan un avance madurativo. Los frutos con y sin daño por sol no presentaron diferencias en la emisión de etileno durante la maduración y alcanzaron parámetros de madurez similares en el climaterio (periodo asociado a la madurez de consumo). Los frutos con daño

presentaron durante la madurez mayor firmeza de la pulpa y un retraso en la solubilización y pérdida de cadenas laterales en pectinas de la piel. El mayor contenido de sólidos solubles y la disminución de la acidez en los tejidos podrían formar parte de cambios metabólicos necesarios para hacer frente a las condiciones estresantes. Asimismo, se comprobó que el *blush* desarrollado en la mejilla de frutos expuestos al sol corresponde a un tipo de daño por sol que presenta características similares al daño leve, al enmascarar los síntomas presentando tonos rojizos. Por lo tanto, se sugiere que frutos con daño por sol leve y *blush* sean tratados del mismo modo durante el manejo postcosecha. Finalmente, las fertilizaciones con calcio vía suelo redujeron la incidencia del daño por sol leve en pera Anjou, debido al incremento de la capacidad antioxidante en los frutos tratados. Además, promovió mejoras de calidad al atenuar la caída de la firmeza de pulpa y limitar la solubilización de las pectinas en la piel de los frutos.

## ABSTRACT

The Alto Valle of Río Negro, in northern Patagonia, is the main production area of pears (*Pyrus communis* L.) for export in Argentina. The quality of its production ranks it third in the world in terms of competitiveness. One of the causes of productivity loss in pears is sunburn, which is considered a quality defect in the fruit and therefore affects the commercial yield. This physiological disorder develops under conditions of high solar radiation and temperature, which cause an oxidative imbalance in the tissues, particularly in the skin of the fruit, which acts as the main biophysical barrier. Despite the relevance of this disorder on fruit quality, there are no studies in pear that have analysed possible cell wall changes in response to high solar radiation stress. This information could provide new approaches to understand the underlying mechanisms promoting sunburn and fruit adaptability. From the agronomical point of view, this knowledge could facilitate the development of strategies to mitigate or reduce yield losses. The objective of this work was to determine the effect of high solar radiation stress and temperature on the skin cell wall of pear fruit with different sunburn levels at harvest and during post-harvest ripening. The effect of calcium applications as a strategy to reduce the incidence of sunburn was also evaluated and its possible effects on cell wall metabolism under high solar radiation stress were determined. The Beurré D'Anjou variety was chosen for this study because it is the third most produced variety in the Alto Valle and its commercial destination is almost exclusively the international market. On the other hand, it is one of the varieties more susceptible to sunburn due to its late harvest (first half of February). The trials were carried out on pear trees in full production and the results presented correspond to fruit harvested during the 2018/2019 season. The results showed that sunburn induces morphological, physiological, biochemical and transcriptional changes in the affected fruits. These changes express adaptations to adverse environmental conditions, such as increased antioxidant capacity (enhanced antioxidant metabolites and enzymes), modification of cell wall structure (changes in pectin branching distribution and increased hemicellulose and lignin content) and increased expression of genes related to cell wall modification (GAL; ARF, XET and EXP). On the other hand, the results challenge the established idea that sun-damaged fruits show a ripening advance. Fruits with and without sunburn did not show differences in ethylene emission during ripening and reached similar maturity parameters at the climacteric (period associated with consumption maturity). In addition, there was a delay in solubilization and loss side chains of pectin in the skin and higher flesh firmness in the damaged fruit during ripening. Higher soluble solids content and lower tissue acidity may be part of the metabolic changes necessary to cope with stressful conditions. It was also found that the *blush* developed on the cheek of sun-exposed fruit corresponds to a type of sunburn that has similar characteristics to mild damage, masking the symptoms by presenting reddish tones. It is therefore

suggested that fruit with *blush* and mild sunburn should be treated in the same way during post-harvest handling. Finally, soil calcium fertilization reduced the incidence of mild sunburn in Anjou pears by increasing the antioxidant capacity of the treated fruit. It also promotes quality improvements by reducing the loss of flesh firmness and limiting the pectin solubilization in the skin.

### INTRODUCCIÓN GENERAL

#### 1. El cultivo de la pera en Argentina

En las décadas recientes se ha intensificado y diversificado la comercialización de frutas frescas. En este contexto, el mercado de productos frescos tradicionales como es el caso de peras ha incrementado su volumen y se ha extendido a nuevos destinos. Asimismo, las exigencias de la demanda internacional han orientado la búsqueda de características organolépticas deseables por el consumidor.

Esta dinámica impone la necesidad de obtener una producción de frutos de alta calidad cuyas características cualitativas se adecuen crecientemente a los requisitos de los mercados consumidores. La producción de peras para exportación no escapa a estos requerimientos. Argentina es uno de los principales productores-exportadores, concentrándose la producción de peras en el norte de la Patagonia, ocupando un lugar relevante entre los productos primarios que nuestro país coloca en el exterior.

La importancia nacional y regional de la producción de peras orientada hacia el mercado externo, implica responder a las cambiantes exigencias de la demanda mundial en cuanto a variedad, tamaño, color, condiciones sanitarias, presentación, entre otras. Es por eso, que el daño por sol, al ser considerado un defecto en la calidad del producto, impacta en la colocación internacional de las peras argentinas.

#### 1.1. Relevancia productiva y económica

En la producción de árboles frutales, la pera se sitúa como el quinto fruto más producido a nivel mundial, siguiendo a la banana, la manzana, la naranja y la uva (FAOSTAT, 2024). Asimismo, el consumo de peras y manzanas ocupan conjuntamente el tercer lugar en el mercado internacional de fruta fresca, con un total de 46.600 millones de kilogramos, solo detrás de la banana y los cítricos (Orús, 2023). En el año 2022, la producción mundial de peras superó los 26 millones de toneladas, siendo China el principal productor con 19 millones de toneladas (FAOSTAT, 2024). El 81 % de la producción mundial se destina a consumo en origen, 8 % al comercio entre naciones (importación y exportación) y 11 % al procesamiento industrial (Calvo, 2016).

Argentina es el cuarto productor (0,6 millones t) y tercer exportador (0,3 millones t) de peras a nivel mundial (FAOSTAT, 2024), presentando una distribución del destino del producto muy diferente al contexto mundial, con 53 % de su producción orientada a exportación, 31 % a industria y sólo 16 % al mercado interno (Dansa, 2018).

En relación con el comercio internacional argentino, el sector frutícola constituye el 2,8 % del total de las exportaciones, dentro del cual el complejo de peras

y manzanas representa el 0,4 % del total en este rubro. Las peras argentinas destinadas a exportación representan el 68 % del complejo superando las exportaciones de manzanas (INDEC, 2021).

El 90 % de la producción de peras en Argentina se concentra en los valles irrigados de los ríos Limay, Neuquén y Negro de las provincias Río Negro y Neuquén (Dansa, 2018), conocido locamente como “Alto Valle”, denominación con la cual se hará referencia a esta área productiva en adelante. Esta producción frutícola es de fundamental importancia en la economía regional de ambas provincias, representando la pera el 70 % de las exportaciones de Río Negro y el 30 % en Neuquén. A estas provincias le sigue Mendoza con menos del 10 % restante de la producción nacional.

La fruta destinada a exportación se produce en su totalidad en el Alto Valle, donde los productores y las empresas frutícolas han implementados normas internacionales de calidad posicionando sus productos en el mercado exterior. A escala regional, la cadena productiva de pera y manzana está compuesta en la actualidad por 1646 productores, 180 frigoríficos y más de 220 plantas de empaque capaces de procesar, almacenar y acondicionar la fruta para sus distintos destinos (López Barrios, 2020).

La producción argentina de pera se ve favorecida por las condiciones agroclimáticas de la región, otorgando calidad y sanidad a los productos, además de presentar una producción contra estación respecto al hemisferio norte donde se encuentran los principales consumidores (Malaspina y col., 2015; Jaime de Pablo y Giacinti Battistuzzi, 2014). En la actualidad, los mercados más importantes de las peras argentinas son Brasil, Rusia, Estados Unidos y la Unión Europea, encabezado por Italia.

### **1.2. Características edafo-climáticas del Alto Valle**

La región productiva del Alto Valle abarca la unidad constituida por los valles inferiores de los ríos Neuquén y Limay y por el valle superior del río Negro (Figura 1), en el norte de la Patagonia. En la actualidad, cuenta con 38.682 ha en producción (SENASA, 2021), extendiéndose entre las localidades de Senillosa sobre la margen norte del río Limay, Añelo sobre el río Neuquén, hasta la localidad de Chichinales sobre el río Negro (Steimbregger, 2008).

Los suelos son de origen aluvial con marcada heterogeneidad. Presentan distintas clases texturales, con una velocidad de infiltración que varía de media a alta. El perfil no presenta gran desarrollo edáfico y suele ser profundo. Los suelos presentan material calcáreo, escasa materia orgánica y son carentes de nitrógeno, zinc, hierro, y magnesio, deficiencias que pueden observarse en los montes frutales si no son adecuadamente abonados.

## INTRODUCCIÓN

Esta región se considera árida a semiárida, mesotermal, con lluvias deficientes durante todo el año, según clasificación de Thornthwaite (Rodríguez y Muñoz, 2022). La temperatura media anual es de 16,5 °C, con temperaturas máximas medias que varían entre 13,4 a 30,7 °C y mínimas medias de -0,7 °C a 13,4 °C, con gran amplitud térmica. Los valores extremos de temperaturas se registran en los meses de diciembre, enero y febrero con un máximo de 40,9 °C, y en los meses de mayo, junio, julio y agosto con un mínimo de -12,9 °C.

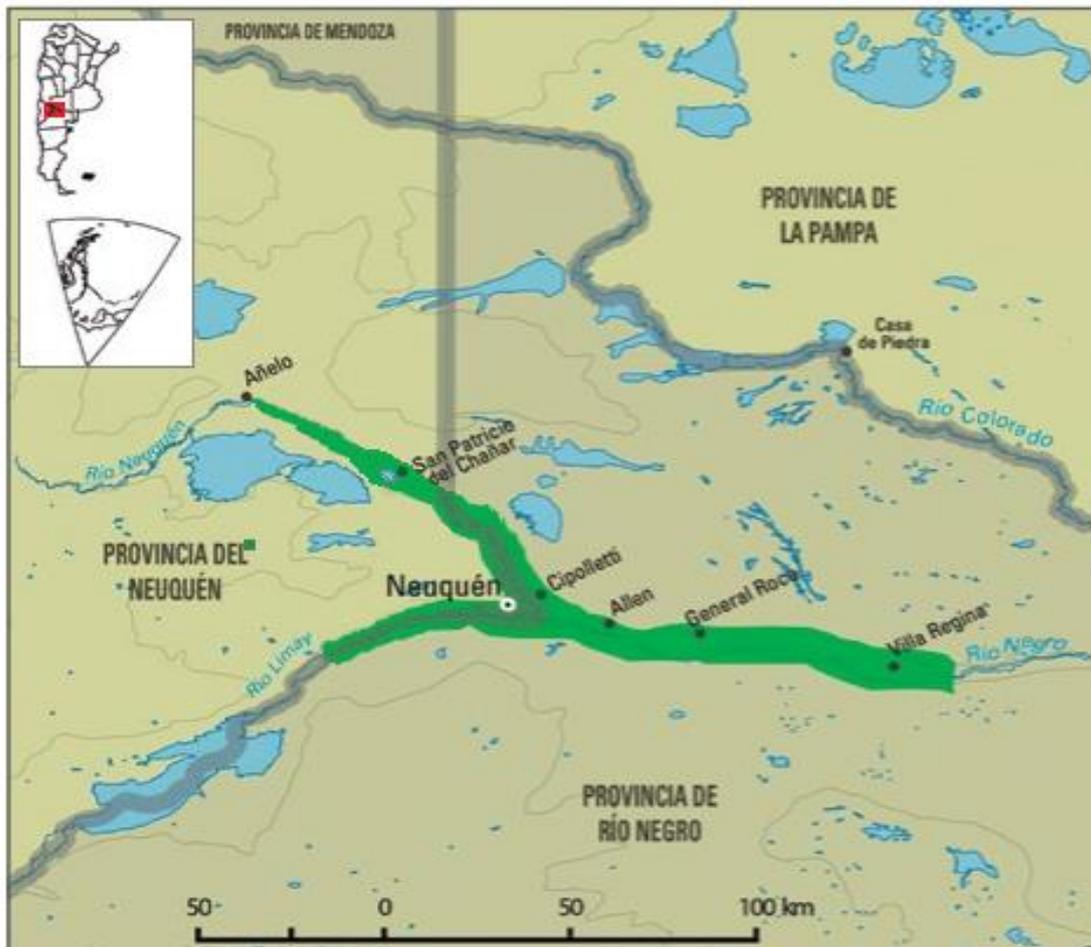


Figura 1. Localización del área productiva “Alto Valle” en el norte de la Patagonia, Argentina.

El período libre de heladas medio es de 190 días. La fecha media de ocurrencia de la primera helada es el 14 de abril, mientras que la fecha media de ocurrencia de la última helada es el 6 de octubre, con eventos extremos registrados en los meses de marzo y noviembre, respectivamente.

La humedad relativa (HR) media de la región en el período primavera estival es de 65 %, y en invierno alcanza los valores máximos cercanos a 90 %. La precipitación media anual acumulada es de 227 mm, concentrándose durante otoño y primavera. Las condiciones pluviométricas no son aptas para el desarrollo de cultivos en secano,

surgiendo esta región productiva por la intervención del hombre mediante la creación y construcción de un sistema integral de riego que abastece de agua a los frutales. Estas características climáticas son favorables desde el punto agronómico, ya que reducen la incidencia de enfermedades (Sosa y Lutz, 2020).

Los vientos predominantes provienen de los cuadrantes oeste y sudoeste, con mayor frecuencia en primavera y verano. Se caracterizan por valores máximos de 50 km h<sup>-1</sup> con ráfagas que superan los 90 km h<sup>-1</sup>. Estas condiciones hicieron necesario el uso de cortinas forestales u otros sistemas de protección en los cultivos.

La radiación global en la región alcanza valores máximos de 1.260 W m<sup>-2</sup>, en días con cielo despejado. Los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero registran los valores más altos de radiación solar. El fotoperíodo va de un mínimo de 9,5 h en el mes de junio a un máximo de 14,5 h en diciembre.

Las características de radiación solar y temperaturas primavero-estivales de la región, someten a la actividad frutícola a condiciones de estrés por elevada radiación y temperaturas. El índice térmico utilizado para caracterizar cada temporada en función del potencial grado de afección debido al daño por sol en la producción, es la acumulación de horas de temperaturas medias superiores a 29 °C entre los meses noviembre a febrero. Valores inferiores a 70 h se asocian con daño leve, de 80 a 150 h con daño moderado y superiores a 160 h con daño grave. En el Alto Valle los valores medios del período 2003-2019 superan las 330 horas acumuladas, reflejando que el daño por sol es una problemática importante en los montes frutales (Rodríguez y Muñoz, 2022). Esta situación se ve agravada por el aumento de temperaturas máximas absolutas para el periodo 1970-2019 y el incremento de la ocurrencia de fenómenos climáticos extremos, asociados con el cambio climático, que afecta negativamente la agricultura (Chaudhry y Sidhu, 2022; Parajuli y col., 2019; Rodríguez y Muñoz, 2006).

### 1.3. Variedades de peras cultivadas en la región

Las variedades de peras que se producen en el Alto Valle son principalmente de origen europeo surgidas de la especie *Pyrus communis* L, comúnmente conocida como pera europea. Se destacan principalmente tres variedades: Williams Bon Chrétien (denominada Williams o Bartlett) con la mayor superficie productiva (40,5 %), seguida por Packham's Triumph (29,2 %) y Beurré D'Anjou (denominada comúnmente Anjou) (14,7 %). El 15,6 % de la superficie restante corresponde a distintas variedades, siendo algunos ejemplos: Abate Fetel, Red Bartlett, Beurré Bosc, Beurré Giffard, Red Anjou, Winter Bartlett, Forelle, entre otras (SENASA, 2021).

En la región, las distintas variedades se encuentran injertadas sobre portainjertos de semilla (franco) y las plantaciones pueden ser puras (una sola variedad) o mixtas (variedades compatibles), presentando estas últimas la ventaja de maximizar la productividad y calidad de los frutos.

Los montes frutales de peras presentan densidades de plantación media a alta (1000 a 1666 plantas ha<sup>-1</sup>) con marcos de plantación de 4 m entre filas y de 1,5 a 2,5 m entre plantas, y con una altura máxima de 5 m. Predominan sistemas de conducción en espaldera. La tendencia a plantaciones de alta densidad con estructuras abiertas de poco follaje con el fin de aumentar los rendimientos y mejorar la calidad de los frutos incrementó el riesgo a una exposición excesiva a la luz solar de las plantas.

El sistema de riego empleado mayoritariamente es por inundación del espacio entre las filas, denominado riego por manto, el cual presenta una eficiencia del 45 al 55 %. La disponibilidad de agua en el Alto Valle es limitada, por lo cual se aplica un sistema de turnos de riego que presenta inconvenientes para abastecer a los cuadros y mantener el estado hídrico adecuado de los frutales. Esta situación genera una distribución irregular del agua en los montes frutales, que se ve intensificada en el período estival por el incremento de la evapotranspiración favoreciendo situaciones de estrés hídrico. En la actualidad, las nuevas plantaciones de variedades competitivas y en alta densidad incorporan sistemas de riego mecanizados como goteo o micro-aspersión.

La cosecha de la pera se inicia en el mes de enero con la variedad Williams y finaliza en el mes de marzo con las variedades Winter Bartlell y Winter Nelly (Benítez, 2001). Las condiciones de alta radiación y elevada temperatura durante el período estival en las cuales se desarrollan los frutos hasta su cosecha promueven exposiciones crónicas de días o semanas con temperaturas ambientales superiores a 30 °C, generando situaciones de estrés abiótico que afectan la productividad del cultivo.

### **1.4. Características generales de los frutos de pera**

Los frutos de pera se clasifican botánicamente como un tipo de pseudo-fruto denominado pomo. Éste se caracteriza por presentar un receptáculo engrosado y carnoso (parte comestible) que recubre y contiene el verdadero fruto, constituido por los carpelos cartilagosos dentro de los cuales se ubican las semillas (Quinet y Wesel, 2019).

Particularmente, los frutos de peras europeas se caracterizan por presentar forma piriforme, siendo más alargada u ovoide según el cultivar. En la Tabla 1 se presentan distintas variedades y las características de sus frutos.

Las peras presentan distintos colores de piel (verde, amarillo, rojo y/o marrón) característico de cada variedad, el cual puede cambiar o no durante la maduración del fruto. Algunas variedades desarrollan durante el crecimiento de los frutos, una coloración rojiza sobre la piel de la cara expuesta a luz solar. Esta mancha se denomina *blush* y en variedades de piel verde como Williams y Anjou es considerado un atributo comercial positivo (Ministerio de Agricultura, 2018). La pulpa es de color blanco y/o blanco amarillento, de textura firme y poco jugosa en madurez fisiológica

evolucionando a texturas mantecosas, suaves y fundentes cuando maduran adecuadamente.

**Tabla 1. Características de los frutos de algunas de las variedades de peras cultivadas en el Alto Valle.**

Variedad	Características generales
	Williams Piriforme con cintura definida. Tamaño mediano a grande. Pedúnculo mediano. Piel fina y de color verde claro que vira a amarillo al madurar, con lenticelas visibles. A veces con una mejilla rojiza en la cara expuesta al sol.
	Packham's Triumph Piriforme de base ancha y corta. Tamaño mediano a grande. Pedúnculo largo y curvo. Piel verde claro que cambia a amarillo en la madurez, con lenticelas oscuras. A veces con una mejilla rojiza en la cara expuesta al sol.
	Anjou Piriforme corto y globoso de base ancha. Tamaño mediano a grande. Pedúnculo corto y grueso. Piel fina de color verde claro con lenticelas visibles. Cambia a tonos verdes amarillos al madurar. A veces con una mejilla rojiza en la cara expuesta al sol.
	Abate Fetel Piriforme alargado. Tamaño grande. Pedúnculo corto, grueso y recto. Piel fina y lisa de color verde claro a amarillo, con numerosas lenticelas.
	Red Bartlett Similar a Williams, con pedúnculo más corto. Piel lisa parcialmente cubierta de rojo violáceo.
	Red D'Anjou Similar a Anjou, pero más pequeño. Piel roja con un suave rallado.
	Fórrele Piriforme. Tamaño mediano. Pedúnculo ligeramente curvo. Piel suave, lisa de color verde amarillento y salpicada de rosa en la cara expuesta al sol, con lenticelas numerosas y notables.

Extraído de Benítez (2001). Fotos cortesía de Ing. Agr. (M Sc) Laura Vita.

La pera es un fruto climatérico, que almacena almidón y presenta un pico de respiración asociado al incremento de la tasa de producción de etileno. Pero a diferencia de otros frutos climatéricos como la manzana, las peras europeas presentan distintos grados de resistencia a la maduración en el momento de la cosecha, requiriendo un período de refrigeración y/o exposición a etileno para madurar adecuadamente (Villalobos-Acuña y Mitcham, 2008). La exposición a bajas temperaturas estimula la síntesis auto-catalítica de etileno, y ésta, a su vez, la maduración en las peras (Abeles y col., 1992). Este período puede ser de al menos unos días a varios meses dependiendo del cultivar y de la firmeza del fruto como de la temperatura y/o concentración de etileno a la cual se someten. Para una adecuada maduración de los frutos, Villalobos-Acuña y Mitcham (2008) reportaron en pera Williams con firmezas entre 76 a 84 N, la necesidad de exposición a -1 °C por 14 a 21 días, mientras para pera Anjou con firmezas entre 62 a 67 N, el requerimiento fue de 60 días.

La maduración adecuada de las peras se define al alcanzar texturas fundentes, jugosas y mantecosas. Lograr un producto que presente la calidad estética y comestible adecuada depende de un gran número de factores precosecha, que incluyen los manejos del monte frutal (riego, nutrición, podas, sanidad, etc.) como las condiciones climáticas de cada temporada y aquellos factores inherentes al cultivar. Una vez cosechado el fruto, la calidad no puede incrementarse y los manejos que se realicen postcosecha (acondicionamiento, almacenamiento, refrigeración, embalaje) se emplean para minimizar la pérdida de calidad y asegurar una adecuada maduración y vida útil del producto hasta su consumo.

### **2. Daño por sol en frutos de pera**

El daño por sol es un tipo de fisiopatía causado por la exposición a la luz solar (Chelli-Chaabouni, 2014; Colavita y col., 2011) común en distintos productos fruti-hortícolas como tomate, uva, manzana, pera, frutilla, palta (Gambetta y col., 2021; Munné-Bosch y Vincent, 2019; Torres y col., 2006; Polito y col., 2002; Schrader y col., 2001; Wünsche y col., 2001; Woolf y col., 1999). El síntoma en sí es el resultado de un proceso oxidativo que es promovido por el exceso de luz solar incidente y absorbido por el tejido. Este proceso genera compuestos tóxicos y altamente reactivos que atacan indistintamente los componentes de la célula causado daño oxidativo (Chen y col., 2008). Generalmente, el síntoma de daño por sol se observa como una decoloración superficial del área afectada por la pérdida de pigmentos clorofílicos y antocianicos, que puede provocar necrosis cuando las condiciones de exposición son severas y/o prolongadas.

La información preexistente de este daño en los distintos cultivos es escasa, contrastando con la manzana, donde se han descrito con precisión los síntomas y

factores impulsores de diferentes tipos de daños por sol (Racskó y Schrader, 2012). Esto se debe, posiblemente, a la mayor importancia de este fruto respecto al consumo y su mercado a nivel mundial (McClymont y col., 2016). En las regiones productivas de manzana se han estimado pérdidas por esta fisiopatía que varían de 10 a 50 % de la producción, dependiendo de la variedad, edad de la planta y sistema de conducción. En el Alto Valle, los valores de pérdida por daño por sol al ingreso de la planta de empaque en manzanas varían entre 25 a 55 % (Colavita, 2008).

En el cultivo de pera, el síntoma de daño por sol se caracteriza, al igual que en las manzanas, por la decoloración del área afectada desarrollando manchas de tonos verde amarillentos a amarillos amarronados según la severidad del daño. Particularmente, en algunas variedades de pera de piel verde se puede observar el desarrollo de manchas con tonos rojizos sobre el área afectada por la intensa radiación solar (*blush*) que pueden enmascarar los síntomas de niveles de daño por sol leves (McClymont y col., 2016). Los reportes de pérdidas por daño por sol en peras son escasos. En el estado de Washington (USA), entre el 8 al 12 % de frutos de pera son descartados durante la clasificación en empaque por presentar síntomas de daño por sol (Hansen, 2005). En Australia, las pérdidas anuales de pera Williams por daño por sol varían entre un 10 a 15 % (Lal y Sahu, 2017; Lolicato, 2011). Mientras en Argentina, en el Alto Valle, las pérdidas de pera por daño por sol varían entre un 30 a 50 % según la especie, variedad y condiciones climáticas de la temporada (Vita y Colavita, 2018), destacándose en peras las variedades Packham's Triumph y Anjou como las más propensas a sufrir este tipo de fisiopatía (Portalfruticola.com, 2011). Los valores notoriamente superiores de porcentajes de frutos afectados por síntomas de daño por sol en la región del Alto Valle pueden deberse a la mayor radiación UV-B incidente en el hemisferio sur debido al menor espesor de la capa de ozono, que promueve el desarrollo de daño por sol a temperaturas superficiales de los frutos (TSF) menores (Felicetti y Schrader, 2009a).

Sin embargo, en Argentina el contexto productivo y económico de estas dos especies frutícolas es distinto al mundial. En la actualidad, la producción y exportación de peras ha adquirido mayor relevancia económica que la de las manzanas. Asimismo, la exportación de la pera argentina depende de la calidad, y los síntomas de daño por sol altera la estética del producto afectando directamente los volúmenes de fruta apta para el mercado exterior.

Las condiciones climáticas de la región del Alto Valle durante el período estival junto a los sistemas de conducción empleados y los manejos culturales sobre los perales que buscan una mejor penetración de la luz en la canopia, predispone el desarrollo de daño por sol sobre la superficie de los frutos. Asimismo, los incrementos de temperaturas anuales y los eventos extremos asociados al cambio climático presentan un escenario sustancialmente más crítico en las producciones de peras, lo que torna más relevante el estudio de esta fisiopatías en la región.

### 2.1. Factores incidentes en el desarrollo del daño por sol

La luz es un factor ambiental esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo el principal proveedor de la energía para todos los procesos metabólicos. Sin embargo, el exceso de luz puede generar un entorno desfavorable para las plantas al promover la formación de intermediarios altamente reactivos y subproductos potencialmente dañinos en sus tejidos (Woodrow y col., 2012; Müller y col., 2001).

El efecto del exceso de luz sobre las plantas se puede descomponer en dos factores principales que desencadenan el daño por sol: el estrés lumínico y el estrés calórico/térmico. Ambos factores combinados promueven el desequilibrio del estado oxidativo de las células generando daño en los tejidos afectados.

El estrés lumínico ocurre cuando la cantidad de radiación (flujo de fotones) que llega a los tejidos supera la capacidad del sistema fotosintético para metabolizar y convertir la luz en energía química, y los mecanismos de disipación y control del exceso de energía no alcanzan para reducir esta sobrecarga en el sistema. Este exceso de energía se traduce en un incremento de la producción de electrones, alterando el estado redox celular y desencadenando daño fotooxidativo en los cloroplastos (Taiz y Zeiger, 2006a).

Por otro lado, la energía lumínica puede ser transformada en energía fotoquímica y disipada como calor y fluorescencia. Estos tres procesos ocurren simultáneamente, y el incremento de alguno afecta la actividad de otro (Müller y col., 2001). Al verse afectada la tasa fotosintética por el daño fotooxidativo, la energía absorbida incrementa el movimiento de las moléculas aumentando la temperatura interna del tejido. Asimismo, la radiación infrarroja o térmica colabora directamente en este proceso. La temperatura del fruto es una función de la temperatura del aire y la transferencia de calor por radiación. La exposición directa al sol aumenta la temperatura de la superficie de la fruta (TSF) entre 10 a 15 °C por encima de la temperatura del aire en el lado expuesto. Cuando los incrementos de temperatura en los tejidos superan el umbral vital máximo, las células se encuentran en estrés por calor. Esta situación promueve un amplio espectro de daño celular como desnaturalización y agregación de proteínas y cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana, lo que posteriormente altera el equilibrio de los procesos metabólicos (Wu y col., 2018). Si el estrés por calor continúa y las temperaturas superan el umbral crítico de supervivencia (temperatura máxima letal), el daño en las células es letal.

La elevada radiación solar y altas temperaturas superficiales en los frutos se han establecido como los factores predominantes en el desarrollo del daño por sol (Morales-Quintana y col., 2020; Munné-Bosch y Vincent, 2019; McClymont y col., 2016; Racskó y Schrader, 2012). La incidencia y gravedad del daño en los frutos

depende de una compleja interacción de estos factores. Sin embargo, los síntomas resultantes de daño por sol pueden verse agravados por otros factores. La condición bioquímica, fisiológica y morfológica del fruto participa en el nivel de incidencia y gravedad del daño por sol. Esta condición depende de la especie, el cultivar, el estado fenológico, la adaptación a condiciones edafoclimáticas, entre otros factores. En este sentido, se considera que las peras son menos susceptibles al daño por sol que las manzanas (McClymont y col., 2016), como también que los cultivares de piel roja presentan mayor capacidad de foto-protección que los cultivares verdes (Li y col., 2008; Merzlyak y Chivkunova, 2000). Los frutos desarrollados en el exterior de la canopia presentan características bioquímicas y fisiológicas que suponen una mejor adaptación a condiciones de luz y temperatura que los desarrollados en la sombra (Serra y col., 2019). Asimismo, el estado general del cultivo puede contribuir a la tolerancia o susceptibilidad del desarrollo de esta fisiopatía; árboles debilitados por condiciones de déficit hídrico, nutricional o sanitario presentan umbrales de tolerancia reducidos frente a factores estresantes, aumentando la probabilidad de incidencia y gravedad de daño por sol.

Dentro de la planta, la posición del fruto y el estado de desarrollo en el cual se encuentra determinan mayor predisposición a la aparición de daño por sol. Los sistemas de conducción abiertos, con podas intensas reduciendo el follaje, orientación inadecuada de las filas y otras labores que incrementan la penetración de luz en la planta en busca de mejorar el tamaño y calidad de los frutos, aumentan el riesgo de daño por sol (Musacchi y Serra, 2018; Serra y col., 2018). Además, se suman otros factores climáticos, como la baja humedad relativa (HR) o los fuertes vientos que modifican la posición de hojas y frutos favoreciendo el desarrollo de síntomas de daño por sol en los montes frutales. Asimismo, el cambio climático está afectando seriamente la producción agrícola en el mundo, donde regiones vulnerables caracterizadas por climas secos son sometidas a incrementos de la temperatura promedio anual y disminución de las precipitaciones, aumentando la frecuencia de estrés abiótico en árboles y frutos debido a eventos impredecibles como olas de calor y sequías invernales (Parajuli y col., 2019; Wand y col., 2008). Muchas de las regiones productoras de peras en el mundo están sufriendo estos cambios en las condiciones ambientales afectando la calidad de los frutos y los rendimientos productivos.

### **2.2. Daño oxidativo y sistema de defensa**

El daño oxidativo en las plantas es promovido por distintos factores de origen biótico (patógenos y senescencia) como abióticos (elevada radiación, temperaturas extremas, anegamiento, sequía, salinidad, herbicidas, polución) que alteran el metabolismo celular y desencadenan el desbalance redox intercelular. Este daño resulta de la producción y acumulación de especies químicas altamente reactivas,

tóxicas y de vida relativamente corta denominadas Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).

Las EROs son capaces de atacar y destruir biomoléculas vitales indistintamente, causando peroxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas y mutaciones y ruptura de ADN (Suzuki y col., 2012). Estas especies pueden surgir por cambios en la estructura electrónica de la molécula de oxígeno ( $O_2$ ), formando oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), o por la transferencia de uno, dos o tres electrones formando el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), respectivamente (Mittler, 2002).

En las plantas, las EROs surgen como subproductos de distintos procesos metabólicos esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal, como la fotosíntesis, respiración, foto-respiración, entre otros. Se generan en distintos compartimientos celulares como los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplasmático, membranas plasmáticas e incluso en la pared celular (Gill y Tuteja, 2010).

Bajo condiciones normales en el interior de las células, la concentración de EROs se mantiene en niveles estables y no tóxicos en los distintos compartimientos celulares. Este equilibrio se logra gracias a un sistema antioxidante complejo, que regula la producción y eliminación de EROs de manera efectiva. Sin embargo, durante situaciones de estrés, la producción de EROs en las células aumenta significativamente, pasando de  $240 \mu M s^{-1} O_2^{\bullet-}$  a  $720 \mu M s^{-1} O_2^{\bullet-}$ . Este aumento también se observa en el apoplasto, donde el contenido puede incrementarse hasta cuatro veces su valor normal (Mittler, 2002; Novaković et al., 2018). Cuando esta producción acelerada de EROs, promovida por factores externos como la luz solar, no alcanza a ser contrarrestada por el sistema defensivo de la célula, se desencadena el ataque oxidativo inespecífico sobre los componentes celulares. Este desbalance afecta directamente las funciones metabólicas y deteriora la integridad de la célula conduciendo a la muerte celular (Gill y Tuteja, 2010).

Por otro lado, lejos de su actividad destructiva, las EROs son mensajeros secundarios de diversos procesos relacionados al crecimiento, desarrollo, senescencia y muerte celular, así como en procesos de transferencia de información desde el medio exterior. Dentro de esta última función las EROs participan en procesos de respuesta de aclimatación y tolerancia celular a tensiones ambientales (Hasanuzzaman y col., 2020; Sharma y col., 2012; Mittler y col., 2011). Estas situaciones destacan la función dual de los EROS en las células, siendo por un lado subproductos nocivos para el metabolismo celular que pueden conducir a daño y muerte celular cuando su producción se descontrola y, por el otro, elementos esenciales para activar una respuesta temprana de defensa y/o adaptativa frente a factores externos desfavorables (Hasanuzzaman y col., 2012; Woodrow y col., 2012).

El sistema de defensa de las plantas que permite controlar las concentraciones de las EROs se conforma de una compleja maquinaria antioxidante constituida por enzimas y compuestos no enzimáticos de bajo peso molecular. Estos en conjunto eliminan y reducen la acumulación de EROs y protegen a los componentes celulares de la oxidación.

Los principales sistemas antioxidantes enzimáticos de las células son el ciclo agua-agua, el ciclo ascorbato-glutación, el ciclo glutación peroxidasa y la vía de las catalasas (Mittler, 2002). En estos intervienen distintas enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutación reductasa (GH), encargadas de transformar las EROs en compuestos estables y no tóxicos. Estas enzimas se encuentran distribuidas en distintos compartimientos celulares (cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, plastidios) como también en el citosol (Gill y Tuteja, 2010).

Las células cuentan con distintos compuestos antioxidantes no enzimáticos que participan en la regulación de las EROs bajo distintas funciones. Algunas de estas sustancias permiten regenerar la actividad de las enzimas antioxidantes como son el ascorbato y el glutación. Otras sustancias son capaces de secuestrar EROs actuando como antioxidantes. En este grupo se destacan los  $\alpha$ -tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos (Gill y Tuteja, 2010). Los  $\alpha$ -tocoferoles son compuestos antioxidantes hidrofóbicos que se encuentran asociados a las membranas. Su localización permite reaccionar con EROs y radicales peroxi-lipídicos frenando la peroxidación de lípidos. Los carotenoides son antioxidantes eficaces en la eliminación de EROs y elementos fotoprotectores al filtrar parte de la luz azul, verde y UV. A su vez, aumentan la termotolerancia de las células al modificar la fluidez de membranas. Los compuestos fenólicos incluyen flavonoides (flavonoles, flavan-3-oles y antocianinas) y sustancias no flavonoides. Se localizan en la cutícula, epidermis e hipodermis. Participan en la fotoprotección de los tejidos al absorber y filtrar radiación fotosintéticamente activa (PAR) y UV, considerándose la primera línea de defensa frente al estrés lumínico. Además, son compuestos con capacidad antioxidante, secuestrando y eliminando EROs (Gambetta y col., 2021).

Paralelamente al proceso de eliminación y desintoxicación de EROs por los mecanismos antioxidantes, la señalización de cambios desfavorables en el ambiente desencadena cambios en la regulación génica de las células. La activación de la expresión de genes diferenciales sensibles al estrés conduce a cambios y reordenamientos del metabolismo celular con el objetivo de proteger y adaptarse a las condiciones externas. Estos procesos de control y reparación de daños desencadenados por el evento estresante continúan luego de éste. Si el daño oxidativo no provocó la muerte celular, la regulación génica promueve cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos resultando en la adaptación y supervivencia de los tejidos

afectados. Esto permite a las plantas fortalecer su sistema de defensa y adquirir tolerancia a futuros sucesos estresantes. Estos cambios reducen la posibilidad de daño oxidativo al presentar un sistema de defensa antioxidante incrementado y evitar la producción de EROs por la modificación de distintos componentes celulares (Singh y col., 2019).

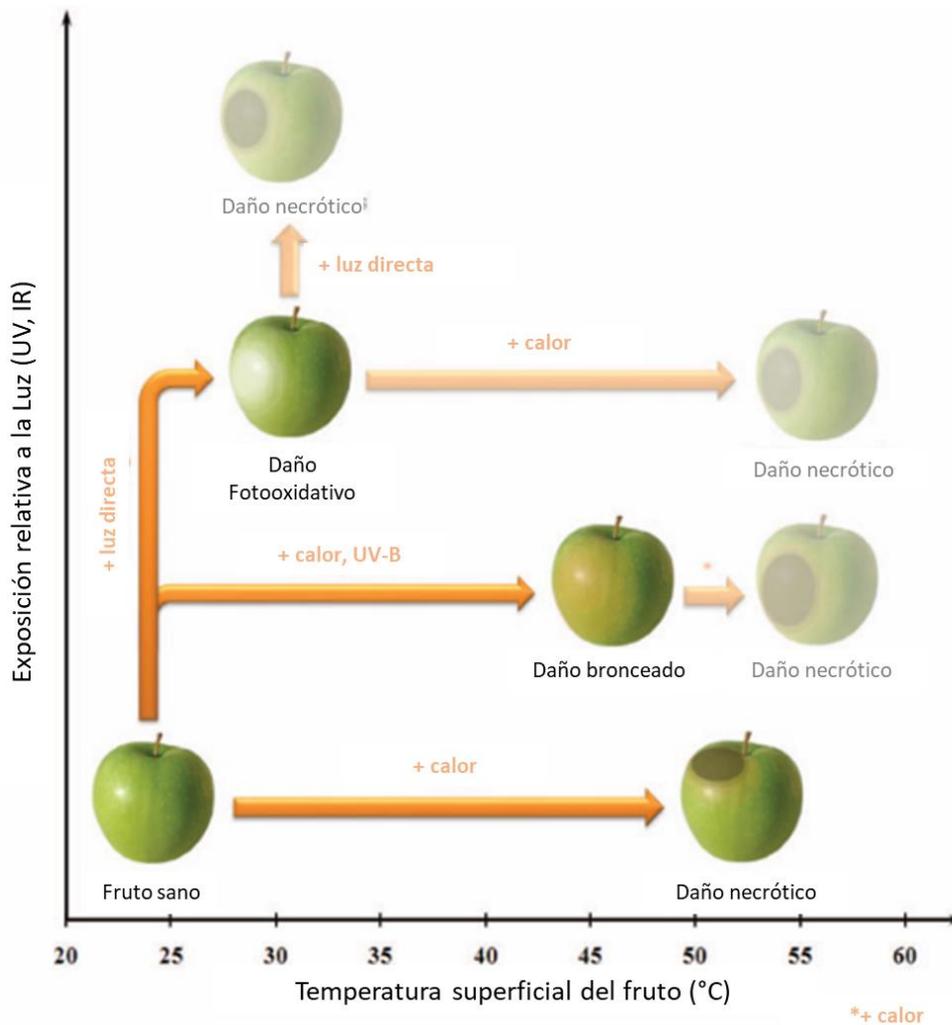
### **2.3. Caracterización de daño por sol en frutos**

El daño por sol es un trastorno fisiológico que se desarrolla sobre los tejidos de la cara expuesta como resultado de la incapacidad del fruto de mitigar el daño oxidativo promovido por la elevada radiación y temperatura. Es considerado un defecto en la apariencia de los frutos que afecta los primeros milímetros de la piel, a excepción de daños severos (Racsó y col., 2005). Resumidamente, el daño por sol afecta principalmente la piel de los frutos alterando bioquímica, fisiológica y morfológicamente sus componentes (cutícula, capa epidérmica e hipodermis) (Gambetta y col., 2021).

En los frutos, el daño por sol se visualiza como un área decolorada de la piel debido a la pérdida de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, principalmente clorofilas y antocianinas. La decoloración de la piel resulta del efecto directo de la radiación solar al promover la fotooxidación de las clorofilas de los cloroplastos. Si la exposición a la radiación solar se mantiene, la temperatura de los tejidos afectados se incrementa alterando la integridad de las membranas y el funcionamiento de las proteínas, lo cual incrementa el daño oxidativo. Cuando la TSF supera los 40 °C, el síntoma de daño por sol se manifiesta como una mancha bronceada. El oscurecimiento de la mancha reduce el albedo de la superficie incrementando la absorción de la radiación solar y por lo tanto el incremento de la TSF, y el área dañada puede avanzar a tonos marrones oscuros. El estadio final del daño por sol resulta en un área necrótica debido a la muerte de las células del tejido, que puede incluso profundizarse en el tejido parenquimático (pulpa). Este nivel de daño se alcanza cuando las temperaturas en el tejido superan los 50 °C.

En manzanas, Schrader y col., (2001) describieron dos tipos de daño por sol en los frutos, daño por sol tipo necrótico y tipo bronceado (Figura 2). El daño por sol necrótico se manifiesta como una mancha de color marrón oscuro a negro en la superficie de la cara expuesta al sol. Este daño ocurre cuando el fruto alcanza en su superficie temperaturas superiores a 50 °C durante al menos 10 min, conduciendo a la muerte celular de los tejidos. Si bien el daño resulta de la exposición a la radiación solar, la necrosis es inducida principalmente por estrés térmico. El daño de sol tipo bronceado se presenta como una mancha amarilla a marrón sobre el área expuesta al sol. Este daño se desarrolla como resultado conjunto de la incidencia de la radiación solar y el incremento de la TSF. Los frutos expuestos que alcanzan temperaturas

superficiales entre 43 a 49 °C durante más de 1 h desarrollan este tipo de síntoma. Los cambios en la coloración de la piel responden a la pérdida de clorofilas y antocianinas e incrementos en el contenido de otros pigmentos como carotenoides y glucósidos de quercetina. Es el daño más frecuente y costoso en la fruticultura (Zupan y col., 2014; Felicetti y Schrader, 2009a). Este tipo de daño puede subclasificarse en distintas categorías según la tonalidad de la mancha, desde tonos levemente amarillos a marrones oscuros como resultado de la severidad del estrés sufrido. Es considerado un daño subletal, sin necrosis o muerte celular de los tejidos afectados.

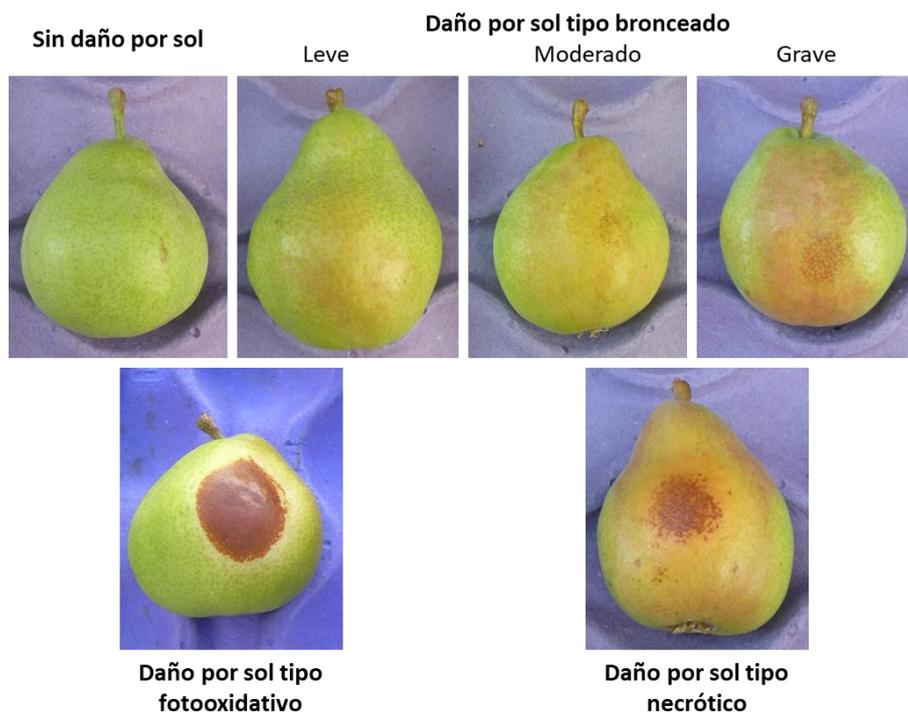


**Figura 2. Condiciones para la formación de los tres tipos de daño por sol en frutos de manzana.** Adaptado de Racskó y Schrader (2012).

Otro tipo de daño por sol descrito en frutos de manzana es el daño fotooxidativo (Figura 2). Este daño involucra elevada radiación solar sin necesidad de incrementos en la temperatura superficial. Inicialmente el síntoma se observa como

una mancha blanca en la superficie del fruto que evoluciona en unos días a una mancha negra necrótica (Felicetti y Schrader, 2008). Este daño se produce como resultado de una exposición repentina y directa a la luz de frutos que se desarrollaron en la sombra (no aclimatados a condiciones de luz) causando daño foto-oxidativo y muerte celular.

En peras no se ha realizado una caracterización de los tipos de daño por sol como la descrita previamente en manzana. Trabajos recientes, han determinado el desarrollo de daño por sol tipo bronceado y necrótico en peras rojas cuando la TSF supera valores de 47 °C y 50 °C, respectivamente (McClymont y col., 2016). Los umbrales de TSF observados en estos tipos de daño por sol en pera son similares a los descritos por Schrader y col., (2001, 2003, 2008) en manzana. Asimismo, la escala de tipos de daño por sol en función de los síntomas visuales empleada en manzana se ha aplicado en peras. Torres y Mogollon, (2022) utilizaron la clasificación de daño por sol tipo bronceado en la variedad Packham's Triumph, mientras que en este trabajo se adaptó la clasificación descrita por Racskó y Schrader (2012) para frutos de pera Anjou (Figura 3). La escasa información en relación con el daño por sol en frutos de pera motivó el desarrollo de este trabajo.



**Figura 3.** Escala de los distintos tipos de daño por sol en pera Beurré D'Anjou según descripción pre-existente en frutos de manzana. Adaptado de Racskó y Schrader (2012).

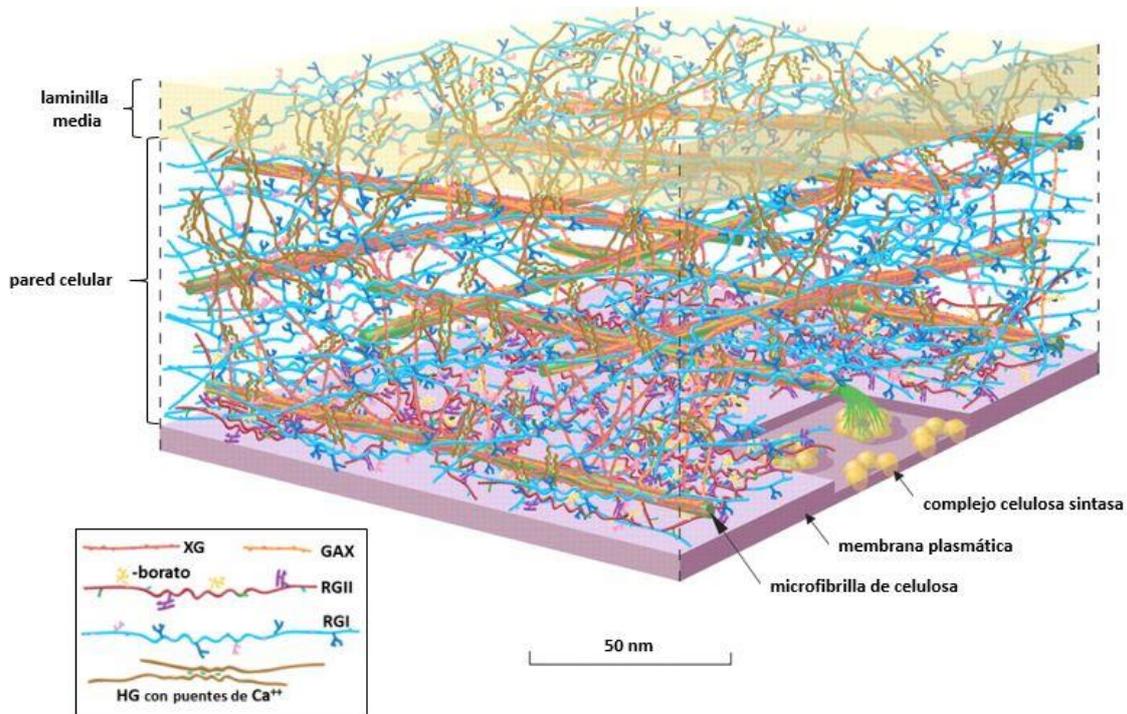
### 3. La pared celular

La pared celular es una estructura compleja, altamente organizada y dinámica constituida principalmente de polisacáridos de composición química heterogénea, que rodea las células vegetales (Carpita y col., 2000). Esta estructura tiene un rol esencial en el crecimiento, desarrollo y supervivencia de la célula frente a condiciones ambientales adversas (Bacete y col., 2018; Seifert y Blaukopf, 2010).

La pared actúa como soporte y contención definiendo tamaño y forma celular, además de proporcionar adhesión entre las células que constituyen los tejidos. Es la primera barrera de defensa frente al ataque de patógenos y adversidades abióticas, así como también interviene en la comunicación intercelular participando en mecanismos de señalización, comunicación y defensa mediante la liberación de oligosacáridos (Bacete y col., 2018; Carpita y col., 2000; Somerville y col., 2004; Taiz y Zeiger, 2006b).

La complejidad de la pared celular resulta del gran número de componentes que la constituyen y las interacciones que se establecen entre éstos. El carácter dinámico resulta de la capacidad que tiene la pared de sufrir cambios en su composición y estructura a lo largo del crecimiento y desarrollo celular, los cuales tienen repercusiones en sus funciones bioquímicas y mecánicas. Cada tejido presenta una composición de pared celular diferente, incluso la distribución de los componentes de la pared difiere dentro de la misma célula, contribuyendo a la notable diversidad morfológica y funcional de los tejidos (Liepman y col., 2010; Somerville y col., 2004).

En los frutos de especies dicotiledóneas como la pera, las paredes celulares son, en general, primarias tipo I (Figura 4), caracterizándose por presentar cantidades similares de hemicelulosas y celulosa, y ser relativamente delgadas, flexibles y altamente hidratadas pero capaces de soportar grandes presiones resultado de la turgencia celular (Cosgrove y Jarvis, 2012; Waldron y col., 2003; Carpita y col., 2000). En particular, las paredes de los frutos conservan la capacidad de desmontaje de componentes durante su vida, siendo el ablandamiento de los tejidos un claro ejemplo de este proceso (Brummell y col., 2004). Esto diferencia las paredes celulares de los frutos de la de otros órganos vegetales, los cuales al finalizar la etapa de crecimiento y desarrollo celular inician la formación de una pared rígida altamente rica en celulosa, lignina o suberina denominada pared celular secundaria.



**Figura 4. Esquema de la estructura y composición de la pared celular primaria tipo I.** Modelo esquemático de la estructura de la pared celular primaria de plantas dicotiledóneas. La pared primaria está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosas y pectinas. XG: xiloglucano; GAX: glucuronarabinosilanos; HG: homogalacturano; RGI: Rhamnogalacturonano I; RGII Rhamnogalacturonano II. Adaptado de Somerville y col. (2004).

### 3.1. Componentes de la pared celular primaria

Los componentes principales de la pared celular pertenecen al grupo de los polisacáridos. En forma generalizada, la pared celular de los frutos carnosos está compuesta por 35 % celulosa, 15-20 % de hemicelulosas y 40 % de pectinas (Cosgrove y Jarvis, 2012), el resto de los componentes incluye proteínas y compuestos fenólicos. Particularmente la piel de los frutos, constituida por las capas celulares de la epidermis e hipodermis, presenta paredes celulares más gruesas, y una proporción en relación con el peso fresco hasta tres veces superior que en la pulpa (Renard y Ginies, 2009; Carpita y col., 2000).

#### 3.1.1. Celulosa

La celulosa es un componente estructural de la pared celular formado por monómeros de D-glucosa unidos linealmente por enlaces  $\beta$ -(1-4). Estas cadenas lineales de glucosa se agrupan paralelamente por interacciones puente de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals formando microfibrillas de 10 a 25 nm de espesor. Son sintetizadas en complejos proteicos de membrana constituidos por unidades de celulosa sintetasas. Las microfibrillas presentan una estructura formada por dominios

altamente cristalinos, en la región central, unidos a regiones desorganizadas capaces de interactuar con otros componentes de la pared denominadas dominios amorfos (Cosgrove, 2005; Somerville y col., 2004). La celulosa se caracteriza por ser insoluble y relativamente inalterable frente al ataque químico y enzimático, características que le otorgan un rol central en la determinación de las propiedades mecánicas de la pared celular (Somerville, 2006).

### 3.1.2. Hemicelulosas

Son polímeros formados por una cadena lineal de azúcares unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4) pudiendo presentar ramificaciones laterales que impiden la formación de agregados fibrilares como sucede en la celulosa.

En los frutos de plantas dicotiledóneas, los xiloglucanos (XG) son las hemicelulosas predominantes en las paredes (Waldron y col., 2003). Este compuesto es un polímero de (1-4)- $\beta$ -D-glucosa con sustituciones regulares de residuos de  $\alpha$ -D-xilosa unidos por enlaces (1-6)- $\alpha$  o con cadenas cortas compuestas por unidades  $\alpha$ -D-xilosa,  $\beta$ -D-galactosa y  $\alpha$ -L-fucosa, entre otros monosacáridos (Liepman y col., 2010; Carpita y col., 2000).

Otro tipo de hemicelulosas, pero menos abundantes en las paredes celulares primarias, son los xilanos. Éstos están formados por cadenas lineales de  $\beta$ -(1-4)-xilosa. En algunos casos presentan ramificaciones laterales con  $\alpha$ -L-arabinosa o  $\alpha$ -L-arabinosa y ácido  $\alpha$ -D-glucurónico, denominándose arabinoxilanos (AX) y glucuronarabinoxilanos (GAX), respectivamente.

Dentro de las funciones de las hemicelulosas es importante remarcar su participación en la estabilización de la red fibrilar de la pared celular al establecer interacciones entre los distintos componentes que la forman. Además, contribuyen con las propiedades mecánicas y en procesos de resistencia al ataque de patógenos (Bacete y col., 2018) y diferentes estreses abióticos (Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015).

### 3.1.3. Pectinas

Las pectinas son el grupo más heterogéneo de polisacáridos no celulósicos de la pared celular y se caracterizan por ser polímeros ricos en ácido D-galacturónico. Funcionan como agentes hidratantes y material cementante de la pared celular permitiendo la adhesión entre células. Además, determinan la porosidad de la pared y modulan el pH y el equilibrio iónico del apoplasto. Incluso muchas moléculas derivadas de las cadenas pectínicas participan en procesos de reconocimiento, señalización y comunicación de alertas para la planta (Carpita y col., 2000).

Las pectinas de mayor importancia en las paredes celulares de frutos son:

- Homogalacturonano (HG). Este polímero es una cadena lineal formada únicamente por unidades de ácido D-galacturónico unido por enlaces  $\alpha$ -(1-4), formando las regiones lisas de las pectinas. Se encuentra en mayor proporción en la laminilla media y en zonas de refuerzo de la pared celular. Presenta grupos carboxilos que pueden encontrarse metilados o libres, definiendo el grado de metilación algunas de las características funcionales de las pectinas. Los grupos carboxilo libre pueden presentar interacciones iónicas con iones calcio formando pectatos de calcio, lo cual favorece la adhesión interpolímeros.
- Rhamnogalacturonano tipo I (RGI). Es un heteropolímero formado por una cadena principal de unidades repetidas del disacárido L-ramnosa y ácido D-galacturónico [(1-2)- $\alpha$ -L-Rha-(1-4)- $\alpha$ -D-Gal], con ramificaciones laterales de  $\alpha$ -L-arabino y  $\beta$ -D-galactano unidos a los residuos de L-ramnosa. Estas cadenas ramificadas aportan flexibilidad a las pectinas.
- Rhamnogalacturonano tipo II (RGII). Es un polímero modificado de HG. Consiste en un esqueleto de ácido D-galacturónico y cuatro grupos laterales constituido por un variado número de residuos, tales como L-ramnosa, L-fucosa, L-arabinosa, D-galactosa, ácido D-glucónico, entre otros. Su estructura altamente ramificada y su capacidad de formar dímeros, al establecer uniones di-éster con el boro, favorece la adhesión interpolímeros y el fortalecimiento de la pared celular (Somerville y col., 2004)

### 3.1.4. Otros componentes de la pared celular

Además de los polisacáridos, existe en menor proporción una amplia gama de compuestos presentes en la pared celular como proteínas, enzimas, compuestos fenólicos y lignina (Taiz y Zeiger, 2006b; Carpita y col., 2000).

Las proteínas estructurales son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) o ricas en prolina y glicina. Las HRGP son muy abundantes en la pared celular, destacándose las extensinas y las proteínas arabinogalactano (AGP). Ambas participan en procesos de crecimiento y desarrollo y en respuestas por interacciones con microorganismos (Liepman y col., 2010).

Las proteínas enzimáticas son de carácter soluble y participan en el crecimiento, desarrollo, maduración y senescencia de los frutos, a través de la remodelación, ensamble y desmontaje de la pared celular. Estas enzimas pertenecen a grupos de peroxidasa, glicosilhidrolasas, deshidrogenasas, etc. (Waldron y col., 2003). Los tipos de enzimas y las cantidades presentes en la pared varían según el momento del desarrollo y las condiciones ambientales. Se profundiza en las proteínas enzimáticas de pared en la sección 3.3.

Los compuestos fenólicos presentes en la pared celular comprenden dos grandes grupos, los ésteres fenólicos y las ligninas. Los ésteres fenólicos más comunes

en la pared celular primaria son el ácido ferúlico y ácido cumárico, los cuales suelen encontrarse esterificados a residuos laterales de las pectinas y las hemicelulosas, contribuyendo a las propiedades mecánicas de la pared celular (Sasidharan y col., 2011; Burton y col., 2010).

La lignina es un compuesto complejo derivado de la polimerización no enzimática de alcoholes deshidrogenados que se encuentra principalmente en las paredes celulares secundarias. Su presencia en la pared incrementa las propiedades mecánicas y la resistencia al ataque enzimático. En las paredes primarias, la cantidad de lignina suele ser baja o nula, sin embargo, frente a estrés abióticos o bióticos su incorporación a la pared es un mecanismo de respuesta que genera la planta para adquirir resistencia (Bacete y col., 2018; Tenhaken, 2015; Liepman y col., 2010; Waldron y col., 2003).

### **3.2. Modelo e interacciones de la pared celular**

El modelo de pared celular más aceptado y difundido es el propuesto por Carpita y Gibeaut (1993) denominado red pegajosa. Este modelo propone que la pared celular está constituida por tres dominios que interactúan entre sí por distintos enlaces químicos y fuerzas intermoleculares.

El primer dominio corresponde a una entramada red formada por las microfibras de celulosa y las cadenas de xiloglucanos y otras hemicelulosas. Entre estos compuestos se generan interacciones puente de hidrógeno permitiendo conexiones entre al menos dos microfibrillas de celulosa. Además, es posible que, durante el proceso de síntesis de las hebras de celulosa, algunas hemicelulosas queden atrapadas entre las fibrillas generando regiones desorganizadas que facilitan las interacciones con estos y otros compuestos (Cosgrove, 2005).

La red celulosa-hemicelulosas se encuentra embebida en una matriz de polisacáridos no celulósicos donde predominan los compuestos pectínicos (segundo dominio). El tercer dominio propone una red de proteínas estructurales que interactúa con las pectinas y la red de celulosa-hemicelulosas.

Si bien los procesos de formación, ensamble y remodelación de la pared celular no han sido totalmente esclarecidos aún, la aplicación de distintas técnicas microscópicas y el uso de plantas transgénicas con modificaciones en componentes de la pared celular ha permitido avanzar en la comprensión de las interacciones entre compuestos y su participación en la determinación de la integridad y propiedades mecánicas de la pared celular. Muchas evidencias indican la existencia de interacciones entre polisacárido-polisacárido, proteína-proteína, polisacárido-proteína, polisacárido-compuesto fenólico a través de la formación de uniones covalentes y atracciones electrostáticas e interacciones físicas intramoleculares. El establecimiento de estas interacciones en la pared celular resulta de procesos tales como el autoensamblaje, el

ensamblaje mediado por enzimas y reacciones de óxido-reducción (Taiz y Zeiger, 2006b; Cosgrove, 2005).

Las pectinas, en particular por su alta heterogeneidad en composición, presentan distintos dominios que permiten formar interacciones por uniones covalentes, iónicas y puentes de hidrógeno entre los componentes de la pared. Las cadenas de HG con ácidos galacturónicos no esterificados poseen la capacidad de establecer entrecruzamientos con el catión calcio formando sectores calcificados. Mientras, RGII puede formar estructuras dímeras por esterificación con el anión borato.

Cosgrove, (2005) propone que las pectinas con carácter ácido podrían formar interacciones directas con la celulosa. Asimismo, pueden establecerse enlaces covalentes entre residuos ácidos de HG con hemicelulosas, y entre pectinas neutras (residuos arabinanos) directamente con celulosa con menor frecuencia que con el xiloglucano (Cosgrove y Jarvis, 2012). Las pectinas y los arabinosilanos pueden unirse entre sí por varios enlaces covalentes, como los enlaces ésteres entre residuos fenólicos del ácido ferúlico (Waldron y col., 2003). A su vez, las proteínas estructurales aportan al soporte mecánico y el ensamble de compuestos de pared, al establecer enlaces covalentes entre sí y con distintos polisacáridos (Taiz y Zeiger, 2006b).

### 3.3. Enzimas modeladoras de la pared celular

Los polímeros que forman la pared celular sufren modificaciones en sus estructuras por la acción de un gran número de enzimas. Estas enzimas presentan familias de isoformas con patrones de expresión génica diferentes que pueden variar en las distintas etapas del desarrollo del fruto, así como también frente a las condiciones ambientales en las cuales se desarrolle. Esto sugiere que las enzimas de pared pueden participar en proceso de relajación, fortalecimiento, reordenamiento y/o desmantelamiento de la pared según la necesidad de la célula.

Algunas de estas enzimas se describen a continuación:

- *Poligalacturonasas (PGs)*. Es un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1-4) de los residuos de ácido D-galacturónico, principalmente en los homogalacturonanos. Pueden ser endo o exo PGs, y en general requieren que los residuos estén desmetilados para actuar (Carpita y col., 2000).
- *Pectin metil esterasas (PMEs)*. Estas enzimas provocan la ruptura hidrolítica de grupos metil-ésteres de residuos de ácido D-galacturónico, promoviendo la desmetilación de las pectinas. Esto favorece la acción de las poligalacturonasas, pero a su vez facilita la formación de pectatos en presencia de iones calcio. De este modo, se sugiere que tiene un rol dual en la pared celular participando en el debilitamiento o en el refuerzo de las estructuras de los polisacáridos

dependiendo de los mecanismos de regulación y las condiciones químicas del apoplasto (concentraciones de iones, pH).

- *Pectato liasa (PLs)*. Al igual que las PGs, actúan sobre las cadenas de HG pero por un mecanismo de  $\beta$ -eliminación, introduciendo una insaturación entre los C4 y C5 del ácido D-galacturónico.
- *$\beta$ -D-galactosidasas ( $\beta$ -Gal)*. Son exo enzimas que catalizan la hidrólisis de residuos  $\beta$ -D-galactósidos del extremo no reductor de cadenas laterales de RGI y XG.
- *$\alpha$ -L-arabinofuranosidasas ( $\alpha$ -Ara)*. Son exo hidrolasas que remueven residuos terminales de arabinosa de diferentes fracciones pectínicas y hemicelulosas.
- *Endo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanasas (EGasas)*. Esta familia de enzimas, también conocidas como celulasas (CEs), hidrolizan enlaces internos  $\beta$ -D-(1-4) de cadenas de glucanos de residuos no sustituidos. No son capaces de hidrolizar celulosa cristalina, por lo cual se cree que su sustrato serían las hemicelulosas y las zonas de celulosa amorfa.
- *Endo-xilanasas (EXnasas)*. Son enzimas que hidrolizan enlaces  $\beta$ -(1-4) internos de residuos de las cadenas de xilano formando oligosacáridos.
- *Xilosidasas (Xyls)*. Son enzimas que actúan sobre los productos de las EXnasas generando residuos de xilosa.
- *Xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas (XTH)*. Esta denominación involucra proteínas que cortan y vuelven a unir XG, incluyendo principalmente las xiloglucano endohidrolasas (XEH) y xiloglucano endotransglicosidasas (XETs) (Yang y col., 2006). Las XEH catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -(1-4)-glucano del xiloglucano, mientras las XETs hidrolizan estos enlaces y transfieren el fragmento con el extremo reductor a otro polímero de xiloglucano o a un oligosacárido resultante de la acción de EGasas y XEH sobre xiloglucano. Algunas enzimas poseen una sola de estas actividades, mientras que otras poseen ambas.
- *Expansinas (EXPs)*. Son proteínas sin acción enzimática hidrolítica conocida. Su participación en la remodelación de la pared celular podría deberse a la interrupción de las interacciones puente de hidrogeno existentes entre la celulosa y los polímeros no celulósicos, permitiendo la relajación de la pared y facilitando la interacción de las enzimas a sus respectivos sustratos.

### 3.4. Cambios en la pared celular durante la maduración de los frutos

Los cambios en la pared celular de los frutos durante la maduración es el resultado de distintos procesos que afectan directamente la estructura de sus componentes. Estos procesos se describen brevemente a continuación (Brummell, 2006):

- *Desmetilesterificación de pectinas*: resulta de la acción de PME sobre HG. Durante la maduración se produce una notoria reducción del grado de metilación de las pectinas.
- *Solubilización de pectinas*: se observa como un aumento del contenido de ácidos galacturónicos en las fracciones más solubles de pectinas, es decir menos ligadas a la pared.
- *Depolimerización de pectinas*: los frutos inmaduros suelen presentar pectinas de alto peso molecular. La depolimerización consiste en la reducción del peso molecular de estos compuestos.
- *Pérdida de azúcares neutros*: consiste en la pérdida de residuos de ARA y GAL, principalmente presentes en las cadenas laterales de 1,4- $\beta$ -D-galactano, 1,5- $\alpha$ -L-arabino y arabinogalactano de RGI, glicoproteínas estructurales y cadenas laterales de xiloglucano y RGII. Es un proceso característico durante la maduración y promueve cambios de estructura y unión de pectinas que afectan la movilidad de otras enzimas sobre los polímeros de la pared.
- *Depolimerización de hemicelulosas*: al igual que en las pectinas, la depolimerización de las hemicelulosas se relaciona con una reducción del peso molecular durante la maduración.
- *Depolimerización de celulosa*: no es un proceso que se observe en los frutos a excepción de la palta, y se asocia a la pérdida de regiones amorfas de la celulosa.

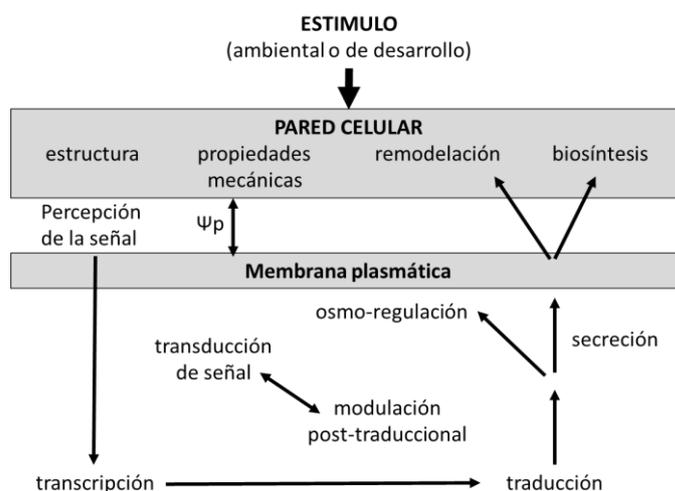
El resultado de estos procesos consiste en el desmontaje de la pared celular y es resultado principalmente de mecanismos enzimáticos, derivando en el ablandamiento de los tejidos durante la maduración de los frutos (Brummell y Harpster, 2001). A su vez es importante resaltar que este no es el único mecanismo que actúa sobre la pared. La escisión de polisacáridos como resultado de la producción de EROs en la pared celular, colaboraría en el aflojamiento de los tejidos durante la maduración y en otros procesos fisiológicos importantes como el crecimiento, desarrollo y supervivencia de los frutos (Fry, 1998).

Durante la maduración de los frutos, no todos los procesos de desmontaje se producen por igual, esto se observa en la gran variabilidad de texturas existentes en los frutos. En algunos frutos como la palta, los procesos de solubilización de pectinas, pérdida de cadenas laterales y depolimerización de todos los componentes de pared se dan conjuntamente durante la maduración (Brummell, 2006). Sin embargo, en la mayoría de los frutos, solo algunos de estos procesos se destacan, y las pectinas suelen ser el componente más afectado durante la maduración (Wang y col., 2018). En frutos de manzana, los cambios texturales observados durante la maduración se han correlacionado directamente con el incremento de pectinas solubles en agua y la reducción de residuos de ARA y GAL en las fracciones pectínicas (Billy y col., 2008). En peras, el principal proceso asociado al ablandamiento de la pulpa se relacionó con la

pérdida de azúcares neutros. Se ha observado además la solubilización de pectinas y aumento de la desmetilación de HG durante la maduración (Yoshioka y col., 2019; Martin-Cabrejas y col., 1994), mientras que la depolimerización es un proceso relativamente limitado en este fruto (Brummell, 2006).

### 3.5. Cambios adaptativos en la pared celular frente a estrés abiótico

Las plantas se desarrollan bajo condiciones ambientales diversas, y la pared celular forma parte del sistema de monitoreo que le permite percibir señales del medio externo e iniciar una respuesta temprana para adaptarse a condiciones de estrés abiótico (Figura 5) (Novaković y col., 2018).



**Figura 5. Componentes del sistema de control de las propiedades mecánicas e integridad de la pared celular vegetal.** Las diferencias en la estructura de la pared celular y sus propiedades mecánicas se detectan en la membrana plasmática y se traducen en una respuesta compensatoria a nivel transcripcional y post-traduccional para restaurar la estructura y las propiedades mecánicas de la pared celular. Las influencias superpuestas del ciclo celular, el tipo celular, el contexto celular y la etapa de desarrollo que determinan los parámetros correctos se han omitido deliberadamente para enfatizar la naturaleza circular de este sistema de control.  $\Psi_p$ : presión de turgencia. Adaptado de Seifert y Blaukopf, (2010).

La remodelación de la pared celular es un componente importante dentro de los mecanismos de respuesta de las plantas para la adquisición de tolerancia o resistencia a enfermedades y estrés abiótico (Wu y col., 2018). Esta remodelación en la pared celular, respuesta a factores externos, afecta la ultra-estructura, organización y composición de los elementos de la pared. Los resultados generales de estos cambios dependerán tanto de la especie, variedad, estado fenológico y fisiológico, como del tipo, dosis y duración del factor estresante, señalando la dificultad de identificar un

patrón común de la respuesta al estrés en la remodelación de la pared (Le Gall y col., 2015).

Los cambios en la pared celular serán resultado de una combinación de procesos que ocurren tanto durante el evento estresante como posteriores a éste, determinados por repuestas que afectan la regulación génica de la célula. Los procesos que promueven la remodelación de la pared celular se pueden clasificar en tres grupos:

- Procesos oxidativos.
- Procesos enzimáticos mediados por proteínas modeladoras de la pared.
- Procesos de síntesis *de novo* de componentes de pared.

Los cambios en la pared debida a procesos oxidativos se desarrollan principalmente durante el estrés. El incremento de la concentración de EROs, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induce la actividad de las peroxidasas de pared. Asimismo, desencadenan una respuesta en alza de la regulación de genes de peroxidasas. El incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el apoplasto, promueve la actividad de las peroxidasas generando entrecruzamientos entre glicoproteínas, como también entre ácidos ferúlicos con moléculas de ligninas. Estos procesos incrementan el endurecimiento de la pared celular, otorgando a la célula resistencia mecánica para soportar cambios en la turgencia celular (Novaković y col., 2018; Tenhaken, 2015). Cuando la producción de EROs supera la capacidad de las peroxidasas y/o los sustratos moleculares se encuentran limitados, se produce el aflojamiento de la pared celular por procesos oxidativos descontrolados que favorece la escisión de polisacáridos (Tenhaken, 2015).

El proceso enzimático asociado a la remodelación de la pared en respuesta de un estrés abiótico, sugiere la participación de enzimas modeladoras de pared como las XTH, EXP, PME, hidrolasas y liasas (Wu y col., 2018; Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015). Estas enzimas modeladoras de pared pertenecen a familias multigénicas, lo que significa que las proteínas pueden tener funciones metabólicas similares, pero resultan de la activación de diferentes genes. Esto otorga plasticidad adaptativa a las células, permitiendo modificaciones específicas en la pared celular según el factor estresante, favoreciendo la supervivencia (Sasidharan y col., 2011). Una exhaustiva revisión bibliográfica en distintos cultivos y bajo distintos tipos de estrés abiótico demuestra una gran variación de la respuesta de la expresión génica y actividad de enzimas modeladoras de la pared (Gambetta y col., 2021; Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015; Lima y col., 2013; Yang y col., 2006; Gulen y Eris, 2004).

En relación con los procesos de síntesis *de novo* de componentes de pared se destacan los incrementos de lignina y hemicelulosas en células bajo estrés ambiental. Ambos procesos se ven estimulados como respuesta a las condiciones ambientales desfavorables, contribuyendo al engrosamiento y refuerzo de la pared celular (Novaković y col., 2018; Le Gall y col., 2015). La regulación positiva de genes

relacionados a la biosíntesis de lignina como PAL y CAD y los incrementos del contenido de este compuesto en la pared celular es una respuesta común frente a distintos tipos de estrés ambiental (Torres y col., 2020; Le Gall y col., 2015; Lima y col., 2013).

Los cambios en el contenido de pectinas con relación al estrés abiótico no se han dilucidado aún, reportándose diferentes resultados dependiendo del factor, la especie e incluso el órgano en estudio. Sin embargo, y asociado al incremento de la elasticidad de la pared celular, distintas situaciones estresantes promueven cambios asociados al incremento de las ramificaciones en las pectinas (Le Gall y col., 2015).

En general, se destacan dos mecanismos fundamentales que permiten la adaptación de la pared celular frente a estrés abiótico. Por un lado, el incremento de la actividad de XTH y EXP, junto al aumento del grado de ramificación de las pectinas, manteniendo la elasticidad y plasticidad de la pared. Por otro lado, el engrosamiento de la pared celular debido a deposición de hemicelulosas y lignina (Le Gall y col., 2015).

#### **4. El calcio**

El calcio es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas participando tanto en funciones estructurales como metabólicas (Monge y col., 1994). Las plantas lo absorben como catión bivalente ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y se moviliza principalmente por el xilema, impulsado por el movimiento del agua debido a la transpiración. Sin embargo, su distribución y acumulación en los órganos vegetales dependen del suministro de agua y de la interacción con las cargas negativas fijas (grupos carboxilos u otros) en la pared celular del apoplasto (Hocking y col., 2016). En las células, el calcio se localiza principalmente en la pared celular, la membrana celular, el retículo endoplasmático y vacuolas, mientras que en el citosol su concentración es significativamente menor y no supera un valor de  $1 \mu\text{M}$  (Bonilla, 2008).

Este nutriente participa en el mantenimiento de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática y es un componente integral de la pared celular otorgándole estabilidad, adherencia y rigidez. Su concentración celular influye en la actividad de distintas enzimas y proteínas. Tiene acción importante como mensajero secundario participando en la transducción de señales, activando mecanismos de repuesta a situaciones de estrés y/o procesos de desarrollo vegetal (Robertson, 2013; Palta, 1996).

##### **4.1. El calcio y la pared celular**

La pared celular es la mayor reserva de calcio en los tejidos vegetales con un contenido del 60 al 75 % del calcio total (Aghdam y col., 2012). El calcio es un componente integral de la pared celular que modifica sus propiedades mecánicas y

físicas (Olmedo y col., 2021; Palta, 1996). Interactúa directamente con la matriz pectínica modificando propiedades como rigidez, cohesión y flexibilidad. Forma interacciones iónicas reversibles con los grupos carboxílicos libres ( $R-COO^-$ ) del HG, permitiendo la unión de cadenas vecinas, lo cual favorece la reticulación y el empaquetamiento de las pectinas. Este tipo de interacción incrementa el poder cementante de la pared celular mejorando la adhesión celular y limitando la accesibilidad de las enzimas degradantes a sus sustratos (Vicente y col., 2014).

El calcio mejora la firmeza de los frutos y retrasa el ablandamiento durante la maduración, al reticular y empaquetar las cadenas de pectinas por su carácter divalente y reducir la accesibilidad de las enzimas degradantes de la pared celular (Vicente y col., 2014), como también por influir en la actividad de enzimas como PG (Marschner, 1995).

El contenido de calcio en la pared celular regula la actividad de distintas enzimas modeladoras de la pared. En altas concentraciones, el calcio inhibe la actividad de PG, además de limitar el acceso a su sustrato por la interacción  $HG-Ca^{2+}-HG$  (Cabanne y Donéche, 2002; Monge y col., 1994) reduciendo la depolimerización de pectinas. Por otro lado, incrementos de calcio en el apoplasto estimulan la actividad de PME favoreciendo la desmetilación de HG y la formación de pectatos de calcio (Wu y col., 2018). Ambas situaciones promueven el fortalecimiento e integridad de la pared.

La función del calcio en la pared es fundamental en la calidad y vida útil de los productos fruti-hortícolas, al reducir la incidencia de fisiopatías y enfermedades fúngicas, retardar la maduración y senescencia y mejorar características texturales (Chéour y col., 2019; Bakeer, 2016; Sharma y col., 2012; Gerasopoulos y Drogoudi, 2005; Glenn y Poovaiah, 1990; Klein y col., 1990; Poovaiah, 1986).

### **4.2. El calcio y el estrés abiótico**

El calcio está implicado en la participación y regulación de diferentes procesos fisiológicos, destacando la transducción de señales externas para promover respuestas de defensa frente a situaciones de estrés (Hocking y col., 2016). Su concentración actúa como señal química en respuesta a procesos de desarrollo vegetal y estímulos exteriores (Robertson, 2013). Particularmente, la exposición a un factor estresante (incremento de temperatura, exceso de luz, déficit hídrico, etc.) promueve incrementos rápidos y transitorios en la concentración y el flujo de calcio libre intracelular que actúan como señal generando cambios en la expresión génica y activando respuestas específicas de defensa y adaptación en distintos niveles celulares (Bonilla, 2008; Taiz y Zeiger, 2006a). A su vez, estas repuestas metabólicas pueden incluir al calcio como un modulador enzimático o estabilizador de estructuras tales como las membranas plasmáticas y la pared celular.

Se ha reportado que una adecuada nutrición del calcio reduce el daño oxidativo e incrementa la capacidad antioxidante en los tejidos. Sakhonwasee y Phingkasam (2017) observaron que tratamientos con calcio mejoraron el coeficiente operativo del fotosistema II, resultando en una menor producción de EROs en plantas de tomate estresadas térmicamente. Además, el mayor contenido de calcio proporcionó mayor protección a la membrana plasmática, reduciendo la fluidez frente a elevadas temperaturas. La mayor estabilidad de la membrana resulta de la unión del calcio con los grupos fosfato de los fosfolípidos o de las proteínas, aumentando las interacciones entre ambos tipos de moléculas, modificando el tamaño de los poros y la permeabilidad de la membrana para los distintos solutos (Monge y col., 1994).

Los tratamientos con calcio promueven la adquisición de termotolerancia, incrementando la actividad de enzimas antioxidantes durante los eventos estresantes como también la cantidad de distintos metabolitos asociados (ácido ascórbico, antocianinas, flavonoides). Particularmente, en relación con el estrés por elevada radiación y temperatura, distintos reportes exponen que tratamientos con calcio promueven incrementos en el contenido de fenoles, antocianinas y flavonoides determinando mayor capacidad antioxidante y foto-protección (Mwije y col., 2020a; Lötze y col., 2018; Mwije, 2018; Sakhonwasee y Phingkasam, 2017; Bakeer, 2016). Estos trabajos establecieron además una relación entre dichos cambios en el sistema de defensa antioxidante con la reducción en la incidencia de daño por sol leve en distintos frutos.

### **4.3. El calcio en los frutos**

En los frutos, como el tomate, manzana o pera, el ingreso de calcio se realiza a través del xilema, y una vez que cesa la división celular y comienza la elongación celular se ve restringido. A su vez la distribución de este nutriente en los frutos es desigual, concentrándose mayoritariamente en la piel y en la región cercana al pedúnculo (Hocking y col., 2016; Monge y col., 1994).

El calcio promueve mayor vida postcosecha y mejora la calidad de los frutos (Sharma, 2020; Chéour y col., 2019; Aghdam y col., 2012; Klein y col., 1990; Poovaiah, 1986). El incremento de este componente en los frutos se relaciona directamente con aumentos en la firmeza de los tejidos y menor incidencia de fisiopatías y enfermedades fúngicas. Esto se debe principalmente a su participación como componente estructural de la pared celular y estabilizador de la membrana plasmática (Bonilla, 2008). El calcio interactúa con los dominios lineales (HG) de las pectinas formando pectatos de calcio (Wang y col., 2018), mejorando propiedades cementantes y fortaleciendo la laminilla media y los puntos de refuerzo de la pared celular. Estos cambios en las propiedades de la pared promueven cambios texturales en los tejidos.

El calcio retrasa la maduración de los frutos al participar en la interacción química con los polisacáridos de pared y por inhibir o reducir la actividad de enzimas hidrolíticas de la pared celular, como las poligalacturonasas (Olmedo y col., 2021; Chéour y col., 2019; Techakanon y Barrett, 2017; Klein y col., 1990).

### **5. Fundamentos de la elección del tema de tesis**

El daño por sol es una fisiopatía que se genera en los frutos expuestos a elevada radiación solar que generalmente es acompañada de altas temperaturas. Esto afecta el metabolismo celular en distintos niveles: provoca cambios en el contenido de azúcares, afecta la composición de pigmentos, deteriora el proceso de fotosíntesis, altera las relaciones hídricas, modifica la estructura de distintos componentes celulares y activa mecanismos de defensa y adaptación celular (Morales-Quintana y col., 2020; Racskó y Schrader, 2012). Estos cambios conducen a modificaciones en el aspecto del fruto afectando su calidad frente a los estándares actuales de los consumidores.

En el Alto Valle se produce el 90 % de las peras argentinas (Dansa, 2018) y se registran pérdidas que pueden alcanzar hasta el 50 % de la producción por temporada debido al daño por sol (Vita y Colavita, 2018). Durante los meses de verano, esta región presenta condiciones climáticas predisponentes (elevada radiación, altas temperaturas y baja humedad relativa) para el desarrollo de este desorden, que se proyectan aún más desfavorables en el mediano plazo como resultado del cambio climático (Rodríguez y Muñoz, 2022).

El daño por sol se ha descrito profundamente en los frutos de manzanas (Morales-Quintana y col., 2020; Liu y col., 2019; Makedredza y col., 2015; Torres y col., 2013; Schrader y col., 2009; Racskó y col., 2005; Piskolczi y col., 2004). Estudios realizados en Argentina han abordado temas como el metabolismo oxidativo, sistema antioxidante, respuesta hormonal y nutricional de los tejidos afectados por daño por sol (Colavita, 2022; Blackhall, 2019; Vita, 2018). No obstante, la importancia de la producción de peras, no se ha avanzado sobre la caracterización metabólica de los efectos del estrés por elevada radiación y temperatura en este tipo de frutos a nivel regional ni global.

Los síntomas del daño por sol se caracterizan por afectar las primeras capas celulares de los tejidos de los frutos, alterando principalmente las propiedades fisiológicas, biofísicas y bioquímicas de la piel. Las células de la piel desarrollan gruesas paredes celulares que contribuyen, dada su compleja y dinámica arquitectura, en la protección, monitoreo, comunicación y defensa de las células ante eventos externos. En diferentes cultivos vegetales se ha recopilado información que indica que la pared celular, mediante la remodelación estructural de sus componentes, permite adaptarse y proteger a los tejidos frente a tensiones ambientales (Hocking y col., 2016; Le Gall y col., 2015). Pese a ello, no existen estudios que profundicen en el análisis de posibles

cambios en la pared celular como respuesta frente a estrés por elevada radiación solar. Información que indudablemente podría proporcionar nuevos enfoques para comprender los mecanismos subyacentes que promueven el daño por sol y la capacidad de adaptación de los frutos. Agronómicamente, estos conocimientos podrían favorecer el desarrollo de estrategias para la mitigación o reducción de pérdidas productivas.

Los frutos de peras Beurré D'Anjou que presentan daño por sol leve son almacenados en postcosecha y se destinan a estándares de calidad inferior con periodos de conservación cortos, debido tanto al tono amarillo de la piel en el área afectada como al hecho de ser considerados frutos con un estado de madurez avanzado (Munné-Bosch y Vincent, 2019; Felicetti y Schrader, 2010; Schrader y col., 2003). Estudios recientes proponen que estos cambios en los parámetros empleados para determinar el estado de madurez de frutos pueden resultar de la activación de vías metabólicas diferenciales relacionadas con la repuesta de defensa y tolerancia de las plantas frente a estrés abióticos, y no con eventos relacionados a procesos madurativos (Dong y Beckles, 2019; Le Gall y col., 2015; Blanch y col., 2013). Por otra parte, frutos con *blush* son clasificados y almacenados junto a frutos sanos, destinados a categorías superiores, simplemente por ser más atractivos para los consumidores, sin considerar que estos cambios en la pigmentación de la piel son resultado de condiciones particulares de luz solar y que pueden enmascarar síntomas de daño por sol (McClymont y col., 2016; Makedredza y col., 2015). En este sentido, es necesario enfatizar sobre la escasez de información existente sobre el efecto del daño de sol en relación con el comportamiento de los tejidos afectados durante la maduración de los frutos. Incluso, se ha demostrado que frutos con daño por sol presentan un incremento de los sistemas de defensa antioxidante en comparación con frutos sanos, pudiendo esta condición ser un factor favorable para atenuar procesos oxidativos propios de la maduración, e incluso otorgarles a estos productos frescos un valor nutricional más elevado para el consumidor al presentar un contenido mayor de antioxidantes (Sharma y col., 2019; Murcia y col., 2017; Yuri y col., 2010). El estudio de la evolución de frutos de pera con daño por sol durante la maduración, luego de la conservación en frío, podría ser un tema fructífero para desarrollar protocolos adecuados de manejo durante el empaque y almacenamiento que reduzcan las pérdidas de fruta en postcosecha.

Por otro lado, el calcio es un nutriente fundamental para el desarrollo de los frutos, directamente asociado a una mejor calidad y mayor vida en postcosecha en los productos fruti-hortícolas (Aghdam y col., 2012). Distintas investigaciones han demostrado su participación en la señalización y respuesta frente a estrés, relacionado con el incremento de la tolerancia en frutos a distintas tensiones externas. Este proceso es resultado no solo del fortalecimiento y la estabilización de estructuras celulares sino también del aumento de la capacidad antioxidante en los tejidos

tratados (Robertson, 2013; Palta, 1996). En frutales de pepita, tratamientos con calcio han demostrado ser útiles para reducir la incidencia del daño por sol, sin determinar claramente cuál es su efecto sobre el metabolismo.

La importancia que ha adquirido la producción y exportación de pera en Argentina en general, y en el Alto Valle en particular, requiere mantener y mejorar el producto buscando reducir y/o eliminar las variables que afectan la calidad. En tal sentido, el daño por sol produce considerables daños en el cultivo de peras ocasionando pérdidas importantes en la producción. Esta situación, sumada a la escasa información sobre el tema y, en especial en relación con la pared celular de la piel, conlleva la necesidad de profundizar en el conocimiento de esta fisiopatía en el cultivo de peras para comprender los cambios resultantes de daño por sol y plantear estrategias de manejo adecuadas tendientes a reducir las pérdidas.

### **5.1. Hipótesis y objetivos**

#### **5.1.1. Hipótesis**

1. La exposición de peras a elevada radiación solar y temperatura promueve procesos de adaptación a nivel celular que involucran cambios en la estructura y composición de la pared celular de la piel del fruto.
2. El estrés por elevada radiación solar y temperatura induce cambios moleculares en el metabolismo asociado a la pared celular de piel de peras, modificando su composición y estructura.
3. El efecto de la exposición precosecha a elevada radiación solar y temperatura en peras, que desarrollan síntomas de daño por sol, afecta la maduración postcosecha de los frutos.
4. Los daños por sol *blush* y leve promueven cambios metabólicos similares en los frutos, alterando su comportamiento metabólico respecto a frutos sin daño por sol.
5. El aumento de calcio en la estructura de la pared celular reduce la incidencia del daño por elevada radiación solar y temperatura a cosecha, y mejora la vida postcosecha de frutos con daño por sol leve.

#### **5.1.2. Objetivo general**

Determinar el efecto del estrés por elevada radiación solar y temperatura sobre la pared celular de la piel de frutos de peras var. Berrué D'Anjou al momento de la cosecha y durante la maduración postcosecha, y analizar el efecto tratamiento precosecha con calcio sobre la composición de la pared celular y la vida postcosecha del fruto.

### 5.1.3. Objetivos específicos

1. Caracterizar morfológica y bioquímicamente la pared celular en piel de frutos con distintos niveles de daño generado por estrés por elevada radiación solar y temperatura.
2. Identificar los eventos moleculares y metabólicos asociados a las modificaciones de la pared celular de piel de peras durante procesos de estrés por elevada radiación y temperatura inducidos bajo situaciones naturales a campo y estudiar su dinámica en condiciones controladas artificialmente.
3. Analizar el efecto del daño por sol sobre parámetros metabólicos asociados a la maduración postcosecha de frutos de pera.
4. Agrupar los tejidos con distintos niveles de daño por sol según la similitud en características metabólicas y el comportamiento madurativo a cosecha y durante la maduración.
5. Determinar el efecto de fertilizaciones con calcio vía suelo sobre la composición de la pared celular en frutos afectados por estrés por elevada radiación solar y temperatura, y su influencia sobre la vida postcosecha.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Sitio de estudio y condiciones meteorológicas

El trabajo se realizó sobre frutos de pera (*Pyrus communis* L.) variedad Beurré D'Anjou, también conocida como Anjou, denominación con la cual se hará referencia a esta variedad en adelante. Se utilizó para el estudio una plantación comercial ubicada en la zona rural de Cipolletti (Río Negro). El cuadro elegido correspondió a una plantación mixta de perales var. Anjou y Packham's Triumph en plena producción comercial sobre pie franco, bajo sistema de riego superficial y conducción en espaldera con eje central, marco de plantación 4 x 2 m, implantadas en el año 2004. Este cuadro presentaba plantas con crecimiento y desarrollo uniforme, sin problemas de suelo ni riego. Los resultados presentados en este trabajo corresponden a los frutos recolectados durante la temporada 2018/2019.



**Figura 6. Cuadro utilizado para los ensayos.** Plantas de pera var. Anjou bajo marco de plantación 4x2, conducción en espaldera con eje central.

Las condiciones meteorológicas para la temporada 2018/2019 fueron las características de la región del Alto Valle durante los meses de verano (Tabla 2).

**Tabla 2. Registros meteorológicos de la temperatura y radiación global máxima diaria en los meses de verano, para la temporada productiva 2018/2019.**

Variables meteorológicas	Meses		
	Diciembre	Enero	Febrero
Temperatura máx. (°C)	36,9	35,8	40,8
Radiación global máx. (W m <sup>-2</sup> )	1062	1334	1240

Datos obtenidos en la estación Agroclimática-Cinco Saltos, Río Negro (38°50'41''S; 68°04'09''O; 282 msnm)

### 1.1. Elección de la variedad de estudio

Se seleccionó para este estudio la variedad Anjou. Esta es la tercera variedad más producida en el Alto Valle y se destina prácticamente en su totalidad a exportación. Además, es una de las variedades más susceptibles al desarrollo de daño por sol debido a su tardía cosecha (Benítez y col., 2005), la cual se inicia generalmente durante la primera quincena de febrero.

Es un fruto de forma piriforme aplastado de tamaño medio a grande, con un pedúnculo corto y grueso. La piel es fina y delicada de color verde claro con numerosas lenticelas, que evoluciona a tonos verdes-amarillos durante la maduración. La pulpa del fruto es de color blanco cremoso, de textura mantecosa y jugosa si la maduración progresó adecuadamente (Benítez, 2001).

Los frutos de pera Anjou se cosechan con una edad promedio de 129 días después de plena floración (DDPF) y con una firmeza de pulpa entre 68,9 a 73,4 N, sólidos solubles entre 10 a 11 %, acidez málica de 3,5-4 g/l y almidón degradado en un 20 a 25 % (Calvo y col., 2012). Estos frutos requieren de un periodo de almacenamiento a bajas temperaturas para madurar adecuadamente sin desarrollar textura harinosa. El periodo de almacenamiento varía según el estado de madurez de los frutos, por ejemplo, frutos con firmeza superior a 62 N requieren un mínimo de 60 días bajo temperaturas de -1 a 0 °C para madurar adecuadamente, mientras en frutos con firmeza inferior a 58 N el periodo de conservación a estas temperaturas se reduce a menos de 30 días (Villalobos-Acuña y Mitcham, 2008). Es una variedad que tolera bien el almacenamiento refrigerado en atmósfera convencional (-0,5 a -1 °C y 95 % HR durante 5 a 7 meses) y controlada (-0,5 °C, 95 % HR, 1,5 a 2 % O<sub>2</sub> y 1 a 1,5 % CO<sub>2</sub> durante 10 a 11 meses) (Benítez, 2001). Esta variedad adquiere la madurez de consumo cuando la firmeza de pulpa se encuentra en el rango 13 a 18 N.

### 1.2. Escala para la clasificación de daño por sol

Para evaluar el daño por sol en campo se realizó una escala basada en la clasificación de frutos de peras y manzanas rojas con daño por sol publicada por McClymont y col. (2016) y Felicetti y Schrader (2008a), respectivamente. Los niveles de síntomas presentes en la cara expuesta al sol se observan en la Figura 7 y se describen de la siguiente manera:

- Sano (S): frutos sin daño por sol, no presentaban ningún signo de daño o deterioro relacionados a la exposición al sol en la piel. La coloración superficial de la piel presentaba tonos verdes claros sin presencia de regiones con tonos blanquecinos, amarillentos, rojizos y/o marrones.
- *Daño blush (B)*: frutos que presentaban una alteración de la coloración normal de la piel en un tono rosado/rojizo sobre la cara expuesta a sol. Esta mancha no es considerada un defecto comercial (Ministerio de Agricultura, 2018), al contrario, su presencia le otorga valor agregado al producto incluyéndose en categorías superiores.
- *Daño leve (L)*: frutos que presentaban una leve decoloración o coloración amarillenta sobre el área expuesta al sol. Estos frutos pueden ingresar a empaque si el tamaño de la mancha no supera el 5 % de la cobertura, pero son destinados a calidades bajas como fruta de 2da y/o 3ra calidad (Ministerio de Agricultura, 2018).
- *Daño moderado (M)*: frutos que presentaban una mancha de coloración amarillo-amarronada en la cara expuesta al sol. Estos frutos son descartados en campo o en las líneas de empaque, con destino industrial.
- *Daño grave (G)*: frutos que presentaba coloración marrón y algunas manchas de tejido necrótico. Estos frutos no son comerciables y se descartan durante la cosecha.

En la figura 6 se presenta la escala utilizada para clasificar visualmente los frutos a campo al momento de la cosecha en este trabajo.

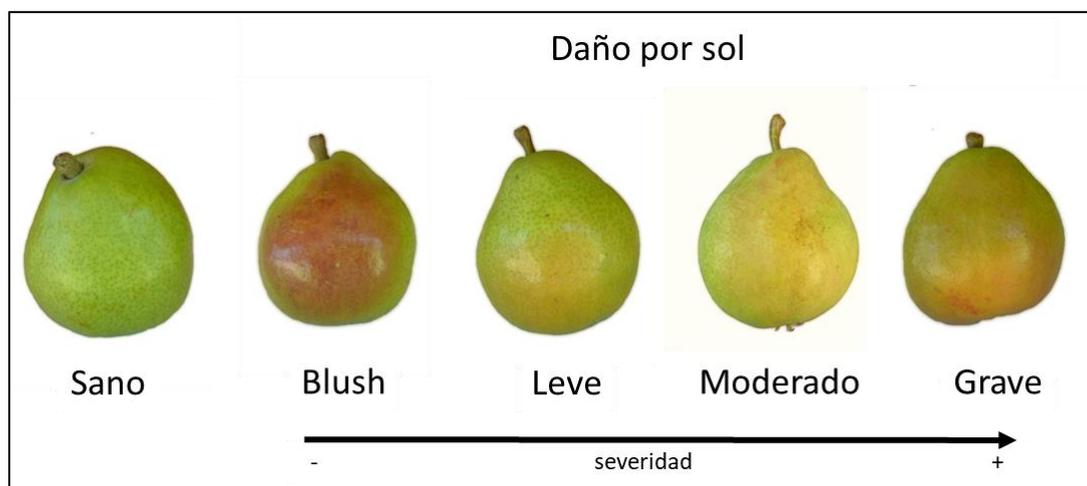


Figura 7. Escala de nivel de daño por sol broncizado en frutos de pera var. Anjou.

### 1.3. Diseño experimental y muestreo

#### 1.3.1. Sistemas experimentales

Todos los ensayos se realizaron en la parcela descrita en la sección 1.

##### 1.3.1.1 Sistema experimental A: Frutos con daño por sol en cosecha bajo distintos tratamientos de fertilización cálcica

En la parcela de trabajo se seleccionaron 3 filas (28 plantas por filas) de la var. Anjou. Se eligieron árboles homogéneos de un diámetro basal de tronco aproximado de 30 cm y altura de 5 m, con una carga frutal de 300-350 frutos. Se definieron 10 unidades observacionales, constituidas cada una por 3 árboles consecutivos. Sobre estas unidades observacionales se sortearon 2 tratamientos con relación al plan de fertilización (Figura 8):

- Sin calcio: fertilización tradicional vía suelo para la var. Anjou (130 unidades de nitrógeno por hectárea disponible por año). Se utilizó como fertilizante base nitrato de amonio (27-0-0). En las parcelas los riegos se realizaron por sistemas de riego superficial por manto, sobre los cuales se estima una eficiencia de riego y aplicación de fertilizantes del 65 %, por lo cual se aplicaron 200 unidades de nitrógeno por hectárea para cumplir con el requerimiento de 130 unidades. Se aplicaron 740 kg de nitrato de amonio por hectárea por año (0,6 kg por planta).
- Con calcio: fertilización tradicional para la var. Anjou con la incorporación calcio vía suelo. Se utilizó como fertilizante nitrato de calcio (15-0-0, 19 CaO). Se realizaron aportes anuales de 130 unidades de nitrógeno y 160 unidades de calcio. Para cumplir estos requerimientos, y considerando una eficiencia de riego del 65 %, se aplicaron 1.300 kg del fertilizante por hectárea año (1,0 kg por planta).

Las fertilizaciones se dividieron en cuatro aplicaciones por temporada, iniciando 3 a 5 DDPF y repitiendo las dosis cada 15 días. Este periodo de tiempo se corresponde con la fase de acumulación de calcio en los frutos de pepita coincidente con las etapas fenológicas plena floración hasta 50 DPPF (Benítez y col., 2005; Monge y col., 1994). Las aplicaciones de los fertilizantes se realizaron posterior a un riego, de forma manual, alrededor de las plantas. Este manejo se realizó durante 4 años consecutivos, desde el 2014 al 2018 inclusive.

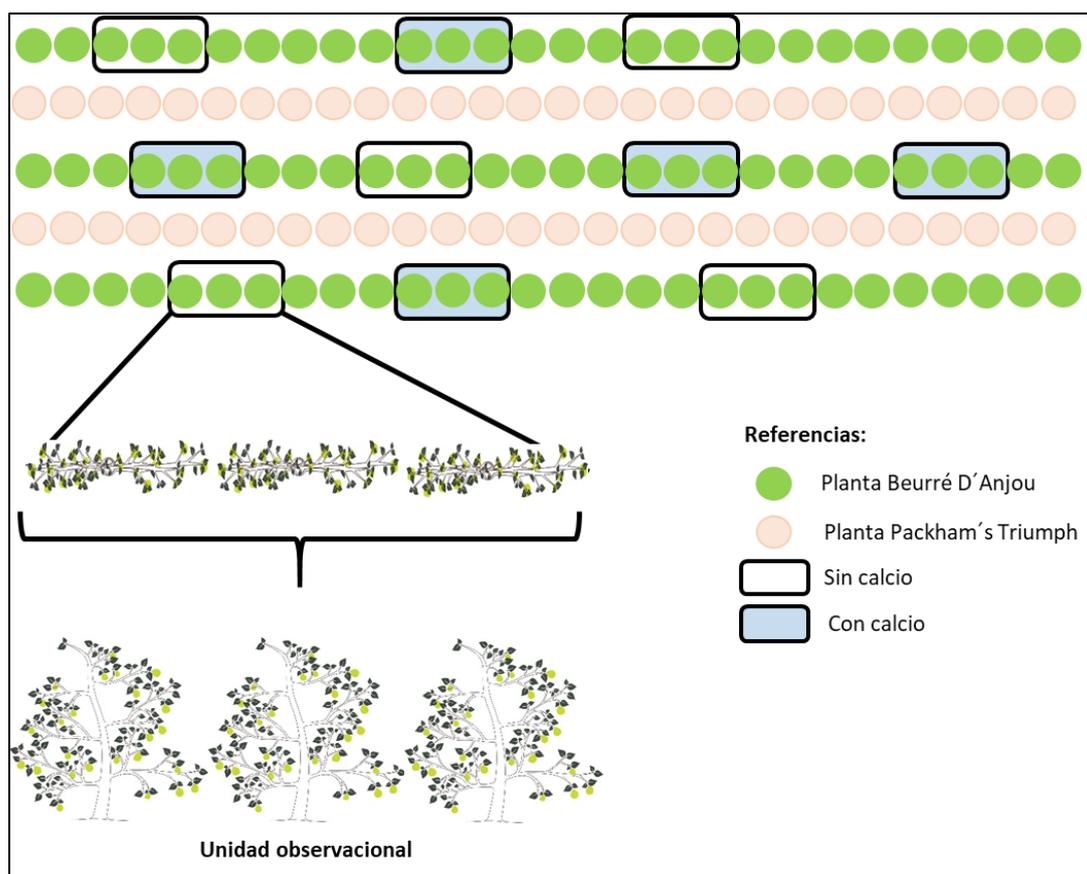


Figura 8. Diagrama de parcela experimental de trabajo.

La fecha de autorización de cosecha para esta variedad establecida por el Programa Regional de Madurez y autorizada por SENASA para dicha temporada fue el 23 de enero. Sin embargo, el 6 de febrero los índices de madurez se consideraron adecuados para la cosecha con destino larga conservación (Calvo y col., 2019). El 7 de febrero de 2019 se realizó la recolección de muestras.

Se cosecharon todos los frutos de las plantas de cada unidad observacional. Se cuantificó la cantidad de frutos y se midió el peso y diámetro de cada uno. Luego, se clasificaron según la escala de daño por sol descrita previamente en esta sección (Figura 7). Se registró el número de frutos por cada categoría de daño por sol, y los frutos con daño grave se descartaron. En cada unidad observacional se armaron bandejas de 20 frutos de las categorías sin daño por sol y con daño por sol *blush*, Leve y Moderado. De esta forma se trabajó con muestras compuestas por 20 frutos. Para homogeneizar las muestras se utilizaron frutos con un peso entre 127 a 164 g (valor definido a partir de los cuartiles 1 y 3 de la media de un muestro de peso aleatorio a campo de 3.000 frutos (Tabla 3). Se trabajó con 5 réplicas biológicas por tratamiento y nivel de daño por sol (20 frutos por replica).

**Tabla 3. Resumen de medidas para la determinación del peso promedio de frutos de pera Anjou en el monte frutal durante la cosecha 2019.**

Variable	N	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3
Peso	3.000	146,18	28,43	53	279	143	127	164

Las muestras destinadas para las determinaciones al momento de cosecha (Capítulo 1, 2-Ensayo A y 5-Etapa 1) fueron identificadas y trasladadas al laboratorio para su acondicionamiento y procesamiento.

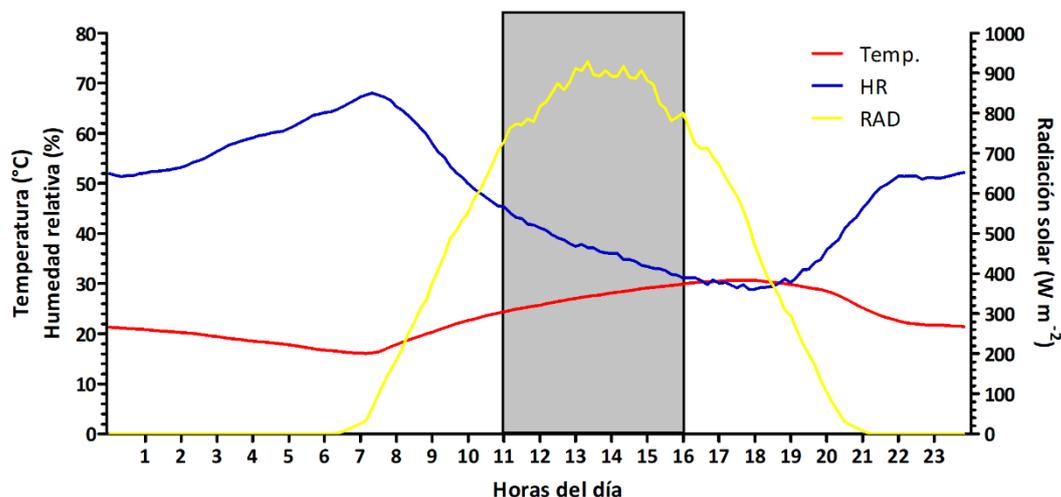
Las muestras destinadas para las determinaciones postcosecha (Capítulo 3 y 5-Etapa 2) fueron acondicionadas en campo para su almacenaje en frío y tratadas con una solución de Captan 0,4 % p/v, para el control de enfermedades fúngicas. Se almacenaron 15 cajas de 100 frutos. Cada caja fue rotulada con su respectivo tratamiento y nivel de daño, y trasladada a una cámara frigorífica de un establecimiento comercial para su conservación en frío convencional a  $0 \pm 0,5$  °C y 95 % HR. Las muestras fueron retiradas para su evaluación a los 145 días de conservación, periodo de tiempo necesario para que la var. Anjou cumpla con su requerimiento de frío y pueda madurar adecuadamente desarrollando una textura mantecosa y jugosa (Villalobos-Acuña y Mitcham, 2008; Eccher Zerbini, 2002).

### **1.3.1.2. Sistema experimental B: Exposición de frutos a un evento de estrés por elevada radiación y temperatura**

En la parcela de trabajo se seleccionaron 20 árboles homogéneos de un diámetro basal de tronco aproximado de 30 cm y altura de 5 m, con una carga frutal de 300-350 frutos, no utilizados en los tratamientos descritos en 1.3.1.1. Durante los meses de enero y febrero 2020, se cosecharon frutos de estos árboles para el estudio de expresión de genes en piel de frutos de pera Anjou durante la exposición directa a luz solar en campo (Capítulo 2 – Ensayo B).

#### **1.3.1.2.1. Determinación del tiempo de exposición a la luz solar directa**

Durante los primeros días de febrero del 2020, se realizaron exposiciones de frutos para determinar el tiempo máximo de exposición sin promover en los tejidos daño necrótico. Las exposiciones se realizaron desde las 11 h hasta las 16 h, periodo con mayor incidencia de radiación solar en la zona del Alto Valle (Figura 9). Los días seleccionados para las pruebas fueron días despejados (sin nubosidad), con pronóstico de altas temperaturas ( $> 30$  °C), elevada radiación solar ( $>1500$  W m<sup>-2</sup>), baja humedad relativa ( $< 40$  %) y con viento escaso o bajo ( $< 10$  km h<sup>-1</sup>).



**Figura 9. Variación de las condiciones meteorológicas promedio del mes de enero en el Alto Valle.** Datos obtenidos de la Estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Cinco Saltos, Rio Negro. Los valores corresponden a la media de cada variable de los 31 días del mes de enero del año 2020, datos tomados cada 10 min durante 24 h al día. Temp.: temperatura del aire; HR: humedad relativa ambiente; RAD: radiación solar incidente.

Inicialmente, los frutos utilizados para las pruebas fueron colocados en bandejas y ambientados a 23 °C para homogeneizar la temperatura de inicio de los ensayos. Se tomó la temperatura inicial de cada fruto antes de la exposición por medio de imágenes térmicas con una cámara térmica FLIR C2 (Flir Systems OÜ, Estonia, 2017). Las imágenes se tomaron a una distancia focal de 50 cm, con una resolución espacial de 1,68 mm y una emisividad de 0,95 (Hellebrand y col., 2001). A las 11 de la mañana, los frutos fueron expuestos a la luz solar directa en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue (Figura 10).



**Figura 10. Exposición de frutos de pera Anjou a la radiación solar directa en predio de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue.**

Se siguió la temperatura de cada fruto por imágenes térmicas cada 15 min durante 4 horas. Asimismo, se midió la temperatura ambiente alrededor de los frutos por medio de termocuplas de sondas T asociadas a un adquisidor de datos (Lutron BTM4208SD) y la radiación incidente por medio de ceptómetro Cavadevices con un sensor externo.

Durante la exposición, se fueron retirando frutos a distintos tiempos y con distintos valores de temperatura superficial, con el fin de observar los posibles síntomas que estos desarrollaron bajo las condiciones de exposición a las cuales fueron sometidos.

### **1.3.1.2.2. Experimentos de exposición a la luz solar directa para la determinación de la expresión de genes de enzimas relacionados a los componentes de la pared celular**

Los experimentos se desarrollaron con un tiempo máximo de exposición a la luz solar directa de 120 min, en días despejados con pronóstico de temperaturas máximas superiores a 30 °C, elevada radiación solar ( $> 1500 \text{ W m}^{-2}$ ), baja humedad relativa ( $< 40 \%$ ) y con viento escaso o bajo ( $< 10 \text{ km h}^{-1}$ ). El horario de exposición se inició a las 11 h. Los muestreos para evaluar la expresión de genes se realizaron a los tiempos 0, 60 y 120 min. Asimismo, los frutos expuestos fueron guardados durante 24 h post-exposición con el objetivo de asegurar a través de determinaciones bioquímicas (pérdida de electrolitos, contenido relativo de agua y peroxidación de lípidos) que se había logrado promover estrés oxidativo en los tejidos.

Se realizaron un total de siete experimentos bajo las condiciones anteriormente descritas. Todos los experimentos se realizaron durante el mes de febrero. Los frutos empleados se cosecharon el día anterior a la realización de éste. En el día de cada experimento, los frutos se colocaron en un ambiente a 23 °C, a partir de las 7 de la mañana, con el fin de homogeneizar la temperatura antes de iniciar la exposición. Se utilizaron 20 frutos por experimento.

Durante cada experimento se realizó el seguimiento de la temperatura ambiente alrededor de los frutos por medio de termocuplas de sonda T, junto a la radiación solar incidente por ceptómetro con sensor puntual. La temperatura superficial de los frutos se midió continuamente por medio de imágenes térmicas y por termocuplas de sonda T colocadas bajo la piel de 3 frutos por bandeja. Estos frutos no fueron empleados como material vegetal durante la extracción de tejido.

En la Tabla 4, se exponen las fechas de realización de cada experimento, las condiciones meteorológicas y las temperaturas superficiales medias de los frutos alcanzadas en cada uno de los tiempos de muestreo de cada experimento.

**Tabla 4. Condiciones meteorológicas y temperatura superficial media de los frutos registradas durante la exposición a luz solar directa de los distintos experimentos.**

ENSAYO	Fecha	Tiempo (min)	TSF (°C)	Tamb (°C)	RAD (W m <sup>-2</sup> )
1	12/2/2020	0	22,9	28,2	1658
		60	42,9	32,9	1666
		120	47,7	36,8	1633
2	13/2/2020	0	25,5	28,9	1699
		60	43,2	33,2	1650
		120	50,3	38,1	1701
3	14/2/2020	0	24,0	29,8	1799
		60	42,8	30,4	1580
		120	48,0	33,4	1585
4	17/2/2020	0	24,8	25,9	1672
		60	42,7	31,2	1689
		120	48,5	35,3	1597
5	18/2/2020	0	25,6	26,5	1806
		60	40,6	28,0	1741
		120	47,8	33,4	1655
6	20/2/2020	0	23,5	26,1	1547
		60	41,3	32,0	1623
		120	47,3	37,1	1663
7	26/2/2020	0	25,4	29,4	1723
		60	45,3	35,0	1698
		120	48,7	33,0	1629

TSF: Temperatura Superficial de Frutos; Tamb: Temperatura ambiente; RAD: radiación solar incidente.

En la Tabla 5, se observa las diferencias entre la temperatura superficial en los frutos y la temperatura ambiental para cada tiempo de muestreo. Las condiciones en las cuales se desarrolló cada uno de los experimentos fueron similares, sin presentar diferencias estadísticas para cada uno de los momentos de extracción/muestreo (datos no mostrados).

**Tabla 5. Condiciones promedio de los ensayos realizados a campo para los distintos tiempos de extracción de muestras.**

Tiempo (min)	TSF (°C)	Tamb (°C)	RAD (W m <sup>-2</sup> )
0	24,5 ± 1,1 a	27,8 ± 1,6 a	1700,6 ± 89,0 a
60	42,7 ± 1,5 b	31,8 ± 2,2 b	1663,9 ± 52,7 a
120	48,3 ± 2,1 c	35,3 ± 2,1 c	1637,6 ± 39,7 a

TSF: Temperatura Superficial de Frutos; Tamb: Temperatura ambiente; RAD: radiación solar incidente. Los valores son la media (n=7). Letras minúsculas distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas. (DGC; p ≤ 0,05).

Durante la exposición a la radiación solar se extrajo tejido vegetal en los tiempos 0, 60 y 120 min. Cada muestra estuvo formada por piel de 5 frutos distintos sobre el área expuesta a la luz solar. Su extracción y acondicionamiento se realizó según descripción realizada en la sección Materiales y Métodos 8.3.

Finalizada la exposición, cinco frutos de cada experimento fueron conservados en laboratorio a 23 °C por 24 h. Sobre estos frutos se extrajo la piel de la cara expuesta (E) y no expuesta (NE) a la luz solar para evaluar el metabolismo oxidativo de los tejidos.

### **1.3.1.3. Sistema experimental C: Evolución de la maduración de frutos con daño por sol y bajo distintos tratamientos de fertilización cálcica luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional**

Para estudiar la evolución de los tejidos con daño por sol *blush* y leve durante la maduración (Capítulo 3 y 5-Etapa 2) se procedió, en primer lugar, a determinar las etapas del climaterio en los frutos de pera. Se utilizaron las muestras acondicionadas y almacenadas en cámaras frigoríficas cosechadas durante la temporada 2018/2019.

Luego del periodo de conservación por 145 días en cámara de frío convencional, se extrajeron muestras para obtener las curvas de producción de etileno. El periodo de conservación se determinó en base a bibliografía existente. Investigaciones realizadas para esta variedad de pera determinan que una conservación por 5 meses promueve una adecuada maduración con un desarrollo de texturas fundentes y mantecosas alrededor del onceavo día post-conservación a temperaturas ambiente (Dong y col., 2018).

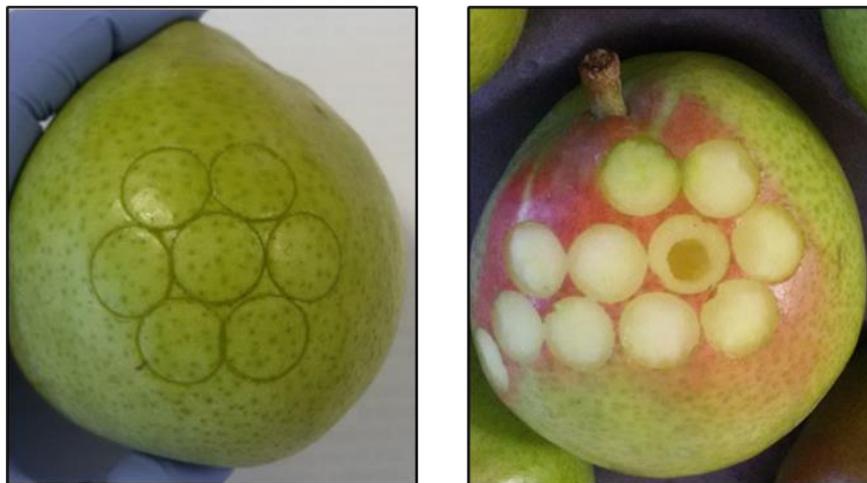
A partir de las curvas de producción de etileno se determinaron las tres fases de climaterio de los frutos: preclimaterio, climaterio y postclimaterio. Con esta información, se definieron tres momentos de muestreo para evaluar el proceso de maduración de los frutos con y sin daño por sol.

Las cajas de muestras de cada categoría de daño se extrajeron de la cámara de conservación y se acondicionaron en un ambiente con luz tenue y temperatura constante a 20 °C (condiciones asociadas a lo que se denomina "Vida en estante"). Se mantuvieron bajo estas condiciones por 18 días, periodo determinado para realizar tres muestreos asociados con el avance de la maduración de los frutos de pera. Se realizaron extracciones de muestras compuestas por 20 frutos en cada etapa climatérica.

## **2. Material vegetal**

El tejido vegetal estudiado en este trabajo fue piel de pera, término que incluye el tejido epidérmico e hipodérmico y las primeras capas de pulpa. La piel de los frutos

se limpió con detergente neutro biodegradable 5 % v/v (Cicarelli) y se enjuagó con agua destilada. Luego, sobre el área de estudio de cada fruto se realizaron perforaciones con un sacabocado de 1 cm de diámetro (Figura 11). El tejido se extrajo cuidadosamente con bisturí en forma de discos de 0,9 cm de diámetro, 0,5 mm de espesor y 0,05 g aproximadamente de peso fresco. El número de discos extraídos por frutos dependió del tamaño de la zona afectada por el daño por sol (10 a 15 discos/fruto promedio).



**Figura 11. Extracción de tejido de piel de peras var. Anjou.** El material se extrajo en formas de discos de 0,5 mm de espesor sobre las áreas con daño por sol.

El tejido obtenido se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido y se molió y homogeneizó. Se fraccionó en alícuotas dentro de tubos eppendorf de 2 ml, separando material para cada una de las determinaciones. Algunas medidas se realizaron inmediatamente, y para otras el tejido fue acondicionado y almacenado en nitrógeno líquido hasta su uso.

### 3. Parámetros evaluados en campo

#### 3.1. Carga total, peso y diámetro de frutos

Al momento de la cosecha, para cada unidad observacional se determinó la carga total de frutos. Para ello se descargó la totalidad de las 3 plantas, y se cuantificó el número total de frutos. El valor se dividió en 3 obteniendo la carga total por planta expresada como número de frutos por planta. De cada repetición se tomaron 300 frutos y se midió diámetro y peso de cada uno. A partir de estos datos se determinó el peso y diámetro promedio de cada repetición.

### 3.2. Incidencia del daño por sol

En cada repetición, la carga total se clasificó en los distintos niveles de daño por sol descritos anteriormente en esta sección (Figura 6). Se cuantificó el número de frutos por cada nivel de daño por sol. A partir de estos datos se estimó el porcentaje de frutos en cada categoría.

### 4. Evaluación de índices de madurez y calidad

El estado de madurez y calidad de los frutos se determinó sobre el área dañada por el sol. Las determinaciones de color se realizaron sobre la piel, mientras los índices de madurez se hicieron sobre la pulpa ubicada debajo del área con daño por sol hasta una profundidad de 10 mm. Los resultados de cada réplica biológica corresponden al valor medio de 20 frutos. Cada variable se analizó con un  $n = 5$  (replicados biológicos).

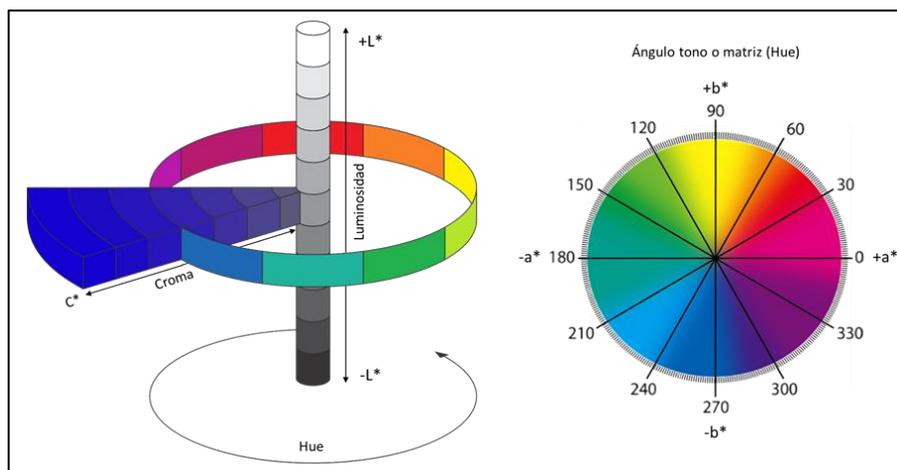
#### 4.1 Cuantificación del color superficial de la piel

En cada fruto se realizaron tres mediciones en distintos sectores del área con daño por sol. Se utilizó un colorímetro CR-300 (Minolta, Japón) para medir las coordenadas CIELAB (valor o luminosidad  $L$ ;  $a^*$ ;  $b^*$ ), a partir de las cuales se calcularon los valores: ángulo de matriz o tono (HUE) y saturación (CROMA), por medio de las fórmulas (Mesa Juliani, 2015):

$$Croma = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$HUE = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{180^\circ}{\pi} \text{ (si es negativo sumar } 360^\circ\text{)}$$

El color es una característica tridimensional compuesta de los atributos: luminosidad o claridad del color; tono o ángulo de matriz que define el color; y saturación o croma que representa la pureza o profundidad del color, asociado a la variación del color en la escala de grises (Figura 12).



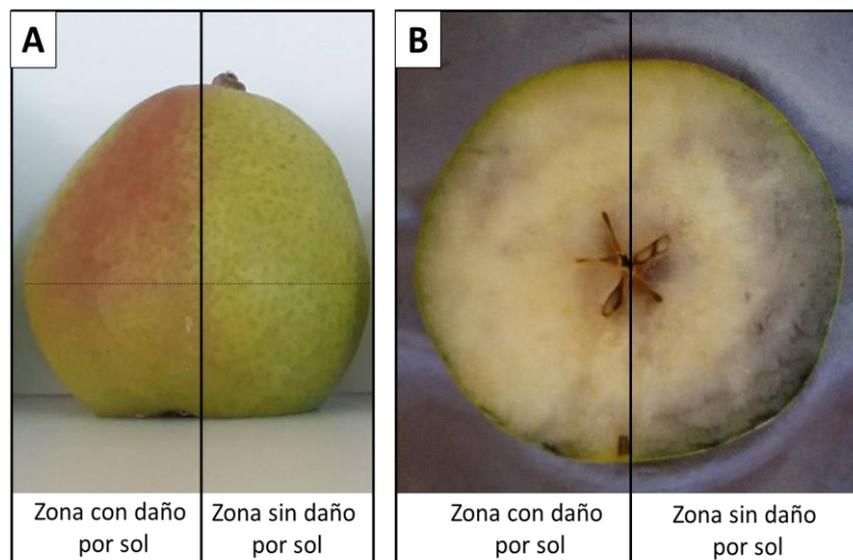
**Figura 12. Representación esquemática de la Teoría del Color.** Tono o ángulo matriz (HUE) varía de 0° a 360°, representando el color. Luminosidad o valor (L) varía de 0 a 100, refleja la claridad del color. Saturación (CROMA) varía de 0 a 100 refleja la pureza del color.

#### 4.2. Firmeza de pulpa

La firmeza de la pulpa se determinó a través de un penetrómetro Effigi modelo 327 (Italia), con émbolo de 8 mm. Sobre el área afectada por daño por sol y en la zona ecuatorial del fruto. Se retiró la piel y se midió la fuerza desarrollada al penetrar la pulpa del fruto hasta 5 mm de profundidad. Los resultados fueron expresados en newton (N) (Mitcham y col., 1996).

#### 4.3. Degradación de almidón

La cuantificación de la degradación de almidón se realizó empleando el reactivo de Lugol (0,33 % p/p de  $I_2$  y 0,66 % p/p KI). Los frutos fueron cortados en el eje ecuatorial, una de las caras fue sumergida durante 1 minuto en la solución de Lugol. Como se aprecia en la Figura 13, se evaluó la tinción en la pulpa ubicada por debajo del área con daño por sol, hasta una profundidad de 10 mm. Las tinciones fueron comparadas con los valores de las fichas de test de almidón de INTA, evaluando el área afectada por al daño por sol. El valor 0 % indica un tenor máximo de almidón, mientras 100 % indica ausencia del este (Candan y Calvo, 2015). Este parámetro se evaluó únicamente en los frutos al momento de cosecha.



**Figura 13. Determinación de la degradación de almidón en tejidos con daño por sol en frutos de pera Anjou.** (A) Fruto con daño por sol *blush* sobre cara izquierda, y sin daño por sol en cara derecha. (B) Fruto de imagen A cortado sobre eje ecuatorial con tinción de lugol (prueba de degradación de almidón). Se observa que la pulpa bajo el área afectada por el daño por sol presenta poca coloración con el reactivo lugol, indicando degradación de este compuesto. Mientras la pulpa debajo del tejido sin daño por sol presenta una coloración azul intensa, indicando presencia de almidón.

#### 4.4. Contenido de sólidos solubles

Para la determinación de contenido de sólidos solubles, se extrajeron trozos de pulpa por debajo de la zona afectada por daño por sol de un espesor no mayor a 10 mm. Con el material de los 20 frutos de cada réplica se realizó la extracción de jugo con una juguera PE-EJ306 (Peabody, China). El contenido de sólidos solubles se midió por medio de un refractómetro digital autocompensado Atago 0-32 % (Tokio, Japón). Los resultados se expresaron en grados Brix ( $^{\circ}$ Brix) (Mitcham y col., 1996).

#### 4.5. Acidez titulable

Para la determinación de la acidez titulable se empleó el jugo obtenido en 4.4. Se realizó una dilución 1/10 del jugo con agua destilada y se tituló una alícuota de 30 ml con NaOH 0,100 N hasta pH 8,20, controlando con peachímetro digital Peak Instruments Inc. Modelo S-610L (Houston, E.E.U.U.) (Mitcham y col., 1996). El resultado se expresó como gramos de ácido málico por litro.

#### 4.6. Tasa de producción de etileno

Esta determinación se utilizó para medir etileno en las muestras destinadas al análisis postcosecha, correspondientes a los Capítulos 3 y 5-Etapa 2. Las mediciones se

realizaron a partir de la salida de cámara (145 días a  $0 \pm 0,5$  °C y 95 % HR) de las muestras y durante 17 días de vida en estante a 20 °C.

La tasa de producción de etileno se determinó por cromatografía gaseosa, en el servicio del laboratorio del Área Postcosecha de la Estación Experimental del Alto Valle, EEA INTA. Para cada una de las réplicas biológicas, se tomó un fruto entero y se confinó en frascos de 1,5 L con cierre hermético. Se extrajeron muestras de la fase gaseosa correspondiente al espacio de cabeza del frasco cada 48 h, empleando una jeringa de 1 ml. Las mismas se analizaron en un cromatógrafo de gases (GC14-A, Shimadzu, Japón) equipado con un detector FID, columna de alúmina activada e inyector a una temperatura de 240 °C, 40 °C y 110 °C, respectivamente. Se utilizó helio como fase móvil. Una vez obtenida la concentración de etileno se calculó la tasa de producción de etileno. Los resultados se expresaron en nanolitro de etileno por gramo de peso fresco y por hora.

A partir de las curvas de etileno obtenidas se definieron los periodos de maduración de los frutos: preclimaterio, climaterio y postclimaterio. En base a estos, se seleccionaron los días de muestreo para la realización de las determinaciones de postcosecha.

### **5. Determinaciones fisiológicas y bioquímicas**

Se realizó una caracterización descriptiva del estado fisiológico y bioquímico de la piel de los frutos estudiados. Se emplearon las muestras obtenidas en la sección 2 Para la determinación de variables fisiológicas como pérdida de electrolitos y contenido relativo de agua, se emplearon discos de tejido fresco sin moler ni congelar con nitrógeno líquido.

#### **5.1. Pérdida de electrolitos**

Se extrajeron 20 discos de un diámetro de 4,5 mm por muestra. Se introdujeron en un tubo con 20 ml de agua bidestilada. Las muestras se incubaron durante 24 horas agitando a 130 rpm en agitador plano orbital BIOMITN modelo BN021. Luego, se registró la conductividad eléctrica inicial (Cei) con un conductímetro OHAUS modelo ST10-C-B. A continuación, se colocaron en baño termostatzado a 100 °C durante 1 h, y luego se congelaron en un freezer a -20 °C durante 24 h, para asegurar la pérdida total de integridad de membrana. Las muestras se descongelaron hasta alcanzar la temperatura ambiente por agitación constante a 130 rpm. Finalmente, se registró la conductividad eléctrica final (Cef) (Campos y col., 2003). Como blanco se empleó agua bidestilada. El valor de pérdida de electrolito se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Pérdida de electrolitos (\%)} = \frac{(C_{ei})}{(C_{ef})} \times 100 \%$$

### 5.2. Contenido relativo de agua (CRA)

Se emplearon 20 discos de piel fresca de 4,5 mm de diámetro por repetición, registrando el peso fresco (PF). Se sumergieron en 1 ml de agua destilada dentro de un tubo Falcon, dejándolo en reposo por 24 h. Se pesó nuevamente, previa eliminación de excedentes de agua, obteniendo el peso a turgencia máxima (PTM). Finalmente, se llevó a estufa por 24 h a 72 °C, registrando el peso seco (PS). El CRA se determinó por la fórmula:

$$\text{Contenido relativo de Agua (\%)} = \frac{(PF - PS)}{(PTM - PS)} \times 100 \%$$

### 5.3. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofilas y carotenoides en la piel de los frutos se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Lichtenthaler y Buschmann, 2001) con modificaciones. Se emplearon 0,1 g de muestra y se agregaron 2 ml de etanol 95 % v/v. Las muestras se calentaron en baño termostático durante 2 h a 65 °C, luego se enfriaron en cama de hielo durante 15 min y se centrifugaron a 5 °C a 500 x g por 10 min. Durante todo el procedimiento, las muestras se mantuvieron en oscuridad para evitar la degradación de los pigmentos. Se midió la absorbancia a 470,0; 648,6 y 664,1 nm en espectrofotómetro UV-Vis DU 800 (Beckman Coulter, Alemania). El contenido de clorofila total se obtuvo por la sumatoria de los contenidos de clorofila *a* y *b* para cada repetición. Los resultados se expresaron como miligramo de cada pigmento por gramo de muestra fresca.

Las fórmulas utilizadas fueron:

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g ml}^{-1}) = (13,36 \times A_{664,1} - 5,19 \times A_{648,6})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g ml}^{-1}) = (27,43 \times A_{648,6} - 8,12 \times A_{664,1})$$

$$\text{Carotenos } (x \pm c) \text{ } (\mu\text{g ml}^{-1}) = \frac{(1.000 \times A_{470} - 2,13 \text{ Chl } a - 97,64 \text{ Chl } b)}{209}$$

Para pasar  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a  $\text{mg g}^{-1}$ :

$$X'' (mg g^{-1}) = \frac{X(\mu g ml^{-1}) \times VE \times FD}{1.000 \times P}$$

VE (ml): volumen de extracción.

FD: factor de dilución.

P (g): peso fresco de la muestra.

#### 5.4. Peroxidación de lípidos de membranas

La estimación del daño presente en membranas se realizó a través de la determinación del grado de peroxidación de lípidos. Para ello, se midió la concentración de complejos químicos formados durante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con subproductos generados por la peroxidación de lípidos, como el malondialdehído (MDA). Se realizó el protocolo descrito por Hodges y col. (1999), con modificaciones. Se emplearon 0,25 g de muestra y se homogeneizó con 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % p/v. Se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C por 5 min. Luego, se extrajeron dos alícuotas de 0,5 ml del sobrenadante, colocándolas en tubos de ensayo distintos. A una alícuota se le adicionaron 2 ml de TCA 20 % p/v, y a la otra TBA 0,1 % p/v en TCA 20 % p/v. Los tubos fueron calentados a 95 °C por 30 min en baño termostático y enfriados inmediatamente en cama de hielo. Luego, se centrifugaron a 10.000 x g a 4 °C durante 10 min y se los dejó en reposo en heladera durante 1 min. Las muestras con TCA 20 %/TBA 0,1 %, se midieron a 400, 532 y 600 nm. Las muestras con TCA 20 % se midieron a 532 y 600 nm. Todas las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis DU 800 (Beckman Coulter, Alemania). Los resultados se expresaron como nmol de MDA por g de tejido fresco. Las fórmulas empleadas para los cálculos fueron:

$$MDA (nmol ml^{-1}) = \frac{A - C - B}{157000} \times 10^6$$

Dónde:

$$A = A^{TBA532} - A^{TBA600}$$

Estimación bruta de MDA.

$$B = (A^{TBA440} - A^{TBA600}) \times e$$

Interferencia por sacarosa (e: 0,0571428571).

$$C = A^{TCA532} - A^{TCA600}$$

Interferencia por antocianinas.

Para pasar nmol ml<sup>-1</sup> a nmol g<sup>-1</sup>:

$$\text{Peroxidación de lípidos (nmol MDA } g^{-1}) = \frac{\text{MDA} \times \text{VE} \times \text{FD}}{\text{P}}$$

VE (ml): volumen de extracción.

FD: factor de dilución.

P (g): peso fresco de la muestra.

### 5.5. Metabolitos antioxidantes

#### 5.5.1. Obtención del extracto metanólico ácido

Se empleó 0,25 g de muestra y se homogenizó con 2 ml de metanol-HCl 32 % v/v:agua (159:1:40). Se agitó a 150 rpm durante 2 h a temperatura ambiente en agitador. Luego se centrifugó a 15.000 x g durante 20 min. El sobrenadante se trasvasó a un tubo eppendorff de 1,5 ml y se guardó en freezer a -20 °C hasta su uso. Este extracto se empleó para las determinaciones: capacidad antioxidante por método del 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), contenido de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu y antocianinas monoméricas totales por el método de pH diferencial.

#### 5.5.2. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los tejidos se determinó usando el método 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) descrito por Brand-Williams y col. (1995). Esta técnica evalúa la capacidad que posee una muestra en reducir el radical libre-DPPH, cuantificando la disminución de absorbancia a 515 nm comparada a un blanco base. Se emplearon los extractos metanólico ácidos, diluidos 1:3 con agua bidestilada. En cubetas de 2 ml se colocó 20 µl de extracto diluido y 780 µl de solución DPPH 1 mM (Aldrich EE.UU.) en metanol absoluto. Paralelamente, se preparó el blanco base con 20 µl de agua bidestilada. Las muestras se incubaron durante 30 min en oscuridad a 4 °C. Se midió la absorbancia a 515 nm en espectrofotómetro UV-Vis DU 800 (Beckman Coulter, Alemania). La capacidad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición de DPPH. Un mayor porcentaje de inhibición corresponde a una mayor capacidad antioxidante presente en el extracto analizado. La fórmula de cálculo usada fue:

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 \times \frac{(A_i - A_f)}{(A_i)}$$

Ai: Absorbancia base.

Af: Absorbancia muestras.

### 5.5.3. Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó por el protocolo descrito por Emmons y col. (1999) con modificaciones. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, reduciendo el ácido fosfomolibdotúngstico y formando complejos de color azul. Se utilizaron los extractos metanólico ácidos, diluidos 1:3 con agua bidestilada. La reacción se realizó en cubeta de 2 ml. Se colocó: 10 µl de muestra diluida, 780 µl de agua bidestilada y 50 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (Anedra, Argentina). Se dejó en reposo 8 min en oscuridad. Luego se agregó 150 µl de carbonato de sodio 20 % p/v (Anedra, Argentina). Se homogenizó la mezcla y se dejó en reposo durante 2 h a temperatura ambiente y oscuridad. Se midió la absorbancia a 760 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón una solución de ácido gálico 5 g l<sup>-1</sup> (Biopack, Argentina). Cada determinación se realizó por duplicado. El contenido de polifenoles totales se expresó en mg de ácido gálico equivalente (GAE) cada 100 g de tejido fresco.

### 5.5.4. Antocianinas monoméricas totales

Se determinó el contenido de antocianinas por el método de pH diferencial (Gorriti y col., 2009). Se emplearon los extractos metanólicos ácidos. Se realizaron en paralelo dos mezclas de reacción variando el medio (buffer de cloruro de potasio 0,025 M pH 1 o buffer de acetato de sodio 0,4 M pH 4,5). La relación muestra-buffer fue 1:3. El sistema se dejó en reposo por 15 min y se centrifugó 15 °C a 15.000 x g por 15 min. Se midió la absorbancia de ambas mezclas de reacción a 510 nm y 700 nm. Cada determinación se realizó por duplicado. El contenido de antocianinas monoméricas totales se expresó como miligramo de cianidina-3-glucósido (cyn-3-gluc) en 100 g de peso fresco.

Las fórmulas de cálculo empleadas fueron:

$$A (\text{antocianinas}) = (A_{510} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5}$$

$$ATM \text{ (mg cyn3gluc } 100 \text{ g}^{-1} \text{ PF)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100 \times VE}{\epsilon \times L \times P}$$

ATM: Antocianinas monoméricas totales.

PM: 449,2 g mol<sup>-1</sup> (peso molecular de cyn-3-gluc).

FD: factor de dilución.

VE: volumen de extracto (ml).

$\epsilon$ : 26900 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

L: camino óptico de la cubeta en cm.

P: peso fresco de la muestra (g).

### 5.6. Enzimas antioxidantes

La actividad enzimática se evaluó sobre extractos proteicos no desnaturalizados de las muestras, determinando el comportamiento de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX).

#### 5.6.1. Obtención de los extractos enzimáticos

Se utilizaron 0,2 g de muestra y se homogeneizaron con 2 ml de buffer de extracción fosfato de potasio 0,1 M pH 7,8; 0,05 % p/v PVPP y 0,01 mM EDTA. Se centrifugaron a 20.000 x *g* a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante se separó y guardó en ultra congelador (-80 °C) hasta su uso en las determinaciones de SOD y CAT.

Para la obtención del extracto enzimático de APX se realizó un procedimiento similar al anteriormente descrito empleando como buffer de extracción fosfato de potasio 0,1 M pH 7,5, 1 % p/v EDTA 0,1 M, 0,04 % p/v PVPP y 0,0176 % p/v ácido ascórbico. El sobrenadante se separó y guardó en ultra congelador (-80 °C) hasta su uso en la determinación de actividad de APX. Todas las enzimas se evaluaron espectrofotométricamente a 25 °C en un espectrofotómetro UV-Vis DU 800 (Beckman Coulter, Alemania).

#### 5.6.2. Determinación de la actividad de SOD

La actividad de SOD se determinó en base a la inhibición de la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) mediante radicales superóxido en presencia de esta, según la técnica descrita por Paoletti y col. (1986) modificada. Al agregar la muestra, el aporte de SOD compite con el NADH por los radicales libres, disminuyendo la velocidad de oxidación de NADH. La reacción se produce en presencia de EDTA-Mn y 2-mercaptoetanol.

El medio de reacción fue 800  $\mu$ l de buffer trietanolamina-dietanolamina (TEA-DEA) 100 mM (pH 7,4), 100  $\mu$ l de solución EDTA 100 mM más MnCl<sub>2</sub> 50 mM (pH 7,0), 40  $\mu$ l NADH 7,5 mM; a esta mezcla se le agregaron distintos volúmenes de muestra (4 valores entre 5 a 100  $\mu$ l por muestra), 100  $\mu$ l 2-mercaptoetanol 10 mM y se mezcló. Se dejó reaccionar durante 10 min a 20 °C y luego se midió el cambio de la absorbancia a

340 nm durante 5 min. Una unidad enzimática se definió 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 y partiendo de una línea de control (sin SOD) la cual representa la máxima velocidad de oxidación de NADH.

Las fórmulas para determinar la actividad de SOD fueron:

$$V_{SOD} = \frac{V_{MAX}}{1 \pm \left(\frac{Vol}{K_{0,5}}\right)}$$

VSOD: velocidad de oxidación de NADH en presencia de muestra.

VMAX: velocidad de oxidación de NADH control, en ausencia de SOD.

Vol: volumen de muestra empleado (5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l).

K<sub>0,5</sub>: volumen de muestra que contiene una unidad de SOD, expresado en las mismas unidades que Vol.

A partir de la fórmula anterior, se obtuvo la siguiente expresión para linealizar los datos:

$$\frac{1}{V_{SOD}} = \frac{1}{V_{MAX}} \pm \left( \frac{1}{V_{MAX} \times K_{0,5}} \right) \times Vol$$

A partir de los datos linealizados se construyeron rectas de regresión para cada réplica biológica con los valores de 1/VSOD en función de los volúmenes de muestra, estimando el valor de K<sub>0,5</sub> a partir de la pendiente y ordenada al origen, siendo K<sub>0,5</sub> el volumen de muestra que contiene una unidad de SOD. Las fórmulas fueron:

$$K_{0,5} = \frac{\textit{ordenada al origen}}{\textit{pendiente}}$$

$$\textit{Unidad SOD}/\mu\text{l} = \frac{1}{K_{0,5}}$$

Finalmente, el resultado se expresó en Unidades SOD mg<sup>-1</sup> peso fresco de muestra:

$$\frac{USOD}{mg} = \frac{USOD}{\mu l} \times \frac{1}{P/(VE \times FD)}$$

P (mg): peso de tejido utilizado en la obtención del extracto enzimático.

VE ( $\mu$ l): volumen utilizado en la obtención del extracto enzimático.

FD: dilución del extracto enzimático para emplearlo en la técnica (1/10)

### 5.6.3. Determinación de actividad de CAT

La actividad de la enzima catalasa se determinó siguiendo la disminución del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en el medio de reacción, a 240 nm durante 240 s, según la técnica descrita por Ma y Cheng (2003). El medio de reacción consistió en 10  $\mu$ l de  $H_2O_2$  30 % v/v y 2940  $\mu$ l buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7, y 50  $\mu$ l de muestra a 20 °C. La línea base de la reacción se estableció con absorbancia 1 y pendiente 0 utilizando un volumen de 10  $\mu$ l de  $H_2O_2$ .

La actividad de CAT se expresó como la cantidad de  $\mu$ moles de  $H_2O_2$  que se consumen por minuto por gramo de peso fresco ( $\mu$ mol  $min^{-1} g^{-1} PF$ ). La fórmula que se utilizó fue:

$$U (\mu mol min^{-1} g^{-1} PF) = \frac{\Delta(abs min^{-1})}{\epsilon \times L} \times VF \cdot x \left( \frac{VE}{VM \times P} \right)$$

$\Delta$  ( $abs min^{-1}$ ): pendiente de la reacción de disminución de absorbancia a 240 nm entre 20 a 120 s.

$\epsilon$ : 40  $M^{-1} cm^{-1}$ .

L: camino óptico de la cubeta en cm.

P (g): peso de tejido utilizado en la obtención del extracto enzimático.

VE ( $\mu$ l): volumen utilizado en la obtención del extracto enzimático.

VM ( $\mu$ l): volumen de muestra utilizado en la reacción.

VF ( $\mu$ l): volumen final del medio de reacción.

### 5.6.4. Determinación de actividad de APX

La actividad de APX se midió siguiendo la oxidación del ascorbato por disminución de la absorbancia a 290 nm, durante 60 s (Mishra y col., 1993). El medio de reacción fue 2000  $\mu$ l buffer de reacción (fosfato de potasio 50 mM, pH 7, 0,1 mM

EDTA sódico), 150  $\mu\text{l}$  ácido ascórbico 10 mM, al cual se incorporó 100  $\mu\text{l}$  de muestra. La reacción se desencadenó agregando 15  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % v/v, midiendo el cambio de absorbancia entre los 10 y 30 segundos de iniciada la reacción a 20 °C. El valor obtenido se corrigió restando la oxidación del ascorbato por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ausencia de la muestra.

La actividad de APX se expresó como la cantidad de  $\mu\text{moles}$  de ácido ascórbico que se consumen por minuto por gramo de peso fresco ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ ). La fórmula que se utilizó fue:

$$U (\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}) = \frac{\Delta(\text{abs. min}^{-1})}{\epsilon \times L} \times VF \times \left( \frac{VE}{VM \times P} \right)$$

$\Delta$  (abs.min<sup>-1</sup>): pendiente de la reacción de disminución de absorbancia a 290 nm entre 10 a 30 s.

$\epsilon$ : 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

L: camino óptico de la cubeta en cm.

P (g): peso de tejido utilizado en la obtención del extracto enzimático.

VE ( $\mu\text{l}$ ): volumen utilizado en la obtención del extracto enzimático.

VM ( $\mu\text{l}$ ): volumen de muestra utilizado en la reacción.

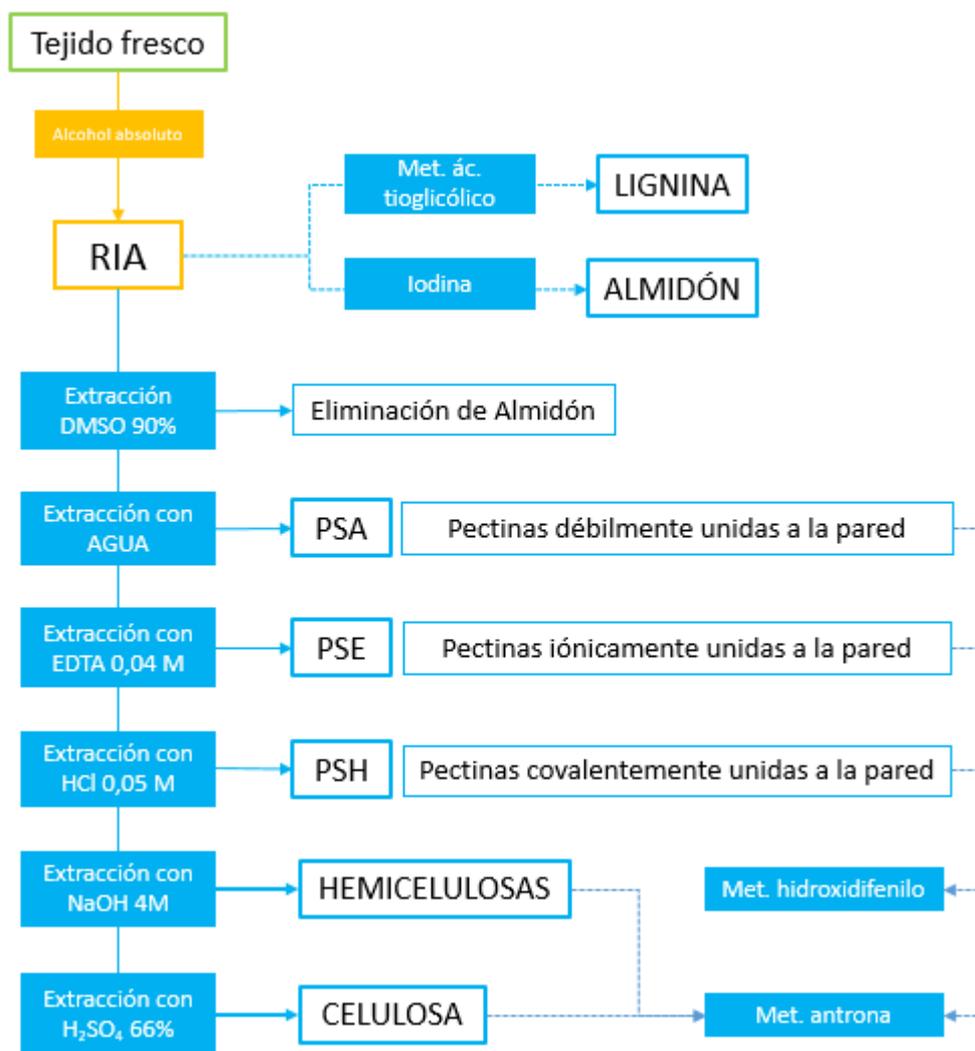
VF ( $\mu\text{l}$ ): volumen final del medio de reacción.

### 5.6.5. Cuantificación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas se midió sobre los extractos proteicos obtenidos en 5.6.1. La determinación se realizó por la técnica de Bradford (1976) con modificación. Los extractos se diluyeron en agua bidestilada en una relación 1/8. Alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de los extractos diluidos se mezclaron con 1 ml de reactivo de Bradford y se dejaron reposar 5 minutos. Se midió la absorbancia a 595 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón una solución de albumina bovina 0,5 mg ml<sup>-1</sup>. Cada determinación se hizo por triplicado. El contenido de proteínas totales se expresó como miligramos de proteína por cada gramo de tejido fresco.

## 6. Obtención, fraccionamiento y análisis de la pared celular

Para las determinaciones de obtención, fraccionamiento y composición de pared celular se utilizó el material vegetal obtenido en la sección 2. En la Figura 14 se describe esquemáticamente el proceso para obtener y fraccionar la pared celular.



**Figura 14.** Esquema del protocolo utilizado para la obtención, fraccionamiento y cuantificación de los componentes de la pared celular en piel de pera Anjou. RIA: Residuo Insoluble en Alcohol, PSA: Pectinas solubles en agua; PSE: Pectinas solubles en EDTA; PSH: Pectinas solubles en ácido.

### 6.1. Obtención del residuo insoluble en alcohol

La obtención del residuo insoluble en alcohol (RIA), conteniendo mayoritariamente los polisacáridos totales de la pared celular, se realizó de acuerdo con Rosli y col. (2004) con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 2,5 g de cada muestra de piel de fruto, y se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se suspendió en 10 ml de etanol absoluto y luego se hirvió a 85 °C durante 30 min bajo reflujo. La mezcla se filtró al vacío, y el residuo sólido se lavó tres veces con 5 ml de etanol absoluto. El residuo se secó durante 24 h a

38 °C en estufa y se determinó el peso final. El RIA total se expresó como mg RIA por cada 100 g PF de piel.

### 6.2. Determinación del contenido de almidón

El contenido de almidón en el RIA se determinó por la reacción con Iodina (Saladin y col., 2003). Una alícuota de 20 mg de RIA se re-suspendió en DMSO acidificado con HCl 8 N (4:1 v/v) y se calentó en baño de agua a 60 °C por 1 h, con agitación continua. Se centrifugó 10 min a 15000 x *g*, se preparó el sobrenadante y se mezclaron 100 µl del mismo con 100 µl de solución de Iodina (0,5 % KI y 0,25 % p/v I<sub>2</sub>) y 2 ml de agua destilada. La mezcla de reacción se dejó 15 min en reposo a temperatura ambiente y luego se midió la absorbancia a 600 nm en espectro UV-Vis DU 800 (Beckman Coulter). Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón almidón soluble (Cicarelli), partiendo de una solución madre 0,5 % p/v. El contenido de almidón se expresó como mg almidón por cada g RIA. Cada medición se efectuó por duplicado.

### 6.3. Eliminación de almidón

Se pesó en balanza analítica 25 mg de RIA por muestra. Se colocó en un erlenmeyer con 5 ml de DMSO 90 % v/v y se dejó 48 h en agitación (130 rpm) a temperatura ambiente. Luego, se recuperó el residuo sólido por filtración en vacío y se realizaron dos lavados con 1 ml de DMSO 90 % v/v. Este procedimiento tuvo como finalidad extraer el almidón y otros carbohidratos presentes en los tejidos vegetales, los cuales representan interferencias para la cuantificación de los polisacáridos de la pared celular (Carpita y Kanabus, 1987).

### 6.4. Obtención de las fracciones enriquecidas de pectinas

Las pectinas se separaron en tres fracciones enriquecidas siguiendo el protocolo de Nara y col. (2001-9 y Rosli y col. (2004) con modificaciones:

- Pectinas Solubles en Agua (PSA): pectinas débilmente unidas a la pared celular.
- Pectinas Solubles en EDTA (PSE): pectinas iónicamente unidas a la pared celular.
- Pectinas Solubles en ácido clorhídrico (PSH): pectinas fuerte o covalentemente unidas a la pared celular.

El RIA sin almidón se re-suspendió en 25 ml de agua bidestilada. La mezcla se agitó (130 rpm) durante 14 h a temperatura ambiente. Luego, se filtró al vacío y el residuo se lavó tres veces con 1 ml de agua bidestilada. El filtrado obtenido representa la fracción enriquecida en Pectinas Solubles en Agua (PSA). Se determinó el volumen final del filtrado y se guardaron alícuotas para posteriores determinaciones.

Nuevamente, el residuo sólido obtenido se re-suspendió en 25 ml en solución de EDTA 0,04 M, acetato de sodio 0,05 M, pH 4,5. Se agitó durante 4 h (130 rpm) a temperatura ambiente. Luego, se filtró al vacío y se realizaron 3 lavados con 1 ml de la solución EDTA. El filtrado obtenido corresponde a la fracción enriquecida en Pectinas Solubles en EDTA (PSE). Se determinó el volumen final del filtrado y se guardaron alícuotas para posteriores determinaciones.

El último extracto de pectinas se obtuvo re-suspendiendo el sólido obtenido en la fracción PSE, en 25 ml de solución de ácido clorhídrico 0,05 M. El sistema se calentó en baño termostático por 1 h a 100 °C, agitándolo en forma manual cada 10 min. Luego se filtró al vacío y se realizaron 3 lavados con 1 ml de solución de ácido clorhídrico 0,05 M. El filtrado obtenido corresponde a la fracción enriquecida en Pectinas Solubles en ácido clorhídrico 0,05 M (PSH). Se determinó el volumen final del filtrado y se guardaron alícuotas para posteriores determinaciones. El residuo sólido se recuperó para continuar con la fragmentación de PC.

### **6.5. Obtención de la fracción enriquecida de hemicelulosas**

La obtención del extracto enriquecido de hemicelulosas se obtuvo al re-suspender el residuo sólido sin pectinas en 25 ml de solución de hidróxido de sodio 4 M. Se agitó (130 rpm) durante 14 h a temperatura ambiente. Luego, se filtró al vacío y se realizaron dos lavados con 1 ml de la solución de hidróxido de sodio 4 M. Se determinó el volumen final del filtrado y se guardaron alícuotas para determinaciones posteriores.

### **6.6. Obtención de la fracción enriquecida de celulosa**

Se recuperó el residuo sólido de la separación de hemicelulosas y se re-suspendió en 7,5 ml de ácido sulfúrico 66 % v/v. Se calentó en baño termostático por 1,5 h a 37 °C agitando manualmente cada 10 min. Se trasvasó a un tubo falcon y se dejó en reposo por 1 h. Se extrajeron alícuotas en la zona inferior del sistema evitando arrastrar residuos sólidos. Las alícuotas se guardaron para determinaciones posteriores.

Para todas las fracciones obtenidas se guardaron alícuotas de sus extractantes como blancos para las determinaciones posteriores.

### **6.7. Determinación de ácidos urónicos**

La cuantificación de ácidos urónicos (AU) se realizó sobre las fracciones enriquecidas en pectinas (PSA, PSE y PSH), empleando la técnica del *m*-hidroxidifenilo (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973) con modificaciones. Se hicieron reaccionar

alícuotas de 200 µl de cada muestra con 1 ml de tetraborato de sodio 0,0125 M, sobre cama de hielo. Se mezclaron en vortex y se incubaron por 30 min a 100 °C. Luego, se mezcló con 20 µl de m-hidroxidifenilo 0,15 % p/v en NaOH 0,5 % p/v, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, mezclando cada 5 min en vortex. Luego se midió la absorbancia a 520 nm en espectro UV-Vis DU 800 (Beckman Coulter). Se realizó una curva de calibración con ácido galacturónico (AG) 1 mM (Fluka) expresando los resultados como mg AG en g RIA sin almidón. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 6.8. Determinación de azúcares neutros

Esta determinación se realizó sobre todas las fracciones obtenidas del RIA (PSA, PSE, PSH, hemicelulosas y celulosa) mediante el método de antrona (D'Amour y col., 1993). En tubos de ensayos se colocó 1000 µl de antrona (BioPack 2017) 0,05 % p/v en ácido sulfúrico 66 % v/v y 100 µl de muestra, a excepción de la fracción enriquecida en celulosa donde se realizó una dilución 1:4 (20 µl muestra y 80 µl agua destilada). Inmediatamente se mezcló con vortex durante 5 s. La mezcla de reacción se incubó a 100 °C en baño termostático durante 10 min, y luego se dejó en reposo en oscuridad por 15 min. Se midió la absorbancia a 620 nm en espectro UV-Vis DU 800 (Beckman Coulter), previa mezcla en vortex. Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón glucosa (G), partiendo de una solución madre 30 mg ml<sup>-1</sup>. Cada medición se efectuó por duplicado. El contenido de azúcares neutros (AN) se expresó como mg de G en g de RIA.

### 6.9. Determinación del contenido de lignina

La determinación del contenido de lignina se realizó por el método del ácido tioglicólico descrito por Ketsa y Atantee (1998), con modificaciones. El contenido de lignina se determinó por derivatización con ácido tioglicólico midiendo el complejo lignina-ácido tioglicólico (LTGA). Este método se basó en la formación de tioéteres de grupos de alcohol bencílico que se encuentran en la lignina, lo que da como resultado la solubilización de este polímero en condiciones alcalinas.

Se pesaron 10 mg de RIA por muestra y se agregó 1 ml HCl 2 N y 0,1 ml de ácido tioglicólico en tubos falcon. Se colocaron en baño termostático a 100 °C, agitando manualmente cada 10 min durante 4 h. Se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 20000 x g durante 20 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 1 ml de agua destilada. El pellet se re-suspendió en 1 ml de NaOH 0,5 N, se tapó con parafilm y agitó (115 rpm) por 18 h a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 20000 x g por 20 min, y se recuperó el sobrenadante. Se agregó 0,2 ml HCl 37,5 % v/v dejando la muestra en reposo por 4 h a 4 °C; durante esta etapa se produce la precipitación de un compuesto naranja-marrón (LTGA). Finalmente se centrifugó a

10000 x g por 5 min a 20 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de agua destilada. El pellet se re-disolvió en 5 ml de NaOH 0,5 N. Se realizando diluciones para su lectura. Se midió la absorbancia a 280 nm. El contenido de lignina se expresó como mg LTGA por cada g RIA. La fórmula de cálculo utilizada fue:

$$LTGA (mg\ g^{-1}RIA) = \frac{A_{280} \times VE \times FD}{\epsilon \times L \times P}$$

LTGA: Complejo lignina-ácido tioglicólico

FD: factor de dilución

VE: Volumen de extracto (ml)

$\epsilon$ : 18,31 g<sup>-1</sup> l cm<sup>-1</sup> (coeficiente de extinción de 2-hidroxi-proil éter alcalino)

L: camino óptico de la cubeta en cm.

P (g): peso de RIA utilizado

### 6.10. Determinación del contenido de calcio

Esta determinación se realizó únicamente para el Capítulo 5, donde se analiza el efecto del tratamiento precosecha con calcio. Se analizaron muestras de frutos sanos sin calcio y con calcio. La determinación del contenido de calcio se realizó en el RIA mediante espectrofotometría de absorción atómica según la metodología descrita por Galetto (2006), con modificaciones. El resultado refleja el contenido de calcio fijado en la pared celular. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Se utilizaron 100 mg de RIA por muestra. Se añadió 5 ml de ácido nítrico 65 % p/v para su digestión. Se dejó en reposo, las muestras tapadas y sobre una cama caliente de arena bajo campana durante 3 h, hasta obtener una solución límpida. La solución se trasvasó a un matraz de 50 ml, realizando lavados con agua ultra pura. Se añadió 5 ml de solución de estroncio 1 % p/v y se llevó a volumen final con agua ultra pura. La concentración final de estroncio en la solución fue de 0,1 % p/v. Finalmente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu AA-7000 manejado por el software WizArd. Se utilizó una lámpara de cátodo hueco de calcio con una corriente de 10 mA y una longitud de onda de emisión de 422,7 nm. El ancho de rendija fue de 0,7 nm. Se utilizó una lámpara de deuterio para corrección de background. La muestra fue atomizada en llama de acetileno-aire, con un caudal de 2 l min<sup>-1</sup> y a una altura de 7 mm del mechero. Se realizó una curva de calibración a partir de diluciones sucesivas de una solución patrón de calcio 50 ppm y con la adición de estroncio en una concentración final de 0,1 % p/v. El contenido de calcio se expresó como mg de calcio por cada g de RIA a partir de la fórmula:

$$\frac{mg\ Ca}{g\ RIA} = Ca\ matraz\ (ppm) \times Vol\ matraz\ (50\ ml) \times \frac{1}{masa\ muestra\ (0,1\ g)}$$

La preparación de las muestras se realizó por duplicado y cada una se midió por triplicado en el espectrofotómetro.

### 7. Análisis anatómico de la epidermis

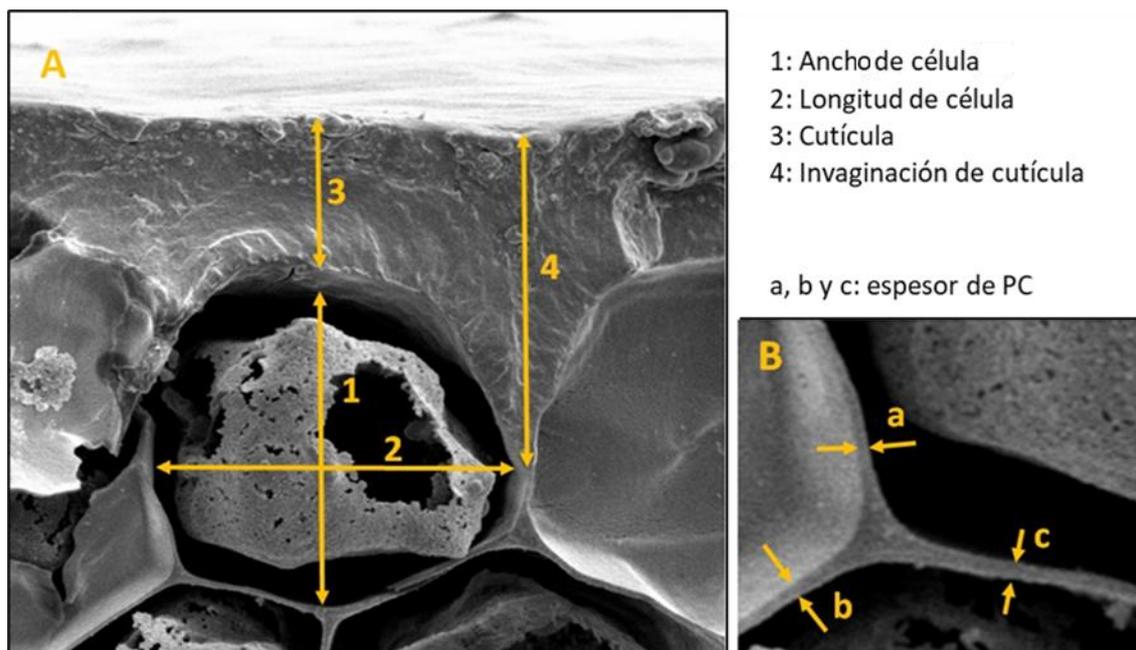
Para el análisis anatómico se trabajó con imágenes de microscopía electrónica por barrido (SEM). Se extrajeron trozos de piel de 25 mm<sup>2</sup> x 2 mm de grosor de 3 frutos por muestra sobre las áreas de estudio de frutos sin daño por sol (S), con daño por sol leve (L) y moderado (M). El material se colocó en frascos de vidrio sumergidos en solución FAA (50 ml etanol 96 % v/v, 35 ml agua destilada, 10 ml formol y 5 ml ácido acético glacial). Luego se realizó una fijación con glutraldehído 2,5 % en buffer fosfato 0,067 M (pH 7,2) y se lavó con solución de buffer fosfato 0,067 M (pH 7,2) (15 min, 3 veces). Para el secado se realizaron deshidrataciones graduales con alcohol y acetona y luego se sometió a secado por punto crítico (E3000, Polaron) empleando CO<sub>2</sub>. Las muestras fueron montadas en stubs. Finalmente, fue evaporado oro (300 Å) empleando una evaporadora de metales en plasma de Argón (91000 Model 3, Pelco). Las microfotografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido marca LEO EVO 40 (Cambridge 2003) a un potencial de 7,0 kV, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro Científico Tecnológico de Bahía Blanca.

Las imágenes fueron seleccionadas, digitalizadas y calibradas para analizarlas en el programa Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) realizando una descripción anatómica cuali y cuantitativa de las capas epidérmica e hipodérmica de la piel y de la superficie cuticular. Se trabajó con 9 imágenes por nivel de daño.

Sobre las imágenes de cortes transversales se evaluaron distintos parámetros morfo-métricos (Figura 15):

- Densidad celular (cantidad de células por mm<sup>2</sup>): se calculó a partir del conteo del número de células presentes y de la medida del área que ocupaban.
- Espesor de la piel (µm): esta medición abarcó las primeras cuatro capas de células sin considerar la cutícula (tejido epidérmico e hipodérmico). El dato corresponde al promedio de cinco mediciones por imagen.
- Ancho y longitud de células (µm): se midieron las dimensiones de 45 células por capa celular, de cada nivel de daño. Se analizaron cinco células de cada capa por imagen.

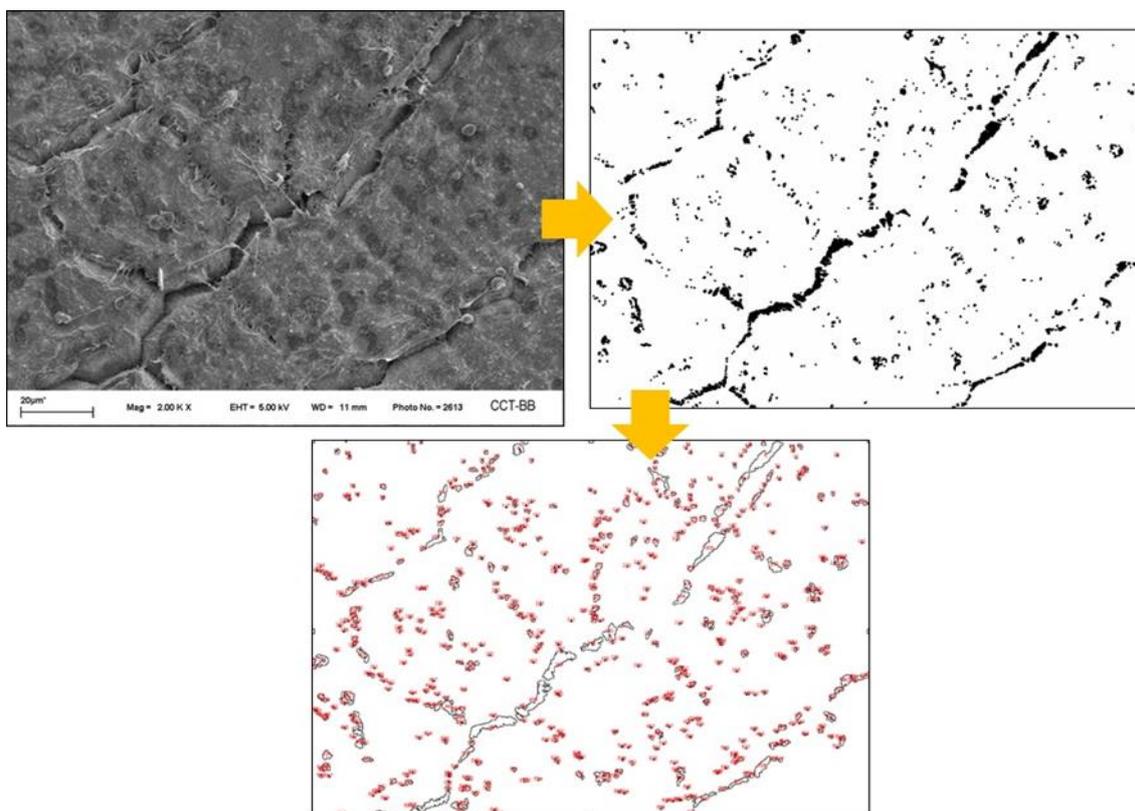
- Espesor de la cutícula ( $\mu\text{m}$ ): se midió la altura de la región central comprendida entre dos invaginaciones (zona de menor variabilidad). El valor corresponde al promedio de cinco mediciones por imagen.
- Espesor de pared celular ( $\mu\text{m}$ ): se midió el espesor de la pared en 45 células por capa celular. El valor corresponde al promedio del espesor de la pared celular tomados en cuatro puntos cardinales de la célula. En el caso de la capa epidérmica el valor se promedió solo con tres mediciones, no se contabilizaron las zonas de contacto entre pared celular y cutícula. No se seleccionaron células contiguas para esta variable.



**Figura 15. Detalle de los parámetros morfo-métricos medidos en las imágenes microscópicas.** Se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM). Las flechas indican las zonas consideradas para las mediciones de cada parámetro. PC: Pared celular.

Sobre las imágenes de la superficie se describió anatómicamente la cutícula de la piel de los frutos de pera. Además, se determinó el área de las microgrietas presentes en la superficie de la cutícula, para lo cual se adaptó la metodología descrita por Veraverbeke y col. (2003a, 2003b). Las imágenes fueron pre-procesadas con el filtro gaussiano Blur ( $\alpha$ : 0,5) para eliminar ruidos. Sobre estas imágenes en escala de grises se realizó una segmentación para su conversión a una máscara binaria empleando rangos de intensidades apropiados para la identificación de las microgrietas (método default del programa). Finalmente, los píxeles correspondientes a las microgrietas se compararon con el número total de píxeles de las imágenes para calcular el área porcentual ocupada por microgrietas. En la Figura

16, se ejemplifica el procesamiento y transformación de imágenes realizadas para esta determinación.



**Figura 16. Procesamiento y transformación de imágenes microscópica para evaluar el área de cobertura por microgrietas en la superficie cuticular. Se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM).**

### **8. Evaluación de la expresión genes de enzimas de la pared celular**

El análisis de la expresión de genes relacionados a la modificación de los componentes de la pared celular se muestra en el Capítulo 2.

#### **8.1. Selección y análisis de cebadores (*primers*)**

Los cebadores utilizados fueron seleccionados en base a bibliografía previa, a excepción de expansina (Exp), xilosidasa (XIL) y xiloglucano endotransglucosidasa (XET) que fueron diseñados específicamente para este trabajo (número de accesos AJ811691.1, AJ811690.1 y AB093033.1 respectivamente). La lista de cebadores utilizados en este trabajo, las regiones génicas donde hibridan y la fuente de los mismos se encuentran especificados en la Tabla 6. Se utilizó como gen de referencia el gen Actina (PcAct). La especificidad de los mismos fue analizada en la base de datos

NCBI (National center for biotechnology information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

**Tabla 6. Cebadores seleccionados para el analisis de la expresion de genes en piel de frutos de pera Anjou.**

Nombre	Primers	Tamaño del amplicón (pb)
PcAct*	F(5'-CCATCCAGGCTGTCTCTC-3') R(5'-GCAAGGTCCAGACGAAGG-3')	139
PcPAL**	F(5'-GAGGTGGAGAGTGCAAGGAG-3') R(5'-CTCGAGGCAACCTAGAATCG-3')	222
PcCAD1**	F(5'-GATGTCACAGACCCAAAGGCA-3') R(5'-AGGCGTTCGAGGTTTTCCAT-3')	153
PcPG1***	F(5'-ATGGCTTTAAAAACACAGTTGTTGT-3') R(5'-ACCTTCAATGGTGTCATGTATG-3')	189
PcPG2***	F(5'-CTAATGACAAAGGTTGCCCTGG-3') R(5'-AGACAACCTGTAGGCTGAACCGTAC-3')	241
PcPME1***	F(5'-TCGAGGGTTCAAAGGGTAGC-3') R(5'-AGGTAATAACCCGATACCCAGG-3')	231
PcPME2***	F(5'-ACCATCCTTGTCGCTAGACA-3') R(5'-GTCTCCCAGGTAGTTCTTGTGC-3')	190
PcPME4***	F(5'-TCCTTGAGGGACACCATTGG-3') R(5'-AACTTAGTTTCCCTGTGCTTATCT-3')	202
PcGAL2***	F(5'-GTCCATCAGCATTCTCCCG-3') R(5'-CCACAAGTAGTCAGTAGCATCCCT-3')	217
PcGAL3***	F(5'-CCGTGTTGGGCAATCGC-3') R(5'-CTAGCTTCGGCCACATCTCA-3')	223
PcGAL4***	F(5'-GCAGTAACCCTGTTGCGCTAGAC-3') R(5'-GGTTTCAACCATGAACGAGGC-3')	220
PcARF1***	F(5'-AGGTGCTATGTGACAGCGAAGG-3') R(5'-GCAGCAAGTTTCTGCAACCC-3')	220
PcEND1***	F(5'-ACTTCAAAGGCAAATCCAAACAC-3') R(5'-GAACATTGGAGGAATCGCAGAG-3')	213
PcEND9*	F(5'-CCTCCAATATGTGACCTCAA-3') R(5'-AACGGCTCCAATAAGATG-3')	334
PcCel2***	F(5'-GGGAGCTAAATCTAGGTGCAAGG-3') R(5'-GACGTCAAGAATTGGACGG-3')	208
PcEXP1****	F(5'-CCAATTCTGCCCTCTAAC-3') R(5'-GGTGATCAGAACCAGGTTGAAG-3')	221
PcXET****	F(5'-TAAGAGGTGGTGGGACCAGAAG-3') R(5'-TCCGGTGGCATAGAAGGGTATC-3')	134
PcXIL****	F(5'-AACCTTCTTTGCCCGGACAC-3') R(5'-ACATCAATAGGGCCGCTGAC-3')	104

\* Zhang y col. (2018); \*\* Li y col. (2014); \*\*\* Song y col. (2016); \*\*\*\* Hechos para este trabajo.

Primers específicos para cuantificaciones en PCR-RT. ACT: Actina; PAL: fenilalanina amonioliasa; CAD: cinamil-alcohol deshidrogenasa; PG: polygalacturonasa; PME: pectin metilsterasa;  $\beta$ -GAL:  $\beta$ -galactosidasa;  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa; Cel: celulasa; END: endoglucanasa; Exp: expansina; XET: xiloglucano endotransglucosidasa; XIL: xilosidasa.

### 8.2. Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon disolviendo por calor la cantidad correspondiente de agarosa (PB-L) según el porcentaje necesario de gel en TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, y 1 mM EDTA, pH 8,0) y se agregó GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (10.000x, Biotium) 1x final para su posterior visualización. Previo a la siembra las muestras se prepararon en loading buffer orange G 6x (50 mg de Orange G Sigma en 25 ml de Buffer TAE 1 X y 25 ml de glicerol) y luego se realizó la electroforesis en una cuba multiSub Horizontal Gel System (Clever Scientific) con buffer TAE 1x durante 40 minutos a 95 V con fuente de poder PowerPac 300 de BioRad. Luego de la corrida, los geles se visualizaron en un transiluminador UV (MaestroGen®Slider Imager). El marcador de peso molecular utilizado fue el Ladder 100 pb (Productos Bio-Lógicos) que contiene las byas 100, 200, 300, 400, 500 (más intensa), 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 y 2000 pb.

### 8.3. Obtencion de muestras

Se trabajó con muestras compuestas por cinco frutos. Por cada repetición se tomaron cinco discos de piel (0,2 g total) de los frutos previamente lavados con detergente neutro biodegradable 5 % v/v (Cicarelli), desinfectados con alcohol 70 % v/v y enjuagados con agua destilada. Las muestras se guardaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Los controles utilizados para cada experimento corresponden a frutos con tejido sano sin exposición directa a la radiación solar, recolectados de la zona inferior e interior de la canopia de los árboles frutales (área con menor ingreso de luz natural).

### 8.4. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de piel de pera, se utilizó el metodo de CTAB modificado descrito por Honaas y Kahn (2017). Cada muestra (0,2 g) se trituró con nitrógeno líquido y homogeneizó con 2 ml de Buffer Lisis (CTAB 2 % p/v; PVPP 2 % p/v; Tris HCl 100mM, pH 8,0; EDTA 25 mM, pH 8,0; NaCl 2 M; espermidina 0,5 g l<sup>-1</sup>; betamercaptoetanol 2 % v/v) previamente precalentado a 70 °C. Luego de una incubación en baño termo-estatzado durante 10 min a 70 °C, se colocaron 700 µl de cada muestra en un tubo nuevo, se agregó 600 µl de cloroformo, se mezcló y centrifugó a 20000 x g a 4 °C durante 15 min. Se trasvasaron 500 µl de la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó ½ volumen de etanol 100 % v/v (250 µl). La mezcla homogeneizada se pasó por una columna de membrana de sílica (PBL, Productos Biológicos), se centrifugó durante 1 min a temperatura ambiente a 20000 x g, se realizaron dos lavados con 500 µl de etanol 80 % v/v y finalmente se eluyó con 50 µl de agua. Los ARN obtenidos fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

La integridad del ARN purificado se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % p/v y la concentración y pureza del ARN purificado se determinó midiendo la relación de absorbancias 260/280 nm (Espectrofotómetro 7415 Nano, Jenway).

### 8.5. Puesta a punto de *primers* en PCR punto final

Las amplificaciones para poner a punto cada juego de primers utilizados en este trabajo se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l utilizando las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1x de Buffer Taq Pegasus; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTPs; 1 U de la DNA polimerasa de Taq Pegasus (todos reactivos PB-L) y 1  $\mu$ M de los primers (Eurofins). Como molde se utilizó 1  $\mu$ l de cDNA proveniente de RNA de muestras control y se llevó a volumen final con agua estéril. El ciclado incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C de 5 minutos 30 segundos, 34 ciclos con una desnaturalización a 92 °C de 10 s, hibridación (annealing) a 55 °C de 15 s y la extensión a 72 °C de 30 s. Por último, se realizó una extensión final a 72 °C de 5 min. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Los productos de amplificación fueron verificados en geles de agarosa 1 % p/v.

### 8.6. Tratamiento con nucleasas de ADN

Los tratamientos con ADNasa fueron realizados incubando una alícuota de 8  $\mu$ l de ARN obtenido en 8.4 (150-500 ng RNA) durante 30 min a 37 °C con 1 unidad de ADNasa (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) en buffer 1x y en un volumen final de 10  $\mu$ l. Para inactivar la enzima se agregó 1  $\mu$ l de solución de STOP e incubó a 65 °C durante 10 min.

### 8.7. Retrotranscripción

La primera cadena de cDNA se obtuvo mezclando 3  $\mu$ l de la muestra tratada previamente con ADNasas (8,6) con 2  $\mu$ l de cebadores OligodT 10 $\mu$ M (Eurofins) en un volumen final de 13,5  $\mu$ l con agua libre de RNasa. Se incubó a 65 °C por 5 min e inmediatamente se colocó en hielo durante 2 min. Se agregaron 2  $\mu$ l de dNTPs 2 mM, 4  $\mu$ l Buffer 5X y 0,5  $\mu$ l de retrotranscriptasa (RevertAid RT Reverse Transcription Kit) y se incubó a 42 °C durante 60 min. La enzima se inactivó incubando a 70 °C durante 10 min. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su uso. Todas las incubaciones se realizaron en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). La eficiencia del tratamiento con ADNasa y retrotranscripción se evaluó realizando una PCR de punto final con el juego de primers para actina (Fw-PcAct y Rv-PcAct) en las condiciones mencionadas en 8.5, utilizando de molde 1  $\mu$ l de ARN sin tratar (dilución 1/8), ARN tratado (dilución 1/7), cDNA o agua ultra pura para el negativo según corresponda.

### 8.8. Puesta a punto de *primers* en Real-Time PCR

Todas las Real-Time PCR (RT-PCR) se realizaron bajo el mismo procedimiento, en cuanto a condiciones, cantidades de moldes y formas de análisis de resultados. La mezcla de reacción se preparó con las siguientes concentraciones finales de los reactivos en 15 µl de reacción: iQ SYBR® GREEN SUPERMIX (Biorad) 1x, par de primers según corresponda 0,3 µM (válido para todos los juegos de primers ensayados), 5 µl de cada dilución correspondiente de cDNA y H<sub>2</sub>O hasta volumen final. El ciclado incluyó una desnaturalización inicial a 95 °C de 10 min, 39 ciclos con una desnaturalización a 95 °C de 15 s, hibridación (annealing) a 55 °C por 20 s y la extensión a 68 °C por 30 s. Se realizó una curva de melting agregando un paso de 15 s de desnaturalización a 95 °C, 1 min de annealing a 58 °C y luego se llevó nuevamente a 95°C con incrementos escalonados de temperatura de 0,3 °C y medida de señal en cada uno (step y hold). Por último, se realizó una curva de disociación (melting) agregando un paso de 15 s de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación a 58 °C y luego se llevó nuevamente a 95 °C con incrementos escalonados de temperatura de 0,3 °C y medida de señal de cada uno. El equipo utilizado fue MasterCycler® Realplex2 (Eppendorf). Cada muestra biológica se midió por triplicado técnico y con su negativo. Los rangos dinámicos, la ecuación de la recta y la eficiencia de los cebadores se analizaron con el programa del equipo.

#### 8.8.1. Validación de primers para Real-Time PCR: rango dinámico y eficiencia de los primers

Para generar las rectas para cada par de primers se realizó RT-PCR en las condiciones mencionadas en 8.8. A partir de una dilución 1/20 de cDNA muestra control y sus sucesivas diluciones 1/5 se obtuvo la curva de calibración de cinco puntos. Cada punto de la curva se midió por triplicado. Se graficó el valor de Ct versus la correspondiente dilución del cDNA molde y se trazó la mejor recta. El rango dinámico se calculó incluyendo los puntos de la recta que mantuvieron la linealidad (coeficiente de regresión lineal  $R^2 = 0,98-1$ ). La eficiencia de los primers se obtuvo del programa del equipo a partir de la pendiente de la recta utilizando la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

### 8.9. Determinación de la expresión de genes en piel de pera Anjou

Como moldes para el ensayo de expresión génica por RT-PCR se utilizaron diluciones 1/20 de cada cDNA muestra en las condiciones anteriormente mencionadas en 8.8. Para cada medición se utilizó actina como gen normalizador y muestra control como muestra de referencia. La muestra control empleadas para cada uno de los

ensayos realizados se describe en la sección 2.2.1 del Capítulo 2. Los Cts obtenidos por el programa del equipo se emplearon para la relativización de las expresiones génicas por el método de Ct Comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl, 2001).

### **9. Análisis estadístico**

El programa estadístico utilizado para el análisis de los datos fue el programa estadístico InfoStat en interfase con plataforma R (Di Rienzo y col., 2018) InfoStat/Professional Versión 2015 compatible a R 3.1.0. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), donde las comparaciones múltiples entre medias se realizaron a partir de pruebas DGC con un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha= 0,05$ ). Para las variables expresadas en porcentaje, los valores fueron transformados al arcoseno para su tratamiento estadístico. Se realizó la verificación del cumplimiento de los supuestos aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad en los errores a partir de apreciaciones gráficas de residuos estudentizados versus predichos, Q-Q plot normales y prueba de Shapiro Wilks (modificado) y prueba de Levene, respectivamente. El número de réplicas biológicas empleado en la mayoría de las determinaciones realizadas fue de  $n= 5$ , en cada capítulo se detalla específicamente los cambios en el número de muestras analizadas. En el Capítulo 4 se realizó un análisis estadístico multivariado por medio de análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados (AC) a partir de los datos obtenidos en las variables medidas en los Capítulos 1 y 3.

## **CAPÍTULO 1: Caracterización de la piel de frutos de peras con distintos niveles de daño por sol en la cosecha**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

El estrés por elevada radiación solar y temperatura puede afectar los mecanismos de funcionamiento de las plantas a través de la inducción de distintos cambios interrelacionados a niveles morfológicos, anatómicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares. En función al estado fenológico, la intensidad y duración en que estos cambios ocurren, los mismos pueden tener efectos benéficos o negativos en el fruto (Chelli-Chaabouni, 2014).

El daño por sol es un desorden fisiológico común en las producciones frutihortícolas inducido por la elevada radiación solar y temperatura en campo, que afecta principalmente la piel de los frutos (Colavita y col., 2021; Woolf y Ferguson, 2000). Las manzanas y peras que presentan esta sintomatología son de menor calidad estética y por tanto descartadas o comercializadas a precio bajo (Munné-Bosch y Vincent, 2019). El daño por sol es considerado una problemática económica grave en las regiones productoras de estos frutos, causando pérdidas anuales que varían entre un 10 a 50 % según la especie, variedad, tecnología aplicada al cultivo y condiciones climáticas (Vita y Colavita, 2018; Hansen, 2005; Yuri, 1998).

En frutos de manzana se han descrito y estudiado las causas ambientales que generan el daño por sol, así como se ha profundizado en las alteraciones fisiológicas que promueven este trastorno en los tejidos afectados. Felicetti y Schrader (2008a) determinaron tres tipos de daño por sol en las manzanas (foto-oxidativo, necrótico y bronceado), y realizaron una extensa caracterización y descripción en distintas variedades en base a los cambios de color, la alteración en pigmentos e índices de madurez así como en la integridad de los tejidos (Felicetti y Schrader, 2009a, 2009b; Schrader y col., 2009). Colavita (2022) y Vita (2018) profundizaron en el estudio del metabolismo oxidativo y la respuesta antioxidante de los tejidos afectados por daño por sol. Mientras, Torres y col. (2020, 2013) abordaron estudios morfológicos, bioquímicos y genéticos sobre cambios en la pared celular de los tejidos afectados, así como alteraciones en las relaciones hídricas y osmoregulación en los frutos de manzana con daño por sol. Asimismo, se han descrito los efectos anatómicos que promueve el daño de sol en los tejidos afectados, resaltando cambios en el grosor de la cutícula, reducción del tamaño de las células epidérmicas e hipodérmicas, engrosamiento y alteración en los componentes de la pared celular y acumulación de lignina (Morales-Quintana y col., 2020; Racskó y col., 2005).

Sin embargo, en frutos de pera no hay registros que describan o caractericen los síntomas de daño por sol. McClymont y col. (2016) definieron los umbrales de

temperatura superficial de frutos para el desarrollo de daño por sol tipo bronceado y necrótico en peras rojas y presentaron la primera clasificación de severidad del síntoma. Recientemente, Torres y Mogollon (2022) abordaron la caracterización del daño por sol en pera var. Packham's Triumph en relación con parámetros de color y espectro Vis-NIR con el objetivo de desarrollar modelos predictivos de quemaduras solares. Otros autores han descritos cambios fisiológicos y bioquímicos en el metabolismo de frutos de pera desarrollados bajo diferentes condiciones de luz solar (Serra y col., 2018; Rudell y col., 2017; Zhao y col., 2016) sin el desarrollo de esta fisiopatía.

Como se mencionó, el daño por sol afecta principalmente la piel de los frutos. Este efecto es importante ya que la piel posee un rol clave al actuar como barrera física y química contra factores ambientales y participar en la conservación de la calidad del fruto (Konarska, 2013). Las células epidérmicas e hipodérmicas, que forman la piel, cuentan con paredes celulares engrosadas y ricas en celulosa comparado con las células del parénquima (Brahem y col., 2017; Raffo, 2013). La compleja y dinámica estructura de la pared celular permite que actúe en la defensa, señalización y respuesta al estrés ambiental (Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015; Fry, 2010).

La información existente respecto a los cambios que genera el daño por sol en la composición y estructura de la pared celular de frutos de pera es escasa, y prácticamente nula en lo que refiere a la piel. Los estudios relacionados a cambios en los componentes de la pared celular en pera se han desarrollado, principalmente, para comprender el proceso de maduración, específicamente sobre la pulpa (Lindo-García y col., 2019; Brahem y col., 2017; Raffo, 2013; Murayama y col., 2006, 1998; Martin-Cabrejas y col., 1994).

De acuerdo con Tenhaken (2015), los tejidos sometidos a estrés sufren cambios en las propiedades mecánicas y en la composición de la pared celular promovidos por la participación de EROs, peroxidasas y enzimas modeladoras de la pared, y no a un desmontaje generalizado de los componentes de pared como sucede en la maduración de los frutos. Asimismo, Raffo y col. (2011) y Torres y col. (2020) reportaron incrementos de firmeza en los frutos de pera expuestos al sol, vinculando estos cambios con el retraso en la solubilización de las pectinas de la pared celular. En frutos de manzana con daño por sol, se observaron incrementos en el contenido de lignina en la pared celular y en la expresión de genes asociados a la biosíntesis de este compuesto (Torres y col., 2020), aumentando la firmeza de los tejidos estresados. Reportes en otras especies vegetales sometidas al efecto de factores estresantes como calor o irradiación describieron cambios en los componentes de la pared celular, tales como incrementos en el grado de ramificación de pectinas, retraso de solubilización de polímeros, y cambios en el contenido de hemicelulosas y lignina (Torres y col., 2020; Le Gall y col., 2015; Wang y col., 2015; Lima y col., 2013; Raffo y col., 2011).

### 1.1.1. Hipótesis

La exposición de peras a elevada radiación solar y temperatura promueve procesos de adaptación a nivel celular que involucran cambios en la estructura y composición de la pared celular de la piel del fruto.

### 1.1.2. Objetivo específico

Caracterizar morfológica y bioquímicamente la pared celular en piel de frutos con distintos niveles de daño generado por estrés por altas temperaturas y radiación solar.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Material vegetal

Las determinaciones fueron realizadas en frutos de pera Anjou al momento de cosecha durante la temporada 2018/2019. Se trabajó con tejidos sano (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M), descritos en la sección 1.2 del capítulo Materiales y métodos.

### 1.2.2. Medida de variables

Las variables de respuesta determinadas fueron:

- Índices de madurez (color de piel, firmeza de pulpa, sólidos solubles, acidez titulable, degradación de almidón).
- Caracterización anatómica por imágenes SEM (espesor de piel; densidad celular; espesor de cutícula; área de microgrietas; ancho y largo celular; espesor de pared celular).
- Metabolismo oxidativo (CRA; pérdida de electrolitos; peroxidación de lípidos; capacidad antioxidante; contenido de polifenoles totales; actividad enzimática de CAT, APX y SOD; contenido de proteínas solubles; contenido de clorofilas, carotenoides y antocianinas).
- Componentes de pared celular (RIA; contenido de almidón; pectinas totales; hemicelulosas; celulosa y lignina; contenido de AU y AN en fracciones de PSA, PSE, PSH).

Las descripciones metodológicas de las determinaciones fueron realizadas en la sección Materiales y Métodos.

### 1.2.3. Análisis estadístico

En las variables perteneciente a los grupos de determinaciones índices de madurez, metabolismo oxidativo y componentes de pared celular, se trabajó con un n = 5.

En las imágenes microscópicas, se trabajó con un n = 9 en las variables espesor de piel, densidad celular, espesor de cutícula y área de microgrietas utilizando imágenes 3000x. Mientras en las variables ancho y largo celular y espesor de pared celular se trabajó con un n = 45, en imágenes 10000x.

## 1.3. RESULTADOS

La cara de los frutos que se desarrollan bajo condiciones de alta temperatura y radiación pueden presentar distintos grados de daño por sol dependiendo de la intensidad y tiempo de exposición, como así también del momento y estado del fruto.

Inicialmente se realizó una exhaustiva caracterización del estado fisiológico y bioquímico general de la piel de los tejidos afectados, considerando aspectos de calidad y madurez, pigmentos fotosintéticos y foto protectores, y metabolismo oxidativo. Luego, se profundizó en el estudio anatómico de la piel y la composición de la pared celular de los tejidos de piel de pera con síntomas de daño por sol.

### 1.3.1. Color e índices de madurez de los frutos

La determinación de color de la piel de los frutos se realizó sobre el área afectada por daño por sol. El daño por sol alteró los parámetros de color de la piel de los frutos (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1. Parámetros de color en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.**

Nivel de daño	HUE	CROMA	Luminosidad
S	123,9 ± 1,8 a	46,9 ± 0,6 a	73,2 ± 1,2 a
B	73,9 ± 8,2 d	29,5 ± 2,7 c	60,3 ± 4,0 b
L	106,8 ± 2,9 b	42,3 ± 0,7 b	74,2 ± 0,9 a
M	95,5 ± 4,1 c	40,4 ± 1,9 b	73,9 ± 1,8 a

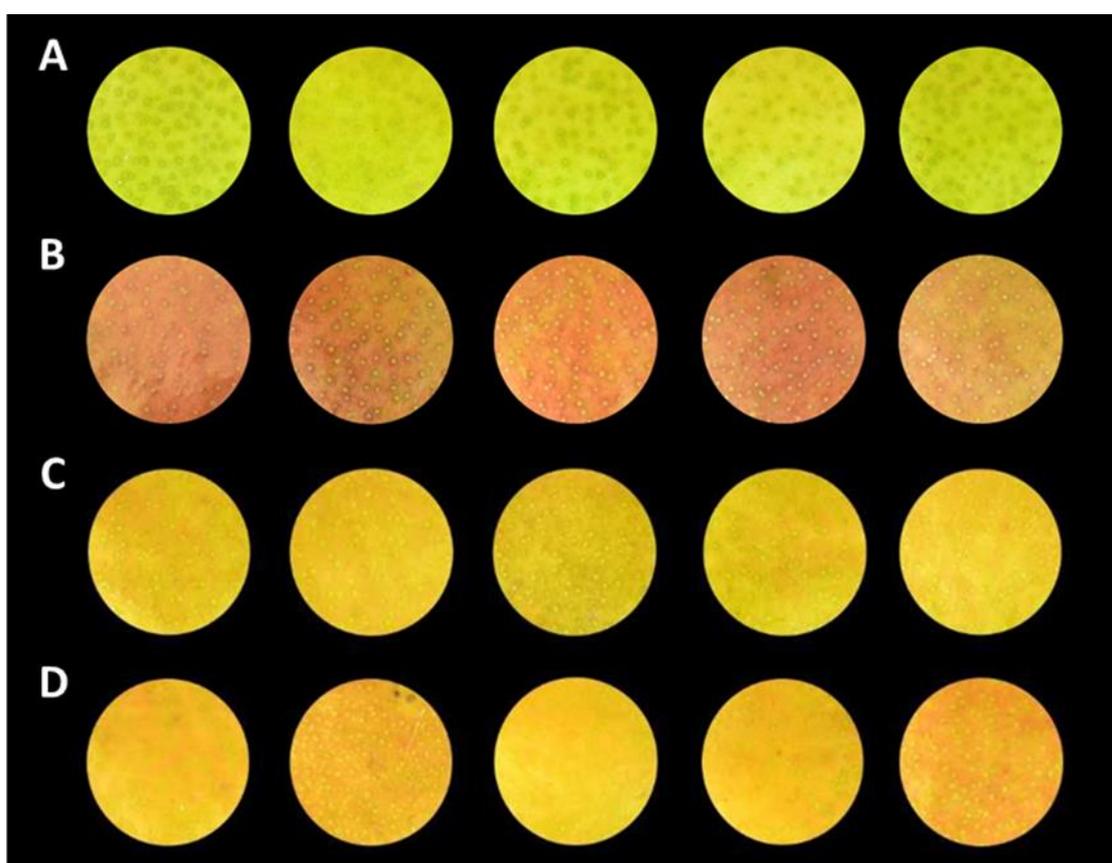
Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Los datos corresponden a la media ± D.E. (n = 5). Letras distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas (DGC; p ≤ 0,05).

La variedad Anjou presentó color superficial de la piel verde claro en los tejidos S. Los tejidos con daño por sol presentaron una reducción significativa del valor del ángulo HUE (p < 0,0001), acentuándose la diferencia con la intensidad del daño en los

tejidos bronceados (14 % L y 26 % M respecto a S). En los tejidos B, la diferencia de tono fue más notoria con una reducción del 40 % respecto de S.

La saturación del color se redujo significativamente ( $p < 0,0001$ ) con el daño por sol, con valores de 37 % en B, 10 % en L y 14 % en M respecto de los tejidos sanos. La alteración de estos dos parámetros del color se visualiza en los tejidos L y M como tonos verdes amarillentos y amarillos semi-saturados respectivamente, mientras que en B corresponde a tonos en la gama de los rojos semi-saturados.

No hubo diferencias significativas en la luminosidad del color entre los tejidos S, L y M, indicando que la claridad del color no se vio afectada en estos niveles de daño. Sin embargo, los tejidos B mostraron una reducción del 18 % en la luminosidad del color respecto a S, indicando mayor opacidad del color.



**Figura 1.1.** Color de la piel en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou al momento de cosecha. (A) Piel sana sin daño por sol (S). (B) Piel con daño por sol *blush* (B). (C) Piel con daño por sol leve (L). (D) Piel con daño por sol moderado (M).

En la Figura 1.1, se puede apreciar los colores de la piel de distintos frutos con los niveles de daño por sol evaluados. Según los resultados, el color de los tejidos sanos por sol (S) corresponde a tonos verde claro semi-saturados, los tejidos con daño

por sol leve (L) a verde-amarillento claro grisáceo. El color de piel de los tejidos con daño moderado (M) presentó tonos amarillo-amarronados claros grisáceos. Mientras los tejidos con daño *blush* (B) se diferenciaron notablemente con tonos rojizos opacos y débilmente saturados.

En la evaluación del estado de madurez de los frutos se empleó como material vegetal la pulpa ubicada bajo el área afectada por daño por sol y hasta una profundidad de pulpa de 10 mm. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en las variables medidas: firmeza ( $p = 0,0002$ ); sólidos solubles ( $p < 0,0001$ ); acidez titulable ( $p < 0,0001$ ) y degradación de almidón ( $p < 0,0001$ ), respecto al daño por sol (Tabla 1.2).

La firmeza de pulpa aumentó significativamente en los tejidos con daño por sol y con la intensidad del daño. Estos incrementos fueron del 9 % en B, 8 % en L y 14 % en M respecto a S.

**Tabla 1.2. Índices de madurez en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou al momento de cosecha.**

Nivel de daño	Firmeza de pulpa (N)	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez málica (g/L)	Degradación de almidón (%)
S	61,9 ± 1,6 c	12,0 ± 0,3 d	3,7 ± 0,1 a	26 ± 9 d
B	67,7 ± 2,0 b	13,4 ± 0,2 c	2,4 ± 0,3 b	38 ± 4 c
L	66,6 ± 1,8 b	14,1 ± 0,2 b	2,3 ± 0,3 b	56 ± 9 b
M	70,4 ± 3,2 a	15,4 ± 0,3 a	1,7 ± 0,1 c	96 ± 9 a

Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

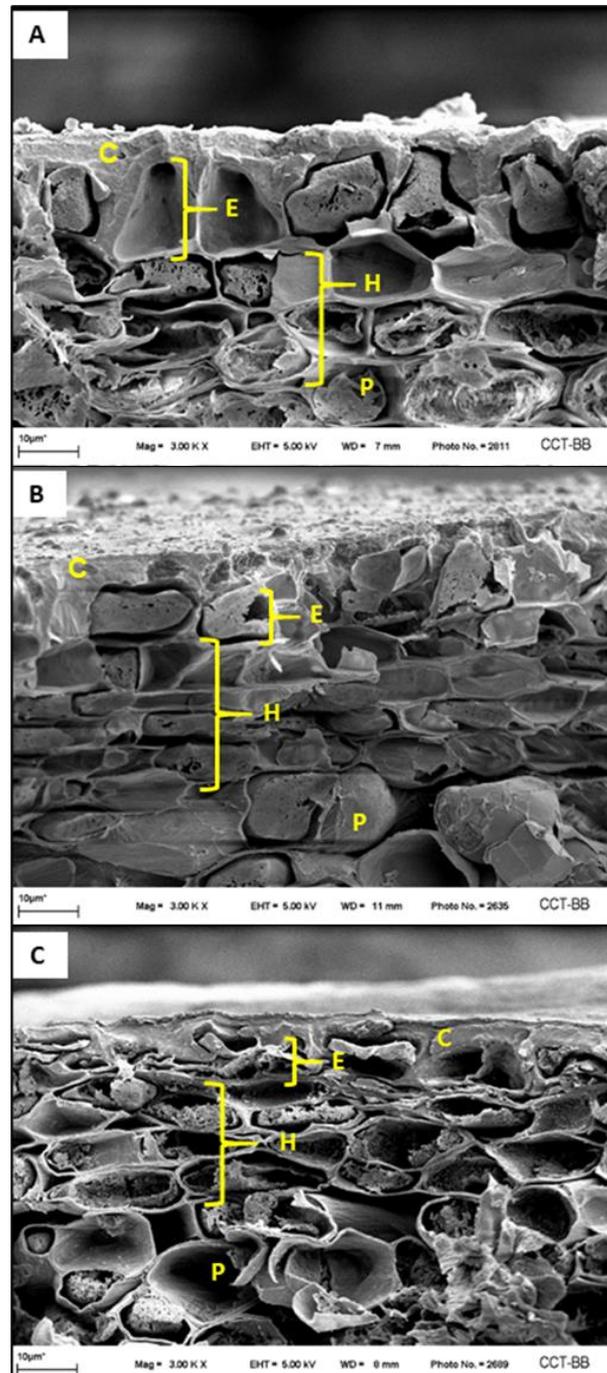
El contenido de sólidos solubles se incrementó concomitantemente con el aumento del nivel de daño por sol. Los tejidos con daño por sol presentaron un contenido superior de sólidos solubles del 12 % en B, 17 % en L y 28 % en M respecto a S.

La acidez titulable fue de 3,7 g/L en S, mientras en los tejidos con daño por sol hubo una reducción significativa. Los descensos en la acidez fueron del 35 % en B, 38 en L y 57 % en M comparados a los tejidos sanos por sol.

La prueba de lugol se realizó para evaluar la degradación de almidón en los tejidos. Los frutos con daño por sol presentaron un marcado incremento del porcentaje de degradación de almidón respecto a los frutos sanos, siendo más notorio con la intensidad del daño por sol, superando el 90 % en M.

### 1.3.2. Características anatómicas de la piel de los frutos

Para caracterizar los efectos del daño por sol a nivel anatómico se realizaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) en la piel de frutos de pera Anjou en las categorías de daño: sano (S), leve (L) y moderado (M) (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Imágenes de microscopía por barrido electrónico (SEM) de tejidos con distintos niveles de daño por sol en la piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha. Vista transversal. (A) Tejidos sanos. (B) Tejidos con daño por sol leve. (C) Tejidos con daño por sol moderado. La imagen muestra las distintas capas de la piel de los frutos (c: cutícula, e: epidermis, h: hipodermis, p: parénquima).

En los cortes transversales a la superficie del tejido sanos (S) se observó una capa cuticular continúa recubriendo la cara exterior de la primera capa celular, con invaginaciones laterales. No se define un límite entre la cutícula y la pared celular en contacto con esta. Las células de la primera capa presentaron formas prismáticas sin espacios intercelulares, identificándose como la epidermis del fruto. Contiguo a esta, se observó el tejido hipodérmico compuesto por tres capas de células de forma predominantemente rectangular y sin espacios intercelulares. Finalmente, se observó un tejido constituido por células de formas esféricas, tamaños variados y con abundantes espacios intercelulares marcando el inicio del parénquima (Figura 1.2.A).

En los tejidos con síntomas por daño por sol, tanto en L como M, se observó un aplastamiento generalizado de las células que forman la piel (epidermis e hipodermis; Figura 1.2.B-C).

En la Tabla 1.3 se exponen parámetros descriptivos analizados en los tejidos que conforman la piel. El daño por sol provocó un adelgazamiento de las células de la piel, asociado con la reducción en altura de las capas celulares de 6 % en L y 13 % en M respecto a S y un incremento de la densidad celular de 42 % en L y 40 % en M respecto a S. El espesor de la cutícula fue menor únicamente en los tejidos con daño por sol moderado.

**Tabla 1.3. Densidad de células, espesor de piel y cutícula en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.**

Nivel de daño	Niveles de daño por sol		
	S	L	M
Nº células por mm <sup>2</sup>	8 807 ± 1 611 b	12 532 ± 1 861 a	12 298 ± 1 227 a
Espesor de la piel (µm)	37,41 ± 2,78 a	35,05 ± 3,05 b	32,56 ± 4,61 c
Espesor de cutícula (µm)	4,70 ± 1,09 a	5,15 ± 1,15 a	3,85 ± 1,27 b

Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol leve (L) y moderado (M). Los valores son la media ± D.E. (n = 9). Letras distintas para los valores de una misma fila indican diferencias significativas (DGC; p ≤ 0,05).

En la Tabla 1.4 se exponen las características morfológicas de las células de las capas epidérmicas e hipodérmicas de los tejidos con daño por sol. En las células de la epidermis, el daño por sol afectó principalmente la altura de las células. Las células presentaron una reducción de la altura del 13 % en L y 36 % en M respecto a S (9,98 µm). El daño no afectó significativamente el largo de las células. Por otra parte, con el incremento de la intensidad del daño se observó un incremento significativo en el espesor de la pared celular, con un valor 23 % mayor en L y 46 % mayor en M respecto de S.

En la hipodermis se registró una reducción significativa en el alto y largo de las células en los tejidos con daño por sol. En los tejidos con daño, la altura celular se redujo entre un 24 a 37 %, mientras la longitud disminuyó entre un 9 a 16 % respecto

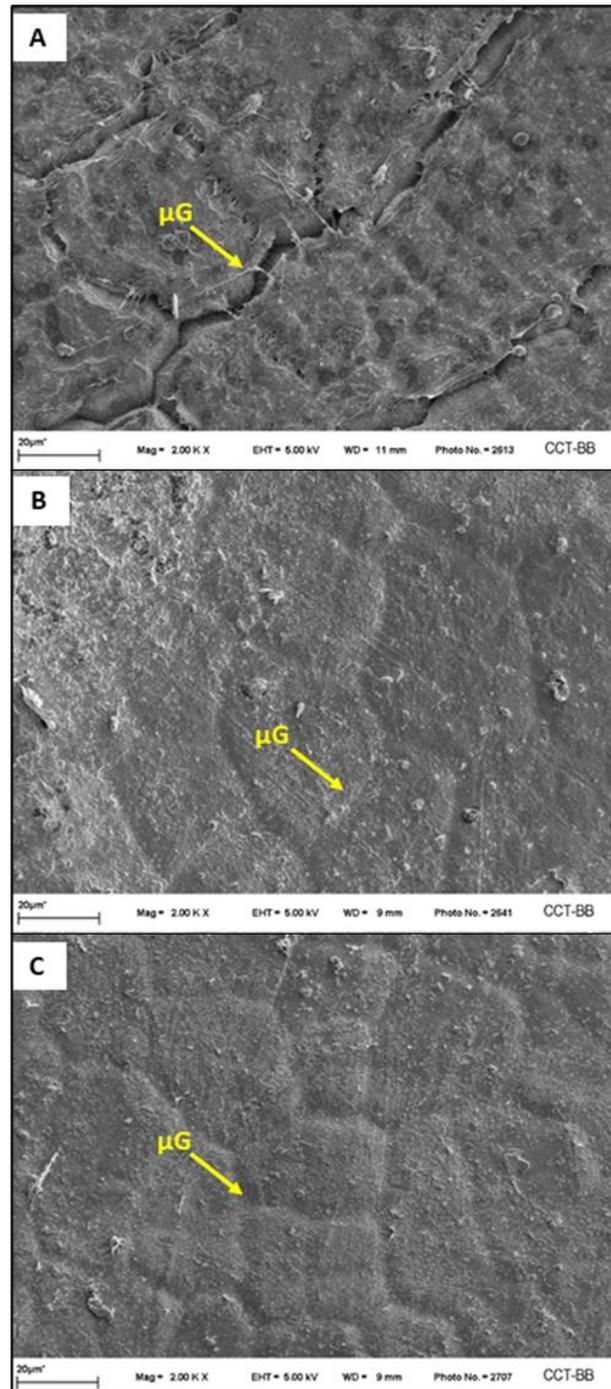
de S. En la pared celular si bien se observó una tendencia al aumento del espesor a medida que se agravaba el daño por sol, esta no fue significativa.

**Tabla 1.4. Características morfológicas de los componentes de la epidermis e hipodermis en tejidos con distintos niveles de daño por sol en la piel de frutos de peras Anjou al momento de cosecha.**

Parámetros ( $\mu\text{m}$ )	Niveles de daño por sol		
	S	L	M
<b>EPIDERMIS (1 capa)</b>			
Alto de célula	9,98 $\pm$ 3,64 a	8,60 $\pm$ 2,16 a	6,34 $\pm$ 2,38 b
Largo de célula	11,01 $\pm$ 3,59 a	10,86 $\pm$ 2,74 a	9,99 $\pm$ 3,17 a
Espesor de pared celular	0,13 $\pm$ 0,04 c	0,16 $\pm$ 0,04 b	0,19 $\pm$ 0,03 a
<b>HIPODERMIS (3 capas)</b>			
Alto de célula	8,25 $\pm$ 1,46 a	5,16 $\pm$ 1,12 b	6,25 $\pm$ 1,73 b
Largo de célula	19,63 $\pm$ 3,56 a	16,40 $\pm$ 3,52 b	17,82 $\pm$ 3,10 b
Espesor de pared celular	0,24 $\pm$ 0,07 a	0,26 $\pm$ 0,07 a	0,27 $\pm$ 0,06 a

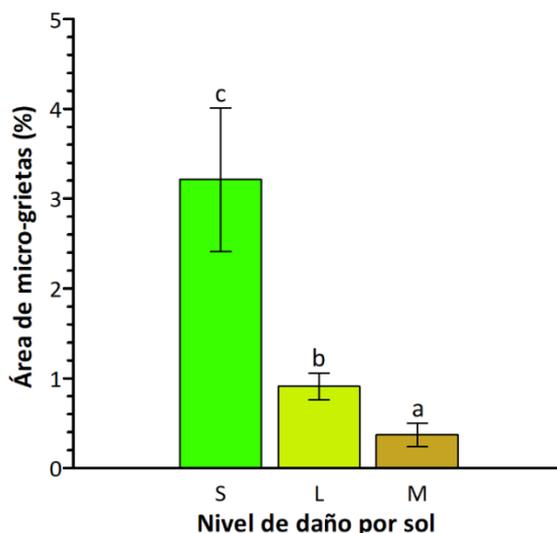
Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol leve (L) y moderado (M). Los valores representan la media  $\pm$  D.E. (n = 45). Letras distintas para los valores de una misma fila indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

En la Figura 1.3, se presentan imágenes microscópicas superficiales de la piel de los frutos con distintos niveles de daño por sol. En la superficie cuticular de los tejidos S se observaron micro-grietas profundas y abundantes, formando una red interconectada de canales (Fig. 1.3.A). En el caso de L y M (Fig. 1.3.B-C), las micro-grietas se observaron como ondulaciones suaves, poco profundas sobre la superficie de la cutícula.



**Figura 1.3. Imágenes de microscopía por barrido electrónico (SEM) de tejidos con distintos niveles de daño por sol en la piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha. Vista superficial. (A) Tejidos sanos. (B) Tejidos con daño por sol leve. (C) Tejidos con daño por sol moderado. La imagen representa fragmentos de la superficie de la piel de los frutos, observando la variación del estado de las microgrietas ( $\mu\text{G}$ ) en la cutícula.**

Las micro-grietas representaron 3,3 % de la superficie total de la cutícula en los tejidos sanos. El daño por sol redujo la superficie de micro-grietas en un 72 % en L y un 98 % en M respecto a S (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Área de micro-grietas sobre la superficie cuticular en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de peras Anjou al momento de cosecha. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol leve (L) y moderado (M). Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 9). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 1.3.3. Pigmentos de la piel

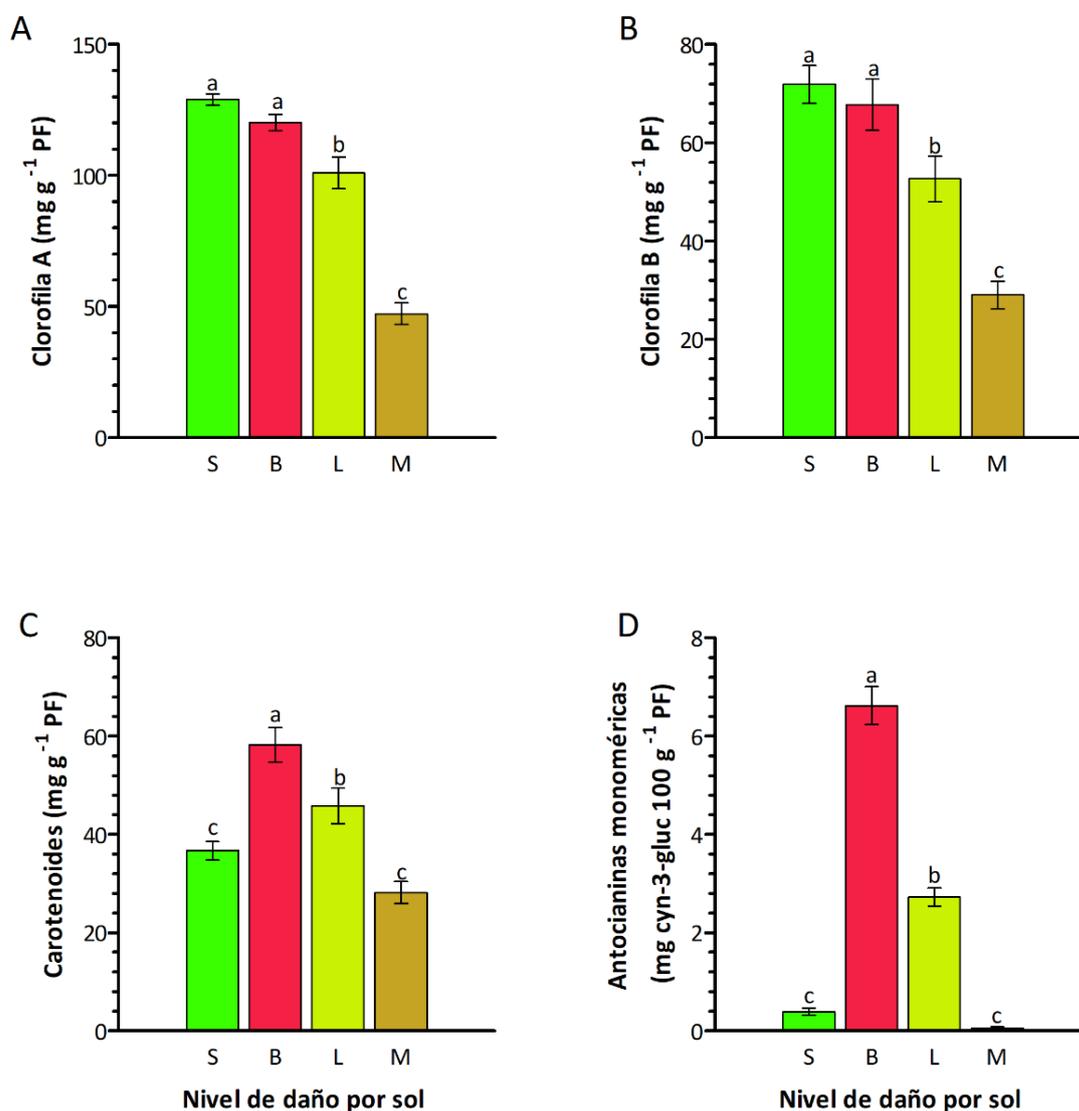
En la Figura 1.5 se presentan las variaciones en el contenido de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores de la piel de frutos con distintos niveles de daño por sol.

Los tejidos L y M presentaron descensos significativos en el contenido de clorofila *a* y *b* respecto de los tejidos sanos ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$  respectivamente), acentuándose la pérdida de estos pigmentos con la intensidad del daño. Los valores promedios obtenidos para clorofila *a* fueron de  $101,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  en L y  $47,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  en M respecto a  $128,98 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  en S, y en clorofila *b* fueron de  $52,64 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  en L y  $29,03 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  en M respecto a  $71,88 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  en S (Figura 1.5.A y B). Los tejidos B, si bien mostraron menores contenidos de estos pigmentos respecto de S, no presentaron diferencias significativas.

Con relación a los carotenoides (Figura 1.5.C), se observaron diferencias significativas en el contenido de este pigmento entre los tejidos S, B y L. El contenido de carotenoides en B presentó un incremento del 59 % respecto a S, mientras los tejidos L presentaron un aumento del 25 % respecto a S. Los tejidos M no presentaron diferencias estadísticas en el contenido con relación al tejido sano.

En la Figura 1.5.D se expone el contenido de antocianinas en los tejidos con daño por sol. Los tejidos S presentaron un contenido medio de  $0,39 \text{ mg cyn-3-gluc } 100$

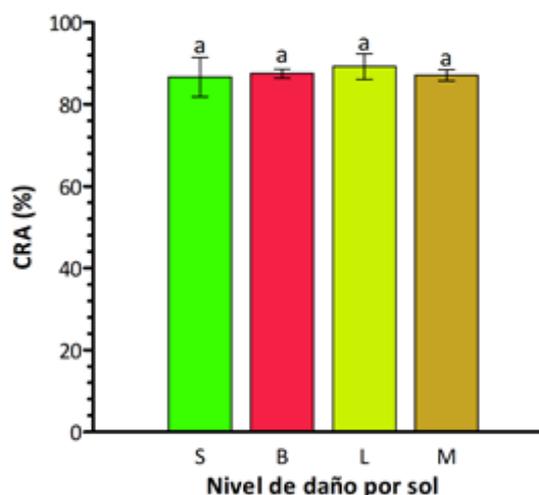
$\text{g}^{-1}$  PF. Los tejidos B mostraron un destacado incremento en el contenido de antocianinas, con un aumento del 1697 % respecto de los tejidos S. Los tejidos L presentaron un aumento equivalente al 697 % respecto de S. Mientras que los tejidos M no se diferenciaron de los tejidos sanos.



**Figura 1.5. Variación del contenido de pigmentos en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.** (A) Clorofila a ( $\text{mg g}^{-1}$  PF). (B) Clorofila b ( $\text{mg g}^{-1}$  PF). (C) Carotenoides ( $\text{mg g}^{-1}$  PF). (D) Antocianinas monoméricas ( $\text{mg cyn-3-gluc } 100 \text{ g}^{-1}$  PF). Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 1.3.4. Estado hídrico de la piel

El contenido relativo de agua de los tejidos de la piel no se vio afectado por el daño por sol (Figura 1.6). El contenido relativo de agua en la piel de los frutos de pera Anjou fue 87 %.

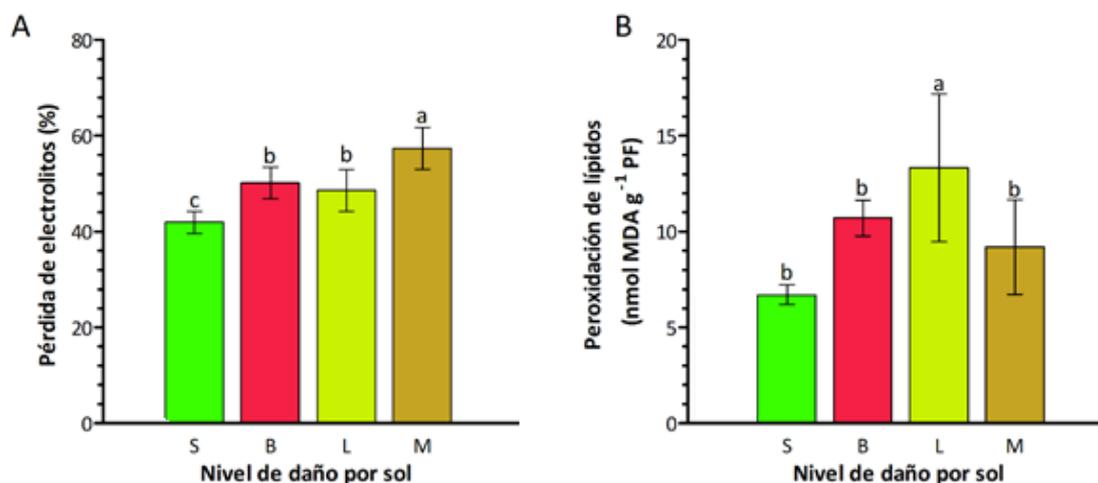


**Figura 1.6. Contenido relativo de agua (CRA) en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.** Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Estos valores se expresaron como porcentaje (%). Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 1.3.5. Metabolismo oxidativo de la piel

El estado de las membranas celulares de la piel de los frutos fue afectado negativamente por el daño por sol, con diferencias significativas en los parámetros: permeabilidad de membrana ( $p = 0,0001$ ) y peroxidación lipídica ( $p = 0,0033$ ) (Figura 1.9). En los tejidos con síntomas de daño por sol hubo un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares respecto a los tejidos sanos. Estos incrementos fueron de 19 % en B, 16 % en L y 37 % en M respecto a S (Figura 1.7.A).

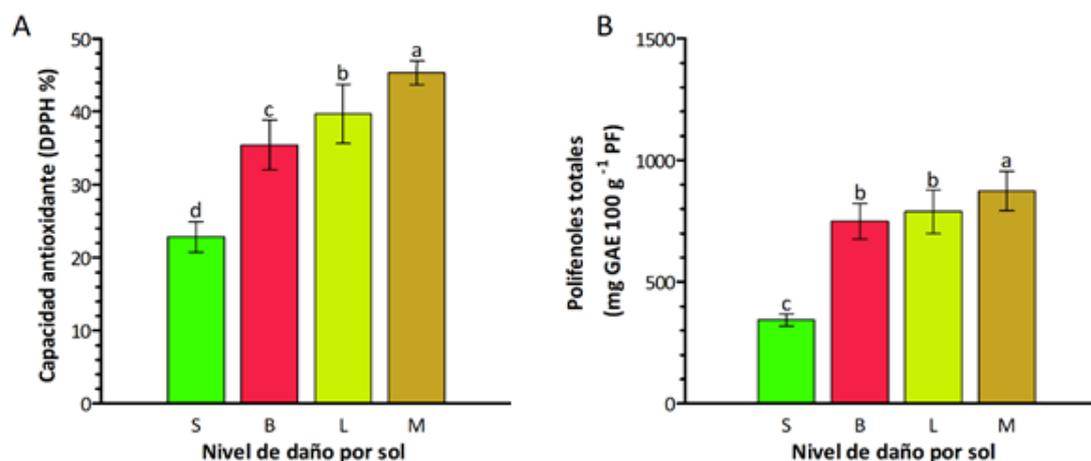
La peroxidación de lípidos de membrana fue mayor en los tejidos con daño por sol (Figura 1.7.B). Esta situación fue más notoria en los tejidos L, con un aumento del nivel de MDA de  $6,69 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$  en S a  $13,31 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$  en L. Los tejidos B y M presentaron incrementos del 60 % y 37 % respectivamente comparados a los tejidos sanos.



**Figura 1.7. Variación de la pérdida de electrolitos (A) y peroxidación de lípidos (B) en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera D' al momento de cosecha.** Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Los resultados de pérdida de electrolitos se expresaron como porcentaje (%). Los resultados de peroxidación lipídica se expresaron como los nmoles de malondialdehído por g PF de piel por reacción con el ácido tiobarbitúrico. Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

Por otro lado, la capacidad antioxidante de los tejidos con daño por sol se incrementó significativamente ( $p < 0,0001$ ) respecto a los tejidos sanos (Figura 1.8.A). Los tejidos S presentaron un valor de 22,8 % DPPH, mientras que los tejidos con daño por sol presentaron valores de 35,4 % en B, 39,7 % en L y 45,4 % en M, representando un incremento del sistema de defensa.

El contenido de polifenoles totales (Figura 1.8.B) fue significativamente mayor en los tejidos con daño ( $p < 0,0001$ ). Estos incrementos fueron del 117 % en B, 129 % en L y 154 % en M respecto del tejido S.



**Figura 1.8. Capacidad antioxidante (A) y contenido de polifenoles totales (B) en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.** Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición de 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y mg de ácido gálico equivalente (GAE) en 100 g PF. Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

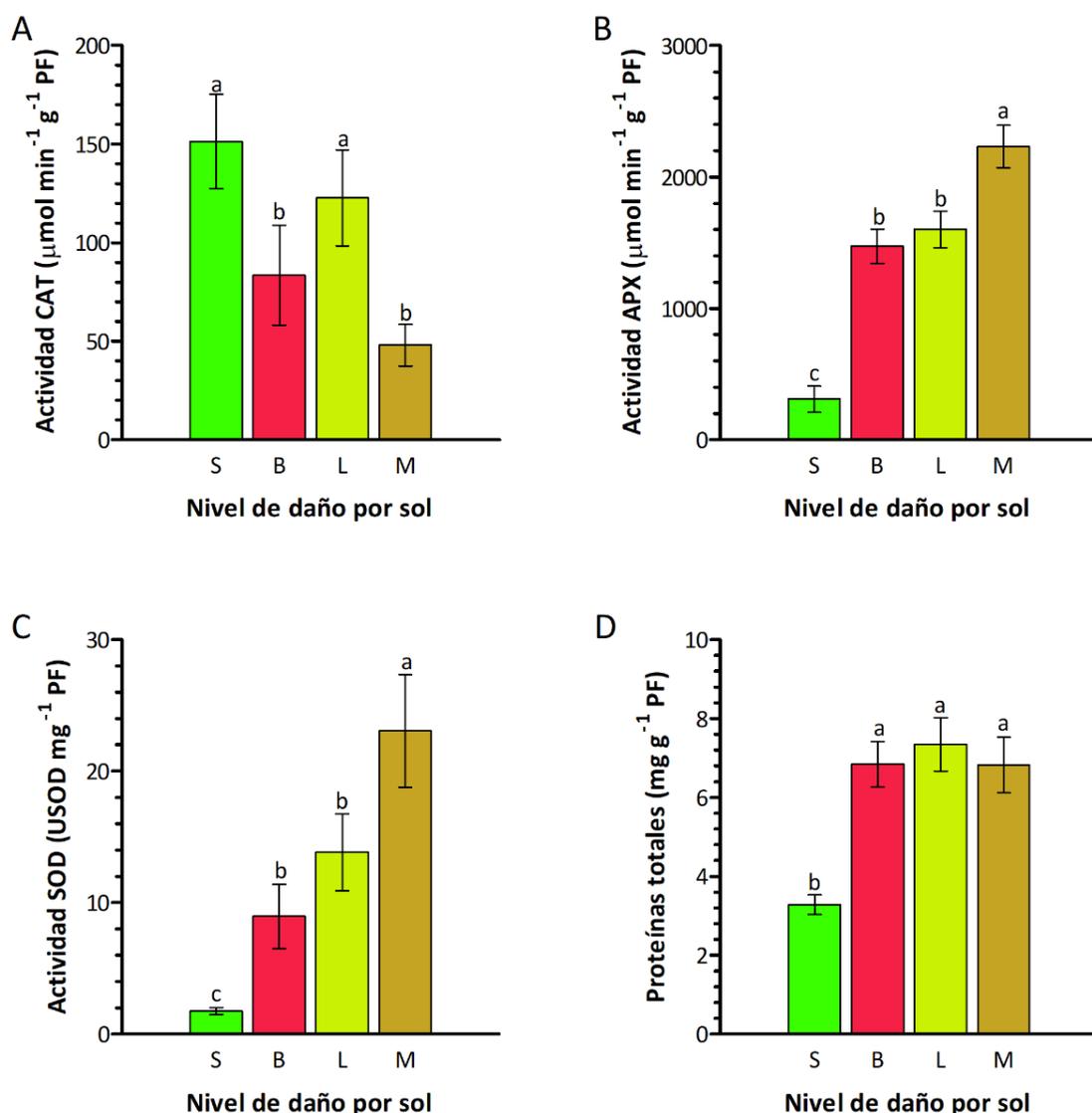
Las enzimas antioxidantes evaluadas presentaron actividades diferentes según el nivel de daño por sol de los tejidos de piel (Figura 1.9).

La actividad de la enzima CAT (Figura 1.9.A) disminuyó con el daño por sol. Los tejidos L presentaron una reducción de la actividad de CAT del 19 % respecto de S, pero no fue significativa. Mientras, los tejidos B y M presentaron una caída significativa de la actividad de CAT respecto los tejidos S, con descensos de 45 % y 68 % respectivamente.

Contrariamente a lo observado en CAT, se observó un marcado incremento de la actividad de las enzimas SOD y APX en los tejidos con daño por sol, aumentando significativamente con la intensidad del daño.

En los tejidos sanos, la actividad promedio de APX fue  $309,49 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ , y se incrementó significativamente en los tejidos con daño por sol, alcanzando el máximo valor en los tejidos con daño M. Los incrementos de la actividad de APX fueron del 476 % en B, 517 % en L y 720 % en M respecto S (Figura 1.9.B).

La actividad de SOD en los tejidos sanos fue en promedio  $1,7 \text{ USOD mg}^{-1} \text{PF}$ . Los tejidos con daño por sol presentaron incrementos significativos en la actividad enzimática de SOD a medida que la intensidad del daño aumentó, con 449 % en B hasta 1223 % en M respecto de S (Figura 1.9.C).



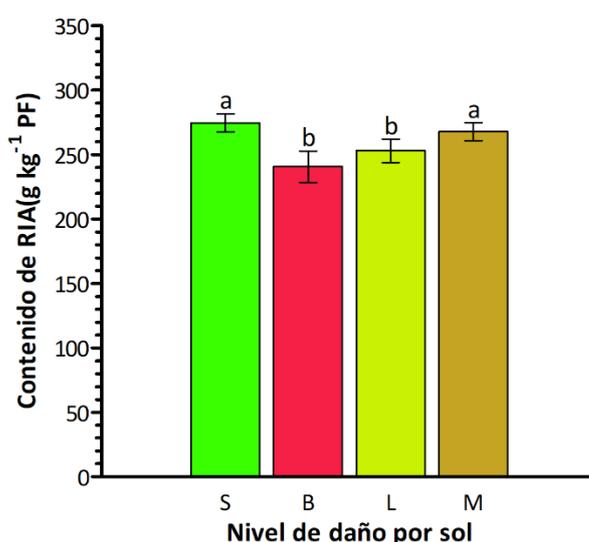
**Figura 1.9.** Determinación de la actividad de distintas enzimas antioxidantes y variación del contenido de proteínas solubles en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Se analizaron las enzimas catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$  para CAT (A),  $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$  para APX (B) y USOD  $\text{mg}^{-1} \text{PF}$  para SOD (C). Se determinó el contenido de proteínas totales en piel de frutos con distintos niveles de daño por sol (D). Los resultados se expresaron como  $\text{mg}$  de albúmina  $\text{g}^{-1} \text{PF}$ . Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

Se cuantificó el contenido de proteínas totales solubles en los extractos para la extracción de las enzimas antioxidantes evaluadas (Figura 1.9.D). El contenido total de proteínas en los tejidos S fue en promedio de  $3,28 \text{ mg g}^{-1} \text{PF}$ . Los tejidos con daño por sol presentaron incrementos superiores al doble en el contenido de proteínas totales respecto al tejido sano. Dado que solo se midió actividad de las enzimas antioxidantes y el contenido total de proteínas, sin la realización paralela de técnicas de western-blot

con marcadores específicos para SOD, CAT y APX, no se pudo verificar si los incrementos de proteína corresponden específicamente a las enzimas evaluadas.

### 1.3.6. Componentes de la pared celular de la piel

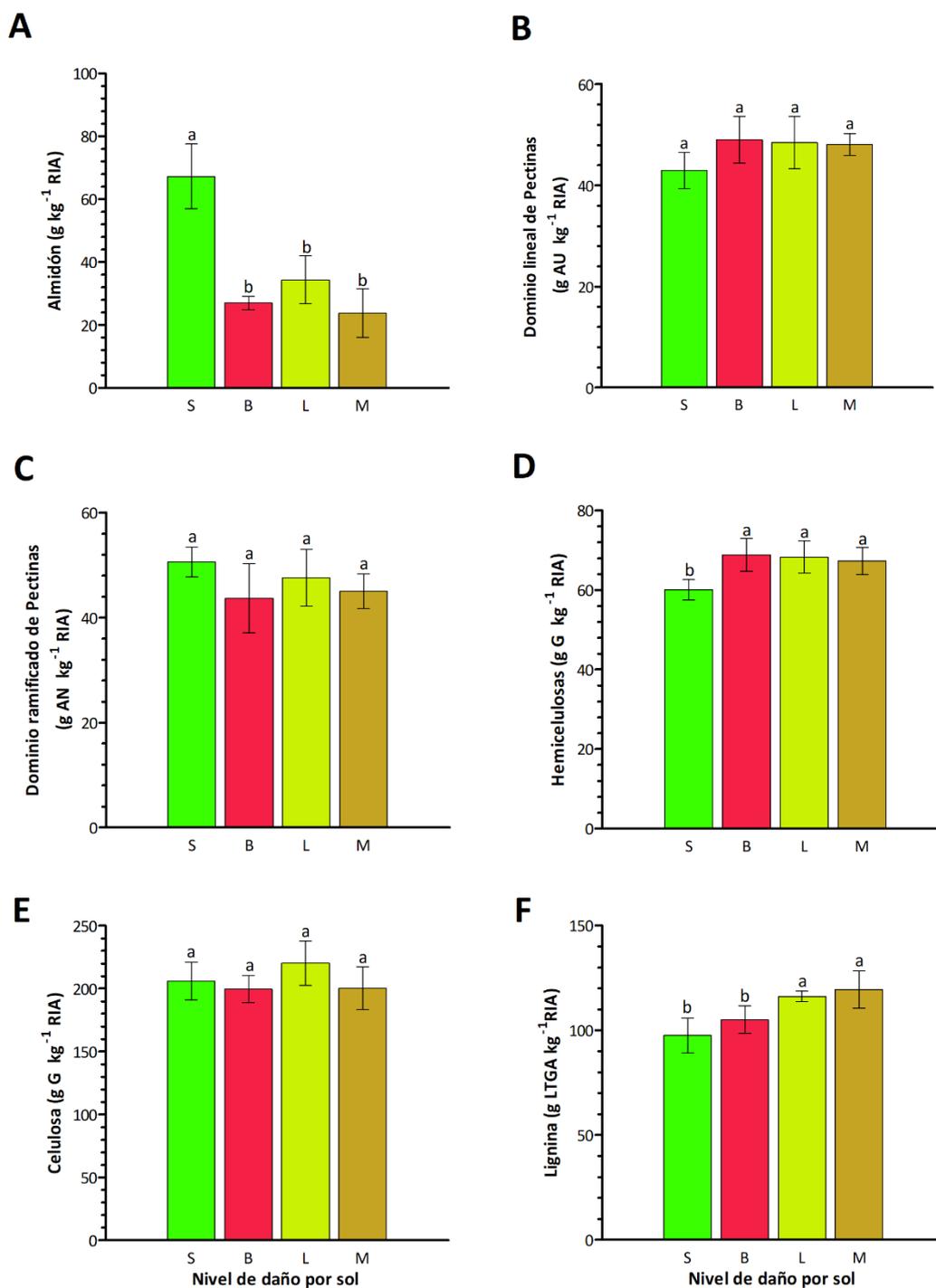
El contenido de RIA en la piel de frutos de pera Anjou representó un 25 % del peso fresco (Figura 1.10). Los tejidos con daño por sol presentaron una reducción del contenido de RIA, siendo significativa en B y L. Las reducciones fueron del 12 % en B, 8 % en L y menos de 2 % en M respecto de S.



**Figura 1.10. Contenido de RIA en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.** Los resultados se expresaron en g de residuo insoluble en alcohol (RIA) cada kg de piel. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

En la Figura 1.11 se observan los distintos componentes analizados en la pared celular según el daño por sol presentado en los tejidos.

El almidón puede ser un contaminante para las determinaciones de los componentes de la pared celular. Los frutos de pera suelen almacenar azúcares en forma de almidón, presentando altos contenidos de este componente en el momento de la cosecha. Los tejidos sanos presentaron un valor promedio de 67,2 g de almidón kg<sup>-1</sup> RIA. El contenido de almidón fue menor en los tejidos con daño por sol, siendo esta caída superior al 45 % respecto de los tejidos S (Figura 1.11.A).



**Figura 1.11. Variación del contenido de los componentes de la pared celular en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.** Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Se cuantificó el contenido de almidón por prueba de iodina (A), ácidos urónicos (AU) y azúcares neutros (AN) en la fracción enriquecida de pectina (B y C respectivamente), glucosa (G) en las fracciones enriquecidas con hemicelulosas (D) y celulosa (E) y lignina (LTGA) (F). Los resultados se expresaron como g almidón, AG, AN, G y LTGA cada kg de RIA (residuo insoluble en alcohol) respectivamente. Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC; p ≤ 0,05).

El contenido total de pectinas no fue afectado significativamente por el daño por sol. El contenido de dominios lineales corresponde a la suma del contenido de AU de las fracciones PSA, PSE y PSH. Los valores medios ( $\text{kg}^{-1}$  RIA) fueron 42,9 en S, 49,0 en B, 48,5 en L y 48,0 en M (Figura 1.11.B). El contenido total de ramificaciones de pectinas, evaluado mediante la suma del contenido de NS de cada fracción, tampoco reflejó diferencias significativas entre los distintos niveles de daño por sol (Figura 1.11.C).

El contenido de hemicelulosas (Fig. 1.11.D) fue de  $60,0 \text{ g G kg}^{-1}$  RIA en S, mientras que en los tejidos con daño por sol hubo un incremento superior al 10 %. Los valores de hemicelulosas fueron de 68,8, 68,3 y  $67,3 \text{ g G kg}^{-1}$  RIA en B, L y M respectivamente.

El contenido de celulosa en la piel sana de frutos de pera Anjou (S) fue  $206,1 \text{ g G kg}^{-1}$  RIA. No se observaron diferencias en el contenido de celulosa entre los distintos niveles de daño por sol estudiados (Figura 1.11.E).

El contenido de lignina (Figura 1.11.F) en tejidos S fue  $97,5 \text{ g LTGA kg}^{-1}$  RIA. Los tejidos con daño por sol presentaron incrementos del contenido de lignina, siendo este aumento significativo en los tejidos L y M. Los aumentos fueron del 8 % en B, 19 % en L y un 23 % en M respecto a S.

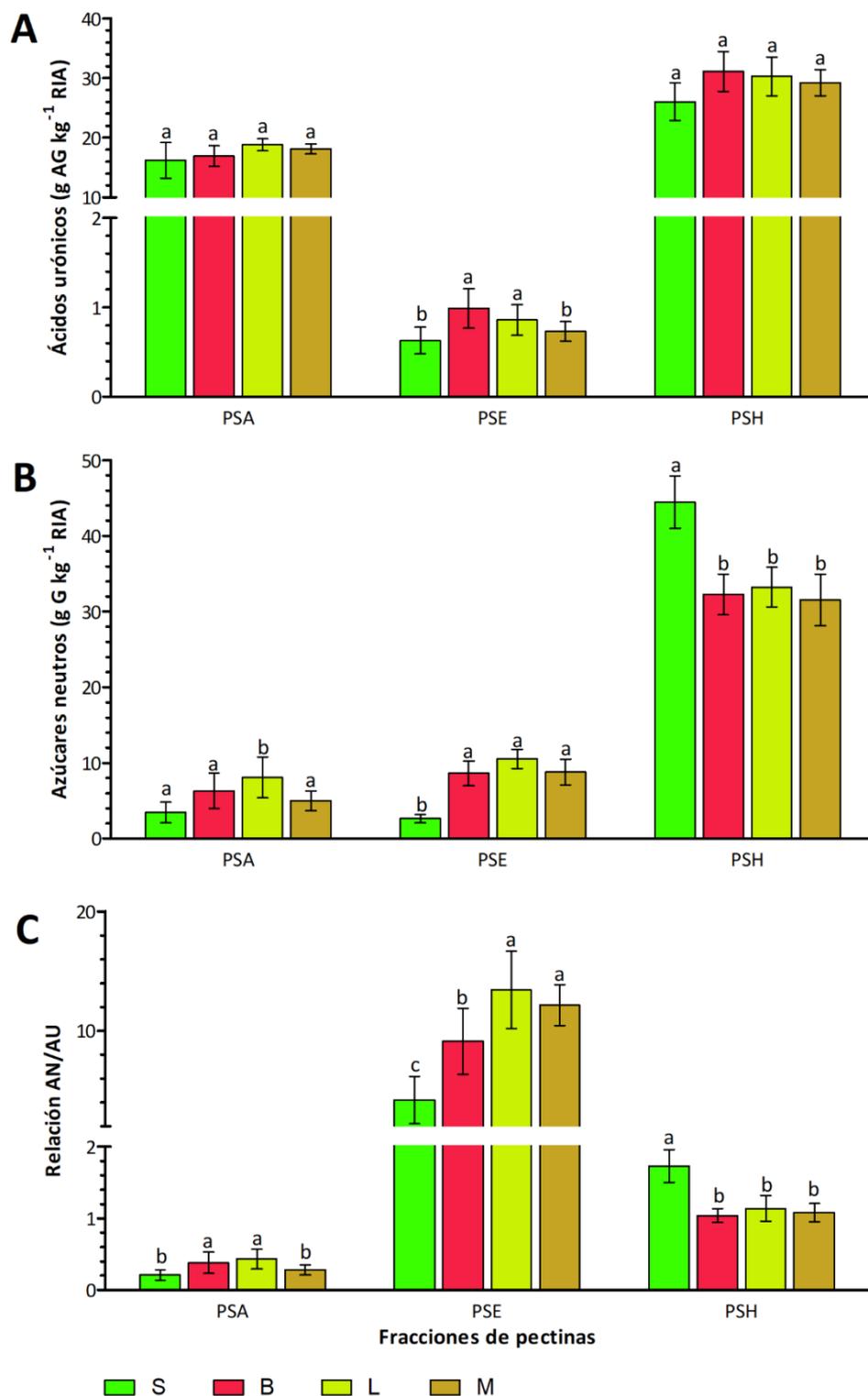
Se profundizó el análisis del contenido de pectinas en la piel de los frutos de pera con daño por sol a través del fraccionamiento en: pectinas débilmente unidas (PSA), iónicamente unidas (PSE) y covalente o fuertemente unidas (PSH) a la pared (Figura 1.12).

La Figura 1.12.A, muestra cantidades de AU en las distintas fracciones pectínicas, representando los dominios lineales, principalmente debido a la presencia de HG. El tejido S presentó una distribución de 61 % de pectinas fuertemente unidas, 38 % de pectinas débilmente unidas y 1 % de pectinas unidas iónicamente. La distribución de UA en las fracciones de pectinas provenientes de frutos con daño por sol fue similar y no se observaron diferencias significativas en el contenido respecto a los frutos sanos en las fracciones PSA y PSH. Los tejidos con daño B y L presentaron incrementos en el contenido de AU significativos en la fracción PSE. Estos incrementos fueron del 57 % en B y 36 % en L respecto de S.

En la Figura 1.12.B, se observa el contenido de cadenas laterales en las distintas fracciones pectínicas, medidas como AN. En los tejidos S, el 88 % de las ramificaciones se encontraron en la fracción de pectinas fuertemente unidas a la pared celular, seguida de un 7 % en la fracción débilmente unida y un 5 % en la fracción iónicamente unida. Estas proporciones se encontraron alteradas significativamente en la piel de los frutos con daño por sol. En la fracción PSH, hubo un marcado descenso del contenido de AN en los tejidos con daño por sol, sin presentar diferencias entre los niveles de daño. Este descenso fue superior al 25 % respecto de los tejidos S. En PSE, los tejidos

con daño por sol presentaron un incremento del contenido de AN superior al doble del hallado en frutos sanos (2,7 g G kg<sup>-1</sup> RIA en S; 8,6 G kg<sup>-1</sup> RIA en B; 10,5 G kg<sup>-1</sup> RIA en L y 8,8 G kg<sup>-1</sup> RIA en M). Finalmente, en PSA, si bien se observó un aumento del contenido de AN en los tejidos con daño por sol, el incremento fue significativo solo en los tejidos con daño L (132 % superior a S).

La relación entre el contenido de AN y AU permite evaluar el grado de ramificación de las pectinas. En los tejidos sanos se observó un mayor grado de ramificación en las pectinas iónicamente unidas a la pared (68 %), seguida por las pectinas fuertemente unidas (28 %) y débilmente unidas (3 %). Los tejidos con daño por sol presentaron marcados cambios en el grado de ramificación de las pectinas respecto a los tejidos sanos por sol (Figura 1.12.C). El grado de ramificación se redujo significativamente en las pectinas fuertemente unidas a la pared con daño por sol (más del 34 % respecto a S). En las pectinas iónicamente unidas, se observó un incremento significativo del grado de ramificación en relación con el daño por sol, acentuándose con la severidad del daño. Los incrementos observados fueron del 117 % en B, 220 % en L y 189 % en M respecto de S (relación AN/AU igual a 4,19). En los tejidos con daño B y L se observó un incremento significativo del grado de ramificación de pectinas en la fracción débilmente unida a la pared celular respecto de los tejidos sanos. Estos incrementos fueron equivalentes a 81 % en B y 105 % en L respecto de la relación de AN/AU de S (0,21). Los tejidos con daño M no presentaron variaciones respecto a los tejidos sanos en la fracción PSA.



**Figura 1.12.** Variación del contenido de ácidos urónicos (AU) (A), azúcares neutros (AN) (B) y relación de AN/AU (C) en las fracciones peptídicas en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha. PSA (pectinas solubles en agua); PSE (pectinas solubles en EDTA); PSH (pectinas solubles en ácido). Los niveles de daño por sol evaluados fueron sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M). Los resultados se expresaron como mg AG (ácido galacturónico) y mg G (glucosa) cada g de RIA (residuo insoluble de alcohol). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 1.4. DISCUSIÓN

#### 1.4.1. El daño por sol modifica la composición de pigmentos de la piel alterando el color

El color de piel es un atributo determinante en la clasificación de los frutos en sus categorías comerciales. Las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollan los frutos forman parte de los factores que determinan su calidad (Serra y col., 2018). La radiación solar es un factor necesario para el crecimiento y desarrollo de los cultivos, sin embargo, en condiciones extremas promueve situaciones de estrés por elevada radiación y temperatura causando daños irreversibles en los tejidos vegetales, afectando directamente la calidad final del producto (Munné-Bosch y Vincent, 2019).

El color es un factor primordial para el consumidor y es una característica tridimensional compuesta que consiste en un atributo de luminosidad y dos de cromaticidad (tono y saturación). Las peras var. Anjou se caracterizan por presentar un color de superficie verde claro sin color de fondo (Benítez, 2001). Los valores de HUE, croma y luminosidad, parámetros que definen el color, determinados en los frutos sanos (Tabla 1.1) coincidieron con descripciones previas en piel de frutos de var. Anjou, caracterizada por tonos verde claro (Rudell y col., 2017).

El daño por sol afectó el color de la piel de los frutos de pera var. Anjou, los tejidos dañados presentaron cambios en los parámetros de color, acentuándose estas diferencias con la severidad del daño (Tabla 1.1). Los valores del ángulo HUE sugieren un cambio del tono verde reflejado por un valor de 123° en los frutos sanos, a tonos verde amarillentos en L y amarillos en M, con valores de 106° y 96° HUE respectivamente, mientras B presento tonos rojizos con un valor promedio de 74 °. Conjuntamente, hubo una pérdida en la saturación del color reflejada por la reducción del croma. Cambios similares fueron reportados en piel de frutos de manzana con daño por sol, virando la piel afectada hacia tonos amarillos y marrones con el incremento de la severidad del daño, indistintamente del color de la variedad (Zupan y col., 2014; Felicetti y Schrader, 2009a). La modificación del color típico de la variedad a colores amarillos o marrones debido al daño por sol genera el rechazo por parte de los consumidores (Munné-Bosch y Vincent, 2019). Particularmente en peras verdes como var. Bartlett (Raffo y col., 2011) y Anjou (Rudell y col., 2017) se han reportado cambios en la tonalidad y luminosidad hacia colores verde amarillentos en las caras expuestas a la luz solar directa sin presentar daño.

El color de la piel de los frutos se asocia con la composición y concentración de distintos pigmentos. En la piel de frutos de peras se destacan tres familias de pigmentos: clorofilas, carotenoides y antocianinas (Ngo, 2007). El color verde característico de los frutos de peras var. Anjou se corresponden con un alto contenido de clorofilas respecto de otros pigmentos como carotenoides o antocianinas, los cuales

se asocian con tonos amarillos, anaranjados y rojizos. Los tejidos con daño por sol presentaron cambios relevantes en la concentración de estos pigmentos respecto a los tejidos sanos (Figura 1.5).

La pérdida de clorofilas es uno de los cambios más reportados en los tejidos con daño por sol, asociado al cambio de tono a amarillo amarronado en frutos de manzanas (Morales-Quintana y col., 2020; Vita, 2018; Hernández y col., 2014; Zupan y col., 2014; Felicetti y Schrader, 2009a). En la piel de los frutos de pera Anjou, los tejidos con daño por sol mostraron una marcada reducción del contenido de clorofilas respecto a los tejidos sanos, acentuándose la pérdida de estos pigmentos con la severidad del daño (Figura 1.5.A-B). Estos cambios se visualizaron como la disminución del tono verde en la piel. Este efecto fue descrito en variedades de manzanas de color verdes y amarillas con daño por sol (Vita, 2018; Hernández y col., 2014). La pérdida de este pigmento es una consecuencia y un síntoma general del estrés oxidativo promovido por la elevada irradiación solar incidente en la superficie de los frutos, resultando en la descomposición de la clorofila por el ataque de EROs (Merzlyak y col., 1998).

Los carotenoides forman parte de los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores. En el presente estudio, los tejidos con daño por sol B y L presentaron un incremento en el contenido de carotenoides respecto de S, mientras los tejidos con daño moderado mostraron una concentración similar a S (Figura 1.5.C). En peras se ha reportado que determinados compuestos pertenecientes a la familia de los carotenoides, como las xantofilas, presentan un efecto fotoprotector en condiciones de elevada radiación solar, así como una tendencia al incremento de su concentración bajo estas condiciones (Rudell y col., 2017). En coincidencia, otros autores han observado que el contenido de xantofilas se incrementa bajo condiciones de estrés por alta radiación y temperatura, mientras el contenido de otros tipos de carotenoides decrece con el daño por sol (Morales-Quintana y col., 2020; Tartachnyk y col., 2012; Wünsche y col., 2001). En manzanas, Felicetti y Schrader (2009a, 2008b) reportaron variaciones en el contenido de los carotenoides bajo condiciones de alta radiación y temperatura según el cultivar estudiado, y sugirieron que la mayor tolerancia al daño por sol que presentan las variedades rojas podría deberse a la mayor concentración y estabilidad térmica de estos pigmentos. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten sugerir que en frutos de pera Anjou las condiciones de alta radiación y temperatura pudieron promover la síntesis de carotenoides, los cuales participarían en la protección de pigmentos fotosintéticos (clorofilas), observado en los tejidos con daño por sol *blush* y leve. Sin embargo, la severidad del daño, promovido por mayor duración y/o intensidad del evento estresante, favoreció la degradación y pérdida de función de estos compuestos en los tejidos con daño moderado.

Otro tipo de pigmento fotoprotector que presentan los frutos de pera son las antocianinas. Los tejidos sanos de frutos de pera Anjou presentaron bajos contenidos

de antocianinas en la piel, coincidentes con reportes previos en esta misma variedad (Galvis Sánchez y col., 2003). En relación con el daño por sol, los tejidos con daño *blush* y leve mostraron un incremento significativo del contenido de antocianinas, mientras que los tejidos con daño moderado presentaron valores cercanos a cero (Figura 1.5.D). Las antocianinas son compuestos que participan en la mitigación del daño por fotoinhibición en condiciones de estrés, amortiguan el daño por radiaciones UV, luz visible y altas y bajas temperaturas y son agentes antioxidantes (Carmona Córdova, 2016; Yersen y Jordheim, 2010; Li y Cheng, 2009). Tanto la biosíntesis como la degradación de las antocianinas se han relacionado con la luz (intensidad y calidad) y las temperaturas (Chen y col., 2019; Feng y col., 2013). Steyn y col. (2004) evaluaron la degradación de antocianinas en frutos de peras en función de la intensidad de luz y temperatura, y observaron que exposiciones a alta irradiación lumínica y/o temperaturas superiores a 30 °C aceleran la degradación de estos pigmentos, mientras que temperaturas entre 20 a 25 °C favorecen la síntesis. Si bien las condiciones ambientales son determinantes de la concentración de antocianinas, también existe un factor genético dependiente de la especie y cultivar. En las peras, las antocianinas se desarrollan durante el crecimiento del fruto y muestran un decrecimiento hacia la cosecha, que es potenciado por la elevada irradiación sobre los frutos expuestos al sol (Zhang y col., 2011; Steyn y col., 2004). Particularmente, los frutos de pera Anjou que crecen y se desarrollan en condiciones de mayor intensidad lumínica suelen desarrollar una tonalidad rojiza en la mejilla expuesta al sol, asociada con un incremento del contenido de antocianinas (Serra y col., 2019). Por otro lado, bajo situaciones de estrés por elevada radiación, se ha reportado que las plantas activan mecanismos de defensa que involucran el aumento de la concentración de antocianinas en los tejidos favoreciendo la foto-protección de los cloroplastos (Zheng y col., 2021). Sin embargo, dependiendo de la intensidad y duración del evento estresante, el contenido de antocianinas puede reducirse drásticamente por procesos de degradación química o enzimáticos (peroxidasas,  $\beta$ -glucanasas) inducidos por el desbalance oxidativo (Thomson y col., 2018).

El mayor contenido de pigmentos fotoprotectores en los tejidos B y L sugiere que estos frutos se desarrollaron bajo condiciones lumínicas y térmicas que promovieron la activación de mecanismos de protección frente al estrés por elevada radiación solar. Los resultados sugieren que se estimularon más los procesos de síntesis de antocianinas y carotenoides que los de degradación. En cambio, en los frutos con daño moderado (M) las condiciones de exposición potenciaron la degradación de los pigmentos fotoprotectores y fotosintéticos. Asimismo, la menor pérdida de clorofilas en los tejidos con daño *blush* y leve asociado con el mayor contenido de antocianinas y carotenoides que presentaron permite reforzar la idea del rol fotoprotector de estos compuestos en las células, fundamentalmente sobre los cloroplastos (Merzlyak y col., 2002). Resultados similares fueron reportados en clones rojos de frutos de pera var. Anjou, donde la mayor capacidad fotoprotectora frente al

estrés lumínico de estos tejidos respecto a frutos verdes se correlacionó positivamente con el mayor contenido de antocianinas en la piel de los frutos (Li y col., 2008).

### **1.4.2. El daño por sol afecta la calidad interna de los frutos de pera**

La calidad de los frutos está definida por distintos atributos como el color, previamente descrito, la firmeza y la composición de azúcares y ácidos orgánicos. En las peras los índices de madurez determinan el momento óptimo de cosecha, así como el manejo de conservación y destino de la fruta (Mesa Juliani, 2015).

En este estudio, los frutos de pera var. Anjou presentaron un incremento de la firmeza de pulpa en el sector con síntomas de estrés por elevada radiación solar (Tabla 1.2) coincidente con reportes realizados previamente en frutos de manzana con daño por sol (Vita y col., 2019; Torres y col., 2013; Racskó y Schrader, 2012). Se ha reportado que los cambios de firmeza en tejidos desarrollados bajo condiciones estresantes pueden deberse a cambios anatómicos y morfológicos en las células (Gambetta y col., 2021; Felicetti y Schrader, 2008a; Polito y col., 2002), modificación en la estructura y composición de la pared celular (Torres y col., 2020; Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015) y/o a cambios en el estado hídrico del tejido (Torres y col., 2013), como resultado de la activación de diversos mecanismos de respuestas y defensa en las plantas. Particularmente, con relación al estado hídrico, en el presente trabajo no se detectaron cambios significativos en el CRA en los tejidos de pera con diferentes niveles de daño por sol (Figura 1.6). Si bien se ha reportado que el daño por sol afecta el estado hídrico de los tejidos en frutos de manzanas (Torres y col., 2013; Schrader y col., 2009; Racskó y col., 2005), no hay datos respecto a CRA en fruto de pera en relación con el daño por sol. La ausencia de cambios en el contenido de agua en los tejidos de piel de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol podría deberse a los cambios ocurridos sobre la estructura de la cutícula y la pared celular. La reducción de profundidad y área de micro-grietas y el incremento del grosor de la pared celular podrían limitar la pérdida de agua de los tejidos dañados.

Otros atributos afectados por el daño por sol en los frutos de pera fueron el contenido de sólidos solubles, almidón y acidez (Tabla 1.2). Los frutos con daño por sol (B, L y M) presentan mayor contenido de sólidos solubles y valores superiores de degradación de almidón, acentuándose las diferencias con la severidad del daño. Resultados similares han sido reportados en frutos de manzana (Vita y col., 2019; Tartachnyk y col., 2012). Algunas investigaciones atribuyeron estos cambios a un avance madurativo en el área afectada por el daño por sol (Rudell y col., 2017; Schrader y col., 2009; Woolf y Ferguson, 2000); sin embargo, reportes actuales relacionan la participación del metabolismo del almidón y los cambios en la concentración de azúcares como respuestas para adquirir tolerancia frente a situaciones de estrés. Estas variaciones en el contenido de azúcares afectan diversos procesos fisiológicos como la regulación de turgencia celular, la protección de membranas celulares y proteínas, el aporte energético para biosíntesis de proteínas,

compuestos protectores y mensajeros químicos (Dong y Beckles, 2019; Zhao y col., 2019; Thalmann y Santelia, 2017).

La acidez en los frutos de pera var. Anjou con daño por sol fue menor que en los frutos sanos, comportamiento descrito en distintas variedades de manzana con diferentes niveles de daño por sol (Schrader y col., 2009). El descenso del ácido málico en frutos se asocia con el avance de la maduración, empleándose este compuesto como fuente de carbono para distintos procesos metabólicos (Rudell y col., 2017). Sin embargo, aunque es claro que el estrés por elevada radiación promueve la reducción de acidez en los tejidos afectados, aun no se ha podido corroborar si esto evidencia un estado de madurez acelerado o la activación de vías metabólicas asociadas a una respuesta por el estrés (McTavish y col., 2020). Estudios actuales han determinado que la enzima málico-NADP presenta un rol clave en el incremento de tolerancia frente a situaciones de estrés abiótico. Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa del ácido málico, aumentando el contenido de NADPH el cual actúa como agente reductor en otras reacciones, participa en la síntesis de sustancias de defensa y contribuye directamente en el metabolismo de EROs y en la reducción del daño causado por estrés oxidativo (Li y col., 2022; Sun y col., 2019; Blanch y col., 2013).

El incremento de firmeza, la degradación de almidón, el incremento de sólidos solubles y los cambios en el contenido del ácido málico en los frutos con daños por sol, podrían indicar que no se trata simplemente de un estado de madurez acelerado sino de una respuesta frente a factores estresantes. Nuevos enfoques científicos relacionados al comportamiento de las plantas frente a estrés abiótico (Dong y Beckles, 2019; Sun y col., 2019; Le Gall y col., 2015), permiten sugerir que los cambios observados en los parámetros de madurez de frutos de pera Anjou con daño por sol pueden ser el resultado de la activación de distintas vías metabólicas asociadas con la defensa y la adquisición de tolerancia y supervivencia en los tejidos frente al exceso de radiación solar.

### **1.4.3. El daño por sol altera la estructura de las células de la piel de los frutos**

En este trabajo se observó que la piel de frutos sanos de pera Anjou está constituida por una capa cuticular que recubre la epidermis formada por una capa de células prismáticas continuas. La pared celular de estas células no se distingue en las zonas de contacto con la capa cuticular posiblemente debido a que la cutícula es una modificación de la pared celular epidérmica o bien una parte constitutiva de esta (Javelle y col., 2011). Bajo la epidermis, continúan tres capas de células rectangulares en íntimo contacto, formando el tejido hipodérmico. El inicio del tejido parenquimático se distingue por capas continuas y desordenadas de células esféricas con espacios intersticiales, entre las paredes celulares (Figura 1.2.A).

Los resultados determinados en piel de frutos de pera Anjou con daño por sol coinciden con cambios anatómicos descritos en otras especies frutales (Gambetta y

col., 2021; Felicetti y Schrader, 2008a; Polito y col., 2002). Se destaca en todas las observaciones microscópicas un engrosamiento de la pared celular en los tejidos afectados por estrés por elevada radiación solar y temperatura. Distintos reportes asocian esta modificación en la pared celular con un incremento del contenido de hemicelulosas y ligninas, así como la remodelación de distintos componentes de la pared (Torres y col., 2020; Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015; Raffo y col., 2012), y no a un hinchamiento resultado de la degradación de la matriz pectínica y la relajación de la red fibrilar de la pared como sucede durante el proceso de maduración de los frutos (Wang y col., 2018; Brahem y col., 2017). Esto fortalece la idea de que los cambios en parámetros de madurez no se corresponden al avance madurativo acelerado, sino que son el resultado de la activación de mecanismos de defensa para adquirir tolerancia y adaptarse a las condiciones desfavorables del entorno.

La capa cuticular consiste en una cubierta hidrofóbica que funciona como barrera protectora frente a estrés biótico y abiótico. La cutícula permite reducir la pérdida de agua, el daño mecánico, las infecciones por patógenos y la penetración de radiaciones UV, debido a la reflexión de los rayos o a que la radiación es absorbida por flavonoides y/o ácido ferúlico presentes (Chai y col., 2020; Tang y col., 2017; Solovchenko y Merzlyak, 2003). En frutos como el tomate, manzana y pera, la cutícula presenta micro-grietas interconectadas que junto con las lenticelas aumentan la permeabilidad del tejido, facilitando los procesos de transpiración y pérdida de agua (Segado y col., 2016; Konarska, 2014, 2013). La cantidad, profundidad y ancho de las micro-grietas varía según la especie y variedad, como también durante el crecimiento, desarrollo, almacenamiento y vida útil del fruto (Veraverbeke y col., 2003a, 2003b). En el presente trabajo, la cutícula de los frutos sanos de pera Anjou presentó numerosas micro-grietas superficiales, profundas, angostas e interconectadas sobre la superficie (Figura 1.3). Sin embargo, en los frutos con daño por sol, las micro-grietas formaron una red de suaves ondulaciones superficiales, probablemente debido a que las altas temperaturas alcanzadas en la superficie de la cara expuesta provocan la fusión de las ceras de la cutícula y el sellado de las grietas. Estudios en tratamientos térmicos postcosecha en manzana Golden Delicious demostraron que las altas temperaturas afectan la cantidad, estructura y forma de los cristales de las ceras epicuticulares, lo cual estaría asociado a la reducción de la red de fisuras en la cutícula, afectando la permeabilidad de la piel (Roy y col., 1994). En bayas de uva expuestas al sol, hubo un predominio de estructuras de ceras amorfas frente a las cristalinas presentes en frutos que se desarrollaron en la sombra (Gambetta y col., 2021). En este estudio se sugiere que las temperaturas alcanzadas en la superficie del fruto, superiores a 40 °C, promovieron la fusión y recristalización de las ceras, alterando la forma, densidad y profundidad de las micro-grietas. A su vez, estos cambios pudieron promover la reducción del espesor de la capa cuticular en los frutos con daño moderado (Tabla 1.3). Resultados similares se reportaron en manzana Cripps' Pink, con reducción del espesor de la cutícula en la piel de frutos con daño por sol severo comparados con

frutos sanos y daño leve (Daiber, 2017). Los cambios en la cutícula de la piel de los frutos con daño por sol pueden tener efectos sobre el intercambio gaseoso con el entorno y afectar directamente la calidad del producto.

#### **1.4.4. Los frutos con daño por sol sufrieron daño oxidativo, pero presentan mayor capacidad antioxidante como resultado de la activación del sistema de defensa**

El estado de permeabilidad y peroxidación lipídica de las membranas son indicadores del daño oxidativo en los tejidos promovido por situaciones de estrés (Sharma y col., 2012). Los incrementos de pérdida de electrolitos y MDA en los tejidos B, L y M de piel de pera Anjou indicaron que sufrieron daño oxidativo (Figura 1.7). Estos resultados concuerdan con evaluaciones realizadas en frutos de manzana con daño por sol, donde los autores señalan que la mayor peroxidación lipídica encontrada en los tejidos afectados indica que el sistema antioxidante fue incapaz de hacer frente los procesos oxidativos desencadenados por la elevada radiación y temperatura a la cual fueron sometidos durante su desarrollo (Colavita, 2022; Munné-Bosch y Vincent, 2019; Vita, 2018; Chen y col., 2008). Cuando el nivel de EROs excede los mecanismos de defensa, se producen daños a biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN. El exceso de EROs incrementa la peroxidación de lípidos tanto en la membrana celular como en las membranas de las organelas, lo que finalmente afecta el funcionamiento celular (Halliwell, 2006).

Los eventos de estrés activan distintos mecanismos de defensa en las plantas, entre los cuales se destaca el sistema antioxidante. En la piel de los frutos de pera Anjou con daño por sol se determinó una mayor capacidad antioxidante (Figura 1.8.A), coincidente con resultados publicados en frutos de manzana por Colavita (2022), Vita (2018) e Iamsub y col. (2009). Sin embargo este aumento de la capacidad antioxidante no fue suficiente para contrarrestar el daño promovido por la elevada radiación y temperatura, observado por la mayor peroxidación de lípidos y la caída en el contenido de clorofilas en tejidos dañados.

Los fenoles son sustancias indispensables en funciones fisiológicas de las plantas, destacando su rol en la defensa frente a estrés bióticos y abióticos (Carmona Córdova, 2016). Estos compuestos participan en la estabilización de biomoléculas para atenuar el efecto de los procesos oxidativos y se correlacionan positivamente con la capacidad antioxidante de los frutos (Vieira y col., 2009). En los frutos de pera Anjou sometidos a estrés por elevada radiación y temperatura se observó un incremento significativo en el contenido de polifenoles totales (Figura 1.8.B), resultado que se corresponde con investigaciones previas en piel con daño por sol de manzanas var. Braeburn, Golden Delicious, Granny Smith y red Delicious (Colavita, 2022; Zupan y col., 2014; Yuri y col., 2010; Felicetti y Schrader, 2009b). Estos resultados sugieren que el notable aumento de polifenoles en la piel de frutos de pera Anjou con daño por sol correlaciona positivamente con el incremento de la capacidad antioxidante de los

tejidos. Este comportamiento se reportó en frutos de pera que no desarrollaron síntomas de daño por sol, con incrementos de polifenoles y capacidad antioxidante en las caras expuestas a mayor incidencia de luz (Serra y col., 2018; Zhao y col., 2016). El incremento de polifenoles, aunque contribuye negativamente al aspecto de los frutos con daño por sol al aportar tonos amarillos y marrones al color de la piel, representa una ventaja comercial en estos frutos dado que son compuestos con efectos benéficos para la salud humana (Yuri y col., 2010).

Junto al aumento del contenido de polifenoles, en las plantas se activan otros mecanismos de defensa frente a eventos estresantes, entre los cuales se destaca el sistema antioxidante enzimático. El sistema de defensa enzimático de las plantas incluye distintas enzimas como catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa y se ha propuesto que estas desempeñan un papel más relevante que los compuestos fenólicos en la preservación de la calidad de los frutos (Zhao y col., 2016).

Trabajos previos realizados en variedades de piel verde y roja de pera Anjou reportaron que la actividad de CAT no se vio afectada por el efecto de la exposición a luz solar (Zhao y col., 2016; Li y col., 2008). En cambio, en el presente estudio se registró una disminución de la actividad de CAT en los tejidos con daño por sol (Figura 1.9.A). Estos resultados coinciden con evaluaciones realizadas en diversas variedades de manzanas con daño por sol, donde se determinó una marcada pérdida de actividad de CAT juntamente con el incremento del daño (Colavita, 2022; Tsantili y col., 2007; Ma y Cheng, 2003). La enzima CAT participa en procesos de eliminación del peróxido de oxígeno generado en los peroxisomas por procesos de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, foto-respiración y catabolismo de purinas en el metabolismo celular y bajo diversas situaciones de estrés abiótico (Sharma y Ahmad, 2014). Sin embargo, frente a eventos de elevada radiación y temperatura en frutos de pera Anjou, CAT no sería una enzima clave para la detoxificación de EROs.

Estudios realizados en pera Anjou expuestos a la luz solar, pero sin desarrollo de síntomas por daño por sol, registraron incrementos significativos de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, APX y GR, respecto a frutos mantenidos a la sombra (Zhao y col., 2016; Li y col., 2008). En este estudio, los frutos afectados por daño por sol mostraron un aumento significativo de las actividades de SOD y APX en la piel (Figura 1.9.B-C). En frutos de manzana se ha documentado previamente que el daño por sol incrementa la actividad de estas enzimas (Colavita, 2022; Chen y col., 2013; Racskó y Schrader, 2012). La enzima SOD es considerada la primera línea de defensa contra el incremento de EROs (Gill y Tuteja, 2010), mientras APX participa en la eliminación del  $H_2O_2$  en el ciclo glutatión-ascorbato (Suzuki y col., 2012). Los incrementos de SOD y APX en los tejidos afectados por daño por sol sugieren la participación directa de ambas enzimas en procesos de detoxificación frente al daño oxidativo causado por elevada radiación y temperatura en pera Anjou.

El incremento del contenido de proteínas solubles en los extractos enzimáticos de los tejidos con daño por sol (Figura 1.9.D), podría deberse a un aumento de síntesis de enzimas antioxidante evidenciado en la mayor actividad de SOD y APX en los tejidos afectados. Sin embargo, se debe considerar que el aumento del contenido de proteínas solubles podría incluir otras proteínas no analizadas en este trabajo.

Los datos obtenidos sugieren que el daño por sol es resultado, en parte, a procesos oxidativos debidos al estrés por elevada radiación y temperatura. Estas condiciones promueven la activación positiva de la capacidad y el sistema antioxidante enzimático el cual no es suficiente para mitigar el daño oxidativo generando síntomas de daño por sol en los tejidos expuestos. En el caso de los frutos afectados por daño por sol tipo bronceado, los resultados sugieren que la exposición a elevada radiación y temperatura incrementa el sistema de defensa antioxidante respecto a los frutos sanos, y estos adquieren mayor tolerancia a futuras exposiciones estresantes, por lo cual el daño por sol no progresa.

### **1.4.5. En la piel de frutos con daño por sol, las paredes celulares sufren cambios en su contenido, composición y distribución**

En este trabajo, los valores de RIA en piel de pera fueron aproximadamente el doble de los reportados en otras variedades de peras europeas como Bartlett, De Cloche y Blanquilla (Brahem y col., 2017; Raffo, 2013; Martin-Cabrejas y col., 1994). Esta discrepancia puede reflejar verdaderas diferencias entre las variedades de peras o pueden deberse al espesor de tejido estudiado, dado que el rendimiento de RIA depende del modo de obtención de la muestra, siendo menor cuanto mayor sea el contenido de pulpa presente. En el caso de pera Anjou, el rendimiento de RIA fue similar en tejidos sanos y con daño moderado, mientras que se detectó un valor menor en tejidos con daño por sol *blush* y leve (Figura 1.11). En reportes previos realizados en pulpa de frutos de manzana y pera no se observaron diferencias en el contenido de RIA frente a distintos niveles de exposición al sol y daños por sol (Torres y col., 2020; Raffo y col., 2011).

En el presente trabajo se encontró un marcado descenso del contenido de almidón en el RIA de los tejidos con daño por sol, acentuándose la degradación con la intensidad del síntoma (Figura 1.11.A), comportamiento observado paralelamente en la pulpa de estos frutos (Tabla 1.2). Como se mencionó anteriormente, la reducción del contenido de almidón en los tejidos se relaciona con distintos procesos fisiológicos asociados a mecanismos de defensa y tolerancia frente a eventos de estrés abióticos (Dong y Beckles, 2019; Zhao y col., 2019).

La pared celular es una estructura química compleja y dinámica, cambios en su arquitectura y composición química se asocian a cambios texturales que pueden afectar la funcionalidad del tejido (Dong y col., 2018). Las condiciones ambientales

extremas (temperaturas bajas y altas, exceso de radiación, salinidad, sequía, exceso de agua, contaminación, etc.) promueven cambios en la organización, estructura y composición de la pared celular (Tenhaken, 2015; Lima y col., 2013; Allan y Fluhr, 2001) como una respuesta adaptativa para mantener la funcionalidad (Wu y col., 2018; Chelli-Chaabouni, 2014). En pomáceas, Torres y col. (2020) y Raffo y col. (2011) reportaron en distintos niveles de exposición al sol, cambios en los componentes de la pared en la pulpa de frutos de manzana y pera, determinando que la luz y la temperatura afectan su estructura y modulan su plasticidad. Sin embargo, no se había analizado el efecto del daño por sol sobre la pared de células de la piel, siendo el tejido más afectado frente a la exposición y la primera barrera de protección y respuesta frente a estrés abióticos y bióticos (Liepman y col., 2010).

Los resultados expuestos en este trabajo señalan que el daño por sol provoca cambios en los componentes de la pared, afectando principalmente los compuestos fenólicos y polisacáridos no celulósicos.

Durante el proceso de maduración, los frutos de pera se ablandan como resultado de la disolución de la laminilla media y la desintegración gradual del material fibrilar de la pared celular (Brahem y col., 2017; Eccher Zerbini, 2002). Los procesos asociados a estos cambios son pérdida de cadenas laterales, depolimerización y solubilización de pectinas y hemicelulosas, causando reducción de las fracciones pectínicas y del contenido de hemicelulosas (Brahem y col., 2017; Wei y col., 2015; Murayama y col., 2006). Raffo (2013) determinó que la composición y el metabolismo de la pared celular difiere entre la piel y la pulpa de peras var. Bartlett. Resultados similares fueron informados por Brahem y col. (2017) en peras var. Blanquilla, señalando que el desmontaje de la pared celular de la piel durante la maduración es menor que en la pulpa, resultado de su mayor contenido de celulosa y lignina.

En las fracciones pectínicas de los tejidos sanos de pera Anjou, la proporción de pectinas fuertemente unidas a la pared fue superior respecto a las débil e iónicamente unidas. Esto indica que la mayoría de las pectinas están ligadas covalentemente en la pared de la piel de peras en esta variedad, resultado similar al observado por Raffo (2013) en la var. Bartlett. Respecto al daño por sol, en este trabajo no se observaron diferencias en el contenido total de pectinas entre tejidos con distintos niveles de daño por sol (Figura 1.11.B-C). Mientras que, en el análisis de los dominios lineales de las pectinas en las distintas fracciones, solo se observó un incremento de AU en los daños por sol blush y leve en PSE, y no se detectaron diferencias en las fracciones PSA y PSH entre los distintos niveles de daño por sol (Figura 1.12.A). Esto sugiere que el daño por sol no afectaría marcadamente el proceso de solubilización de las pectinas en esta variedad. Se han reportado resultados contradictorios para otros frutos con daño por sol o sometidos a tratamientos térmicos postcosecha. En pulpa de pera var. Bartlett hubo incrementos de UA en PSA y reducción en PSE en los tejidos expuestos al sol, sin cambios en PSH (Raffo y col., 2011). Asimismo, en pulpa de manzana var. Fuji, la

exposición a la luz solar incrementó el contenido de AU en las tres fracciones pectínicas (Torres y col., 2020). Resultados similares se observaron en frutillas sometidas a tratamientos térmicos postcosecha, donde se adjudicaron los incrementos en el contenido de AU en las tres fracciones de pectinas en los frutos tratados, a una reducción de la solubilización de polímeros de pared (Langer y col., 2018). Por otro lado, en frutilla var. Pájaro se informó incrementos de pectinas insolubles y descensos en las pectinas más solubles de la pared en los frutos tratados térmicamente a 45 °C (Lara y col., 2006). Las diferencias en los resultados reportados en distintos tejidos y frutos podrían deberse a respuestas diferenciales en la composición y metabolismo entre la piel y la pulpa, y/o al uso de distintas variedades, como ocurre en los estudios de procesos asociados a la maduración. Sin embargo, estos autores destacan que los cambios generados por la exposición al sol y/o tratamientos térmicos provocan un retraso o ralentización del proceso de solubilización de pectinas al modificar la distribución e interacción de estos polímeros en la pared celular.

En los tejidos de piel de pera Anjou, el análisis del contenido de AN en cada una de las fracciones reveló diferencias significativas en el contenido de ramificación de las cadenas de pectinas como resultado del daño por sol (Figura 1.12.B). La fracción correspondiente a las pectinas ligadas covalentemente a la pared celular tuvo menor contenido de AN en los tejidos con daño por sol respecto a los tejidos sanos, mientras que en las otras dos fracciones (PSA y PSE) se observó el efecto inverso. En pulpa de pera var. Bartlett, Raffo y col. (2011) reportaron únicamente cambios en la fracción PSH, con reducción de los AN en frutos expuestos al sol, de modo que ambos estudios son coincidentes en lo que respecta a pectinas ligadas covalentemente. En frutillas tratadas con aire caliente, el contenido de AN se redujo en las fracciones PSA y PSH pero aumentó en PSE respecto a los frutos control (Lara y col., 2006). En hojas de café bajo estrés térmico, se reportaron aumentos de residuos arabinosa y galactosa en la fracción PSA, asociando este cambio con incrementos de  $\alpha$ -arabinogalactanos tipo 2. Estos compuestos se asocian a la supervivencia celular y se ha propuesto que promueven rigidez en la pared celular por reticulación oxidativa (Lima y col., 2013). Asociado a esto, los cambios en la distribución de AN entre las fracciones pectínicas observados en la piel de pera var. Anjou, podría ser resultado de procesos oxidativos y enzimáticos que afectarían la depolimerización de cadenas laterales sobre la solubilización de pectinas (Airianah y col., 2016; Le Gall y col., 2015; Fry, 2010).

La relación AN/AU o grado de ramificación es un indicador de la proporción de cadenas laterales respecto de cadenas lineales (HG) en las pectinas (Basanta, 2013). La piel sana de pera Anjou presentó un bajo grado de ramificación en la fracción de pectinas débilmente unidas a la pared (PSA), lo que indica un marcado predominio de dominios lineales en las pectinas más solubles. El mayor grado de ramificación se observó en la fracción de pectinas iónicamente unidas a la pared (PSE), seguida por las pectinas covalentemente unidas (PSH). Los cambios en el contenido de AN en las

fracciones de pectinas en los tejidos con daño por sol respecto a los tejidos sanos alteró la relación de AN/UA (Figura 1.12.C). El grado de ramificación se incrementó en las fracciones PSA y PSE, y se redujo en PSH en los tejidos con daño por sol. En frutos de prunoideas, Basanta (2013) asoció el incremento del grado de ramificación en las fracciones más solubles de la pared con la pérdida de elasticidad y aumento de rigidez en la pared celular.

De los resultados obtenidos en este trabajo se propone que el daño por sol modificó las interacciones y proporciones de las pectinas de la pared celular. Los cambios en las proporciones de AN y la reducida variación del contenido de AU entre las fracciones pectínicas de los tejidos con daño por sol sugieren que el estrés por elevada radiación solar y temperatura afectó principalmente procesos de depolimerización de cadenas laterales, sobre la ruptura de las cadenas centrales y solubilización de las pectinas.

El contenido de hemicelulosas en la piel de los tejidos dañados se incrementó respecto los tejidos S, mientras que el daño por sol no afectó el contenido de celulosa (Figura 1.11.D-E). Resultados semejantes se reportaron en pulpa de frutos de peras var. Bartlett expuestas al sol (Raffo y col., 2011) y en frutillas bajo tratamiento térmicos (Langer y col., 2018). Lima y col. (2013) reportaron incrementos de hemicelulosas en hojas de café bajo tratamiento con calor. En cambio, Torres y col. (2020) no detectaron diferencias en los contenidos de hemicelulosas ni celulosa entre tejidos con daño por sol y sanos en pulpa de frutos de manzanas. Revisiones actualizadas sobre cambios en la pared celular de distintas especies y órganos vegetales bajo estrés abióticos (calor e irradiación solar) reportan incrementos de hemicelulosas y celulosa (Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015), como respuesta defensiva para la adquisición de tolerancia al factor estresante.

El incremento de lignina en la pared celular es una respuesta común de defensa de las plantas frente a la exposición a estrés lumínico y térmico (Morales-Quintana y col., 2020; Barros y col., 2015; Le Gall y col., 2015). En este trabajo se reportó un incremento significativo del contenido de lignina en la piel de los frutos de pera Anjou con daño por sol (Figura 1.11.F), en coincidencia con descripciones publicadas en piel y pulpa de manzana var. Fuji y Royal Gala con distintos niveles de daño por sol (Torres y col., 2020).

Tenhaken (2015) propone que los actores claves en los cambios en la pared celular debidos a estrés abiótico, son EROS, peroxidasas y enzimas modeladoras de la pared. Estos factores generan entrecruzamientos entre compuestos fenólicos, glicoproteínas y polisacáridos aumentando la reticulación entre los polímeros de la pared, favoreciendo el fortalecimiento de propiedades mecánicas. Por el contrario, un exceso de EROs favorece procesos de ruptura de enlaces, promoviendo la relajación de la pared (Tenhaken, 2015; Wahid y col., 2007). En revisiones sobre el efecto del estrés ambiental sobre los componentes de pared, Le Gall y col. (2015) concluyen que los

efectos generales de estas tensiones dependen de la especie, genotipo, edad, momento fenológico del suceso e intensidad y duración del estrés, demostrando la dificultad de identificar un patrón común en la respuesta de la arquitectura de la pared celular.

En este trabajo se sugiere que el engrosamiento de la pared celular que se observó en las imágenes microscópicas (Figura 1.2 y Tabla 1.4), y que ha sido reportado en distintos trabajos relacionados a síntomas de daño por sol, fue promovido por la remodelación de la pared, como resultado de los cambios en distribución de cadenas laterales entre las fracciones pectínicas e incremento de hemicelulosas y lignina. Por otro lado, el incremento de firmeza de los tejidos con daño por sol reportados en frutos de pepita (Torres y col., 2020; Raffo y col., 2011; Schrader y col., 2009; Racskó y col., 2005) e incluso obtenidos en este trabajo (Tabla 1.2) podría asociarse tanto al incremento de lignina y hemicelulosas como al aumento de rigidez en las pectinas causado por el cambio en el grado de ramificación de las fracciones pectínicas. Chelli-Chaabouni (2014) sugiere que la reducción de la elasticidad de la pared celular debida a cambios en su estructura y composición resultante de la exposición a distintos estreses ambientales es un mecanismo eficiente para adaptarse y tolerar futuras situaciones de estrés.

El daño por sol en frutos es un síntoma causado por dos factores abióticos: alta radiación y temperaturas elevadas, y la intensidad y duración de ambos puede generar distintos niveles de daño hasta provocar la muerte del tejido. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la pared celular sufre cambios en su estructura y composición en los tejidos con daño por sol que incrementaron su espesor y fortalecen sus propiedades mecánicas con el fin de adaptarse y tolerar la condición estresante.

### **1.5. CONCLUSIÓN**

El estrés por elevada radiación y altas temperaturas induce cambios en los tejidos de frutos de pera a nivel anatómico, fisiológico y bioquímico. Estas modificaciones en los componentes de las células son resultado del daño oxidativo desencadenado por las condiciones estresantes, así como de la activación de mecanismos de respuesta de defensa de los tejidos.

La modificación del color de la piel en los frutos de pera Anjou con daño por sol es resultado de la fotooxidación de la clorofila y síntesis de antocianinas y polifenoles. El daño por sol provoca un incremento de la firmeza de pulpa, mayor contenido de sólidos solubles, disminución del almidón y de la acidez.

La elevada radiación solar desencadena alteraciones del metabolismo oxidativo en la piel de frutos de pera Anjou. El incremento de la capacidad antioxidante, el contenido de polifenoles y del sistema antioxidante enzimático señalan una clara activación de vías de defensas involucradas en la tolerancia al daño oxidativo en los

frutos con daño por sol. Sin embargo, la respuesta del sistema de defensa en estos frutos no evita el desbalance oxidativo promovido por la excesiva radiación solar, reflejado en el daño de las membranas celulares.

Las condiciones de elevada radiación solar promueven en la cara expuesta de los frutos cambios anatómicos en las capas celulares de la piel asociadas al desarrollo de síntomas de daño por sol. La reducción del tamaño celular, el engrosamiento de las paredes celulares y los cambios en la estructura de la cutícula en la piel son modificaciones adaptativas.

La incidencia de excesiva radiación solar sobre la piel de los frutos de pera Anjou promueve cambios en la estructura y composición de la pared celular. La modificación de la distribución de las ramificaciones de las pectinas junto al aumento del contenido de hemicelulosas y lignina en la piel de los frutos con daños por sol contribuiría en el refuerzo de las propiedades biomecánicas de la pared celular.

Estos resultados demuestran que los frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol desarrollaron modificaciones que se asocian con una respuesta adaptativa generalizada al estrés por elevada radiación y temperatura.

## **CAPÍTULO 2: Determinación de cambios en la expresión génica de enzimas relacionadas a los componentes de la pared celular en la piel de frutos de pera con diferentes niveles de daño por sol y durante la exposición a elevada radiación solar**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

La pared celular es una compleja y dinámica estructura que participa en los procesos de comunicación, señalización, respuesta y defensa. El estado de la pared está estrecha y estrictamente controlado y coordinado por la progresión del ciclo celular y los factores externos. La célula genera respuestas transcripcionales específicas y dinámicas que afectan y modulan la producción y funcionalidad de un vasto grupo de proteínas asociadas a la generación y modificación de los componentes de la pared celular. Cuando esta respuesta se activa debido a factores estresantes, los cambios que se producen en la arquitectura de la pared celular asumen un rol fundamental en la adquisición de tolerancia y adaptación a estas condiciones (Wu y col., 2018). Estas respuestas son complejas y los efectos generales promovidos por el estrés dependen de la especie, el momento fenológico, el tipo de estrés, así como su intensidad y duración, dificultando la definición de un patrón común de cambios en la arquitectura de la pared celular.

La respuesta específica asociada a la pared celular incrementa no sólo los enlaces e interacciones propias de la misma sino también promueve cambios cruciales en su arquitectura para adaptarse y sobrevivir (Klis y col., 2006). Durante condiciones de estrés ambiental, los polímeros de la pared celular sufren cambios como resultado de la participación de EROS y peroxidasas. Según sus concentraciones pueden promover la formación de enlaces que incrementan la rigidez de la pared, o ruptura de enlaces que debiliten su estructura (Tenhaken, 2015). Luego de la exposición, y si el daño no fue letal, las células inician procesos de recuperación, reparación y modificación de la estructura de la pared para restablecer su integridad y funcionalidad. Asimismo, adquieren tolerancia a condiciones desfavorables mediante el refuerzo de esta estructura (Paull y Jung Chen, 2000).

La respuesta adaptativa en la pared celular resulta, en gran medida de la participación de grupos de proteínas modeladoras de la pared (Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015). Estas proteínas pertenecen a familias multigénicas, lo que permite que sus miembros tengan funciones fisiológicas similares, pero la expresión génica de cada uno es regulada por diferentes factores ambientales y hormonales (Sasidharan y col., 2011). Algunas de las proteínas más relevantes reportadas en la participación de los procesos de respuesta adaptativa frente a condiciones de estrés abiótico en

plantas, son las expansinas (EXPs), las xiloglucano endotransglucosidasas/hidrolasas (XTHs), las endoglucanasas (ENDs) y las pectin metilesterasas (PMEs).

Las EXPs son proteínas sin actividad hidrolítica que participan en la relajación, extensión y aflojamiento de la red fibrilar de la pared al interrumpir las interacciones puente hidrógeno, permitiendo el deslizamiento molecular entre los polisacáridos y las microfibrillas de celulosa (Sampedro y Cosgrove, 2005). Además del efecto de relajación de la estructura, su acción facilita que otras enzimas puedan alcanzar sus sustratos. Contribuye, además, en procesos relacionados con la maduración de frutos, la penetración del tubo polínico, la elongación y abscisión de brotes y raíces. Recientes investigaciones asocian su participación en el fortalecimiento de la pared celular bajo condiciones de estrés abiótico (Le Gall y col., 2015).

Las XTHs están involucradas en procesos de aflojamiento y expansión de la pared celular durante el crecimiento, desarrollo y senescencia celular, como también en el mantenimiento y fortalecimiento de la integridad de la pared durante la respuesta frente a condiciones desfavorables (Wu y col., 2018; Sasidharan y col., 2011). Esta familia agrupa enzimas con dos actividades catalíticas distintas: a) las enzimas xiloglucano endotransglucosidasas (XET), y b) las enzimas xiloglucano endohidrolasas (XIH) (Eklöf y Brumer, 2010). Algunos miembros de esta familia pueden tener ambas actividades enzimáticas, o solo una de ellas. Dentro de sus funciones se pueden mencionar la integración de nuevos xiloglucanos a la pared, el recorte y la unión de residuos de hemicelulosas que permiten reacomodar la red fibrilar, así como la promoción de la escisión hidrolítica facilitando la depolimerización de estos polisacáridos (Cosgrove, 2005).

La familia de las ENDs, antiguamente denominadas celulasas (CEL), se asocian con procesos de aflojamiento de la pared celular, hidrolizando enlaces internos de xiloglucanos y celulosa amorfa, mientras que no pueden actuar sobre las regiones de celulosa cristalina (Cosgrove, 2005). Asimismo, participan en procesos de depolimerización de las hemicelulosas durante la maduración de los frutos.

Las PMEs son enzimas que remueven el grupo metilo que se encuentra esterificando los grupos carboxilo presentes en el ácido galacturónico. Los múltiples genes que conforman esta familia codifican isoformas que presentan patrones diferenciales de desmetilación afectando las propiedades de la pared celular. El grado de desmetilación es clave en el control de la rigidez de la pared y el estado hídrico de la matriz pectínica. Por lo tanto, se ha reportado que la PME puede promover resultados diferentes en la integridad de la pared. Durante la maduración de los frutos o durante eventos estresantes como el estrés térmico, participa en el aflojamiento de la pared celular al provocar la desmetilesterificación aleatoria de las pectinas, aumentando la concentración de protones y favoreciendo la acción de PG. Sin embargo, durante periodos de recuperación post estrés por calor, así como en distintas etapas del desarrollo celular, PME promueve la desmetilesterificación lineal en residuos de

pectina altamente esterificados. Esto genera bloques de grupos carboxilos libres que interactúan con  $\text{Ca}^{2+}$ , formando las denominadas regiones “caja de huevo” (regiones enriquecidas en pectatos de calcio). Estos cambios favorecen el fortalecimiento de la matriz y en consecuencia mejoran las propiedades biomecánicas de la pared celular (Wu y col., 2018).

Le Gall y col. (2015) revelaron que la expresión de genes y enzimas asociados a la modificación de la pared celular bajo situaciones estresantes varía dependiendo del tipo y duración del estrés, especie y órgano vegetal, estado fenológico, etc., dificultando la identificación de un patrón de respuesta común en las plantas. Sin embargo, en la mayoría de los casos reportados, se destacan dos mecanismos principales: 1- aumento en la expresión de XTH y EXP y en el grado de ramificación de las pectinas; 2- engrosamiento de la pared por refuerzo de la deposición de hemicelulosas y lignina.

En relación con la lignina, los estudios demuestran que diversos estrés abióticos y bióticos afectan la composición y distribución de este polímero asociado a una respuesta de la defensa celular (Barros y col., 2015; Lagunes y Zavaleta, 2015; Le Gall y col., 2015; Brardwaj y col., 2014; Neutelings, 2011; Whetten y Sederoff, 2007). Durante el estrés, se activan vías de transducción de enzimas relacionadas a la biosíntesis de lignina, teniendo un efecto directo en la incorporación e incremento de este compuesto en la pared celular (Brardwaj y col., 2014). La lignina no es un componente habitual de la pared primaria en los frutos, sin embargo, bajo condiciones adversas es incorporada a los componentes de la pared modificando sus propiedades biofísicas al reforzar su resistencia y rigidez (Lagunes y Zavaleta, 2015).

El daño por sol foto-oxidativo y necrótico se genera en frutos bajo situaciones particulares relacionadas con el estado del fruto y las condiciones y duración de la exposición a la radiación solar, que conducen al daño letal de los tejidos debido a la incapacidad de la célula de contrarrestar el daño oxidativo. Por otro lado, el daño por sol bronceado es resultado de la exposición a elevada radiación solar e incrementos de la temperatura superficial del tejido tanto en términos de fluctuaciones diarias como de exposiciones a largo plazo durante el crecimiento y desarrollo del fruto. Estas condiciones (períodos estresantes y períodos de recuperación) inducen procesos de aclimatación y adaptación en los tejidos afectados logrando la supervivencia celular. Esto sugiere que los tejidos con este tipo de daño por sol, han sufrido cambios en distintos niveles metabólicos adquiriendo mayor tolerancia y resistencia a condiciones estresantes. Incluso, Woolf y Ferguson (2000) y Woolf y col. (1999) señalaron que si bien el daño por sol afecta distintos parámetros de calidad interna de los frutos, promueve cambios similares a tratamientos térmicos en frutos, adquiriendo tolerancia a otros factores abióticos como calor o frío durante la postcosecha.

Es importante señalar que hay escasa información respecto a la modificación de la pared celular y las enzimas que participan durante procesos de estrés por alta

radiación y/o alta temperatura. Sin embargo, existen estudios sobre los efectos de tratamientos térmico o de radiación UV postcosecha en frutos con relación a cambios en la pared celular. Estos tratamientos ralentizan los procesos de maduración al promover modificaciones en los componentes de la pared celular así como en la expresión génica y las actividades de las enzimas PG, PME, GAL, ARF, XTH, END, EXP (Santin y col., 2019; Langer y col., 2018; Bu y col., 2013; Pombo y col., 2009; Yang y col., 2006; Shalom y col., 1993). Los cambios en la expresión de los genes observados en los tejidos bajo estos tipos de tratamientos presentan similitud con las repuestas transcripcionales reportadas en genes de pared celular en plantas bajo diferentes condiciones estresantes (Wu y col., 2018; Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015).

Particularmente, en los frutos de pera, la modificación de la pared celular se ha estudiado durante el proceso de maduración. Es escasa la información de la respuesta de las enzimas modeladoras de la pared frente a factores externos, incluso en relación con tratamientos postcosecha. Sin embargo, se ha determinado que el efecto de la luz solar modifica la composición de la pared celular de la pulpa de frutos de pera, asociado con cambios en el tamaño y distribución de sus polisacáridos (Raffo y col., 2011). En manzana con daño por sol, se reportaron cambios en los componentes de la pared celular en la piel y la pulpa, destacando el incremento del contenido de lignina junto al aumento en la expresión de genes relacionados a su biosíntesis (Torres y col., 2020).

En el capítulo anterior se mencionó que la piel de los frutos con daño por sol bronceado presenta modificaciones en los componentes de la pared celular. Estos cambios incluyen un incremento del espesor de la pared celular por aumento del contenido de hemicelulosas y lignina, junto a cambios en la distribución de las ramificaciones en las pectinas en los tejidos con daño por sol, modificaciones similares a las reportadas como respuesta general frente a distintos estreses abióticos (Le Gall y col., 2015). En este capítulo, se propone analizar la expresión de los genes de enzimas asociadas a los componentes de la pared celular, tanto durante un evento por estrés por elevada radiación solar y altas temperaturas, como en los frutos afectados por el daño, a fines de relacionarlos con los resultados discutidos en el capítulo anterior.

### **2.1.1. Hipótesis**

El estrés por elevada radiación solar y temperatura induce cambios moleculares en el metabolismo de la pared celular de piel de peras que promueve la modificación de su composición y estructura.

### 2.2.2. Objetivo específico

Identificar cambios moleculares y metabólicos asociados a las modificaciones de la pared celular de piel de peras con daño por sol desarrollado bajo situaciones naturales a campo y en condiciones controladas artificialmente.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar los eventos moleculares asociados a distintas enzimas relacionadas a la modificación de los componentes de la pared celular observados en la piel de frutos con daño por sol, se plantearon dos ensayos experimentales. Por un lado, se procedió a evaluar la expresión de genes de enzimas asociadas a los componentes de pared celular en la piel de los frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol al momento de la cosecha. Por otro lado, frutos que no recibieron radiación solar directa durante su desarrollo fueron expuestos a luz solar directa para evaluar la expresión de los mismos genes durante un evento de estrés lumínico y térmico agudo.

El capítulo se dividió en dos partes:

- A- Expresión de genes en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol en cosecha.
- B- Expresión de genes en piel de frutos de pera Anjou durante la exposición directa a luz solar en campo.

### 2.2.1. Material vegetal

Ensayo A:

Se utilizaron frutos recolectados durante la cosecha de la temporada 2018/2019, con los niveles de daño por sol descritos en la sección 1.2 de Materiales y Métodos. Se trabajó con muestras compuestas por piel de 5 frutos. Las muestras fueron acondicionadas y almacenadas como se describió en la sección 8.3 para el análisis de la expresión de genes de Materiales y Métodos. Las muestras provenientes de tejido sano fueron consideradas como muestras control.

Ensayo B:

Se trabajó con frutos recolectados durante la temporada 2019/2020 en el mes de febrero, sometidos a los tratamientos de exposición aguda a luz solar directa en campo durante dos horas, descritos en la sección 1.3.1.2 de Materiales y Métodos. Las muestras de tejidos fueron constituidas por piel de 5 frutos extraída de la región expuesta a la luz solar. Las muestras fueron rápidamente acondicionadas y almacenadas para su posterior análisis según descripción en sección 8.3. Las muestras utilizadas como control fueron las correspondientes al tiempo de exposición cero.

### 2.2.2. Medida de variables

En ambas etapas, la determinación de la expresión de genes se realizó según lo descrito en la sección 8 de Materiales y Métodos.

Sobre los tejidos obtenidos luego de la exposición a luz solar en el Ensayo B, se realizaron las determinaciones: pérdida de electrolitos, contenido relativo de agua y peroxidación de lípidos. Estas determinaciones se encuentran descritas en las secciones 5.1, 5.2 y 5.4 respectivamente de Materiales y Métodos.

### 2.2.3. Análisis estadístico

En el Ensayo A se trabajó con un  $n = 4$ , mientras que para el Ensayo B el  $n$  fue de 3, cantidad de muestras de las cuales se obtuvo material apto para las determinaciones. En ambos casos cada muestra presentaba tejido de 5 frutos distintos. Para las determinaciones pérdida de electrolitos, contenido relativo de agua y peroxidación de lípidos, se usó un total de muestras igual a 5. Estos resultados fueron comparados estadísticamente con los datos de las tres variables de los tejidos sanos (S) y con daño por sol *blush* (B), leve (L) y moderado (M).

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Análisis de cebadores

Todos los cebadores fueron testeados en PCR a punto final (PCR-PF) y en PCR Real Time (PCR-RT). En la Tabla 2.4, se exponen los resultados obtenidos. Los *primers* PcPG1, PcPME1, PcPME4, PcGAL3 y PcEND9 no amplificaron en las muestras de control utilizadas, por lo tanto, no fueron utilizados. El cebador PcXIL si bien amplificó un producto en el ensayo de PCR-PF, en las PCR-RT amplificaba un producto del tamaño esperado a valores de CT muy altos ( $>30$ ), no obteniendo resultados relevantes. Esto sugiere que la expresión del gen correspondiente es muy baja en los tejidos ensayados. Reportes previos en pera, señalaron que la expresión de genes de xilosidasa es baja durante el desarrollo del fruto, mientras presenta incrementos notables durante la etapa de maduración y sobremaduración (Itai y col., 1999; Nashima y col., 2013). Los cebadores aptos para utilizar en las muestras de tejidos de piel de pera fueron PcACT, PcCAD1, PcPAL, PcPG2, PcPME2, PcGal2, PcGAL4, PcARF1, PcEND1, PcCEL2, PcEXP1 y PcXET.

**Tabla 2.4. Testeo de cebadores seleccionados para el análisis de la expresión de genes en piel de frutos de pera Beurre D'Anjou.**

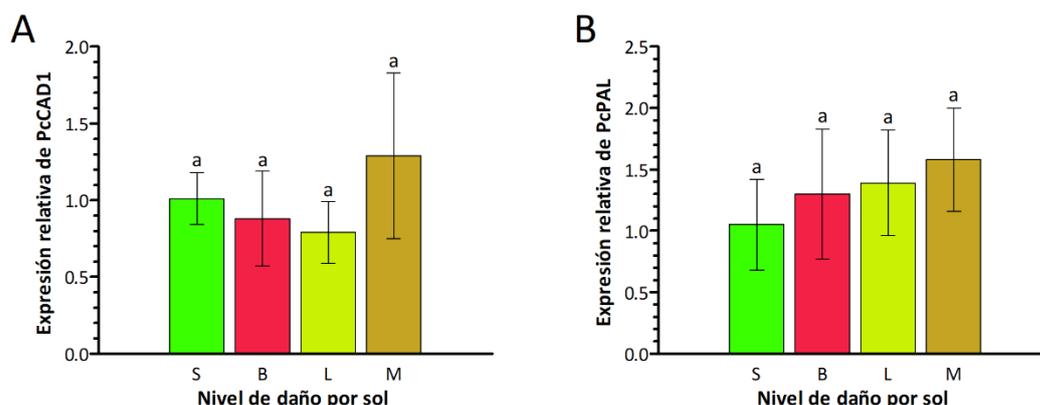
Nombre	PCR-PC	PCR-RT
PcACT	Positivo	Positivo
PcCAD1	Positivo	Positivo
PcPAL	Positivo	Positivo
PcPG1	Negativo	Negativo
PcPG2	Positivo	Positivo
PcPME1	Negativo	Negativo
PcPME2	Positivo	Positivo
PcPME4	Positivo	Negativo
PcGAL2	Positivo	Positivo
PcGAL3	Negativo	Negativo
PcGAL4	Positivo	Positivo
PCARF1	Negativo	Positivo
PcEND1	Positivo	Positivo
PcEND9	Negativo	Negativo
PcCEL2	Positivo	Positivo
PcEXP1	Positivo	Positivo
PcXET	Positivo	Positivo
PcXIL	Positivo	Positivo

ATC: actina; CAD: cinamil-alcohol deshidrogenasa; PAL: fenilalanina amonioliasa; PG: poligalacturonasa; PME: Pectin metilesterasa; Gal:  $\beta$ -galactosidasa; ARF:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa; END: endoglucanasa; CEL: celulasa; EPX: expansina; XET: xiloglucano endotransglicosidasa; XIL: xilanasa.

### 2.3.2 Ensayo A: Expresión de genes en frutos con distintos niveles de daño por sol

#### 2.3.2.1. Expresión de genes asociados a la biosíntesis de lignina

Se determinó la expresión génica de las enzimas cinamil-alcohol deshidrogenasa (PcCAD1) y fenilalanina amonioliasa (PcPAL), ambas relacionadas a la vía de biosíntesis de lignina. Si bien se observó una tendencia a una mayor expresión de ambos genes, la expresión relativa de los genes PcCAD1 y PcPAL (Figura 2.4.A-B, respectivamente) no presentó diferencias significativas entre los niveles de daño por sol estudiados ( $p = 0,3489$  y  $0,4404$ , respectivamente).

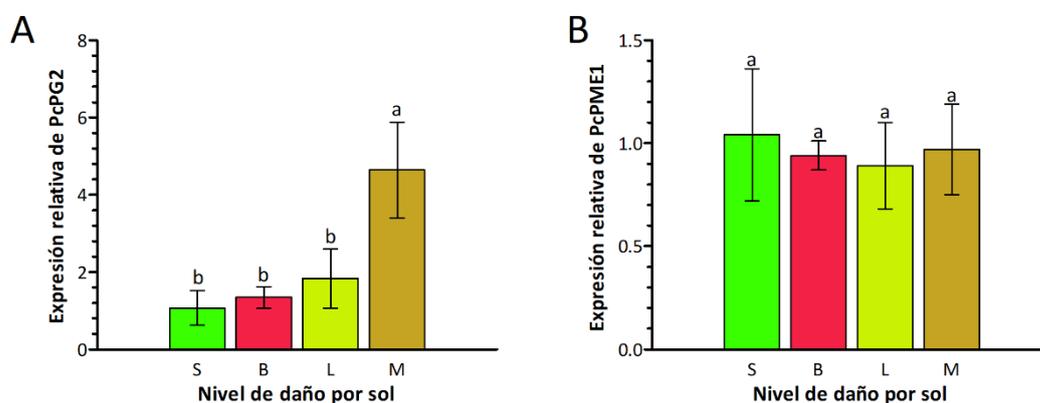


**Figura 2.4. Expresión relativa de los genes PcCAD1 (A) y PcPAL (B) en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.** Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B), leve (L) y moderado (M). CAD: cinamil-alcohol deshidrogenasa; PAL: fenilalanina amonioliasa. Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 4). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.2.2. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de pectinas

La expresión del gen PcPG2 se incrementó en la piel de los frutos con daño por sol (Figura 2.5.A), siendo significativo en M respecto a S. Este aumento en los tejidos con daño moderado representó un 334 % respecto de los tejidos sanos.

En cuanto a la expresión de PcPME1 no hubo cambios en relación con el daño por sol en los tejidos ( $p = 0,8710$ ). En la Figura 2.5.B se presentan los resultados de expresión de PME1.

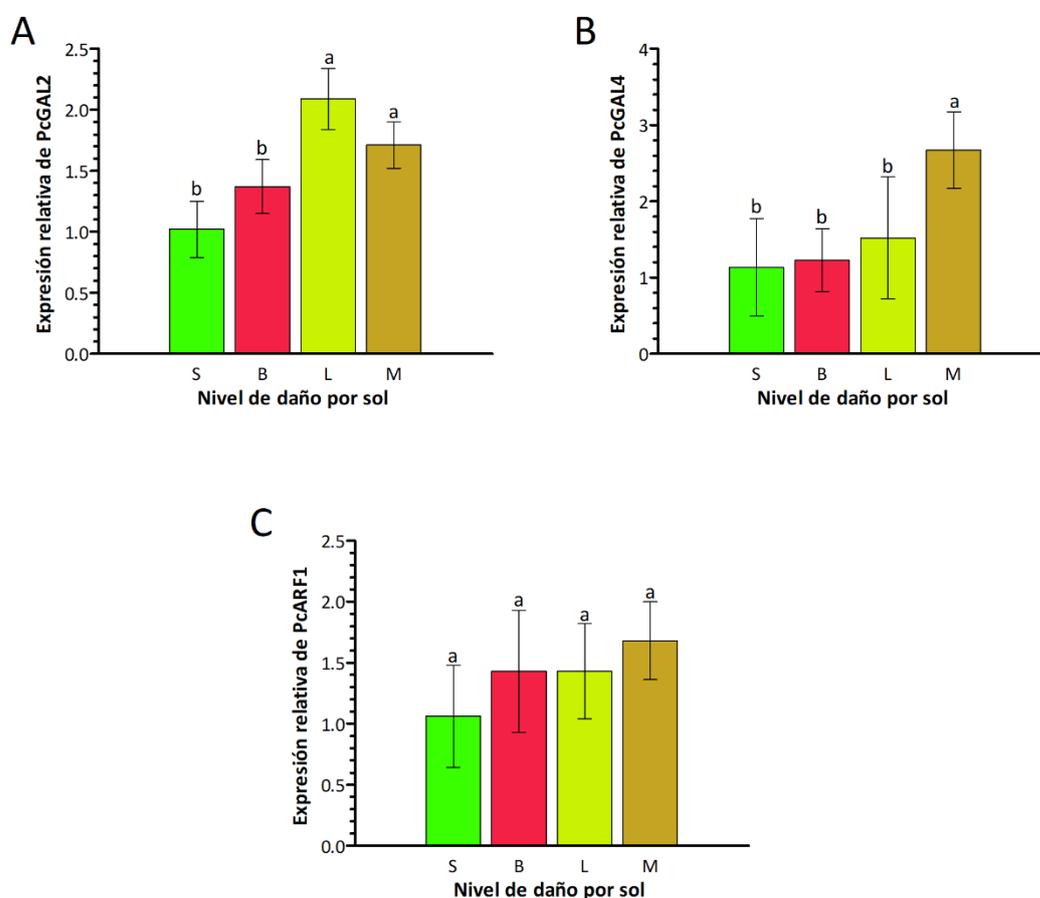


**Figura 2.5. Expresión relativa del gen PcPG2 (A) y PcPME1 (B) en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.** Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B), leve (L) y moderado (M). PG: poligalacturonasa; PME: pectin metilesterasa. Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 4). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.2.3. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de cadenas laterales

Las enzimas  $\beta$ -galactosidasa (GAL) y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (ARF) actúan sobre distintos residuos terminales no reductores de las cadenas laterales de pectinas. La expresión de los genes PcGAL2 y PcGAL4 se vio afectada según el nivel de daño que presentaron los tejidos, observándose mayor expresión con relación a la severidad del daño por sol. La expresión de PcGAL2 fue significativa en los tejidos con daños L y M con un aumento de 105 % y 68 % respectivamente en comparación con los tejidos sanos (Figura 2.6.A). En PcGAL4 se observó un incremento significativo solo en los tejidos con daño M con un aumento de 136 % respecto de los tejidos S (Figura 2.6.B).

En la Figura 2.6.C, se observa la expresión de PcARF en los tejidos con distintos niveles de daño por sol. La expresión de este gen mostró un incremento en todos los tejidos con daño por sol respecto de los tejidos S, pero las diferencias no fueron significativas ( $p = 0,2650$ ).

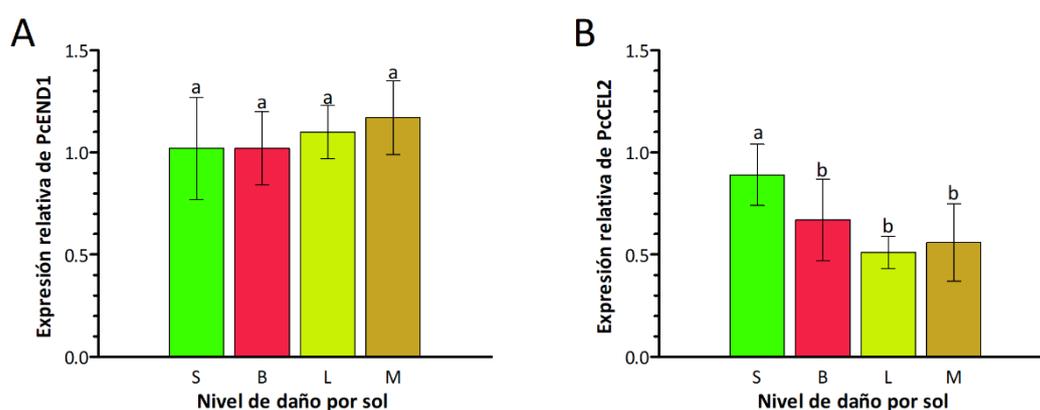


**Figura 2.6.** Expresión relativa de los genes PcGAL2 (A), PcGAL4 (B) y PcARF (C) en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B), leve (L) y moderado (M). GAL:  $\beta$ -D-galactosidasa; ARF:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 4$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.2.4. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de hemicelulosas

Las endoglucanasas son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los xiloglucanos y celulosa no cristalina. En este estudio se analizó la expresión de PcEND1 (también denominada CEL1a+1b) y PcCEL2 (Figura 2.7.A y B respectivamente).

La expresión de PcEND1 fue similar en los tejidos sanos y con síntomas de daño por sol ( $p = 0,7386$ ). Sin embargo, la expresión de PcCEL2 fue significativamente menor en los tejidos dañados por el sol, con descensos de 25 % en B, 43 % en L y de 37 % en M respecto de S. No hubo diferencias en la expresión de este gen en relación con la severidad del daño por sol.

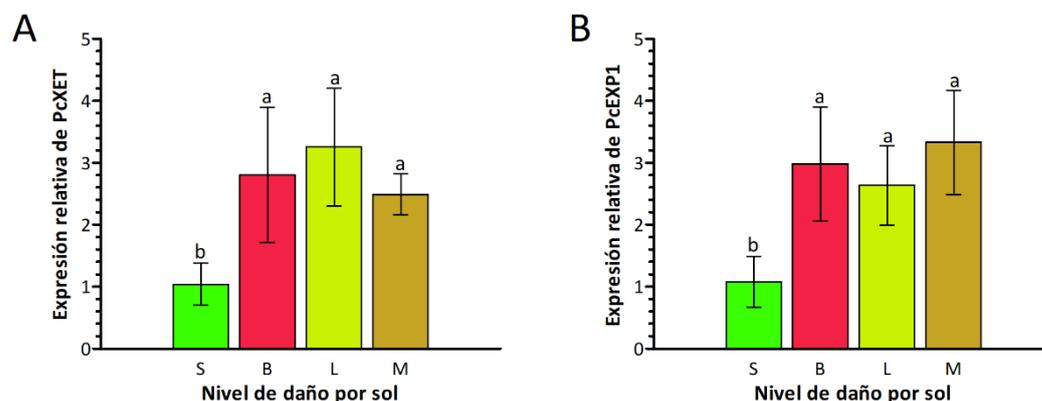


**Figura 2.7. Expresión relativa de los genes PcEND1 (A) y PcCEL2 (B) en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha.** Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B), leve (L) y moderado (M). END: Endo-1,4-β-D-glucanasa; CEL: Celulosa. Los valores son la media ± D.E. ( $n = 4$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.2.5. Expresión de genes asociados con modificación de la pared celular

La expresión de PcXET aumentó significativamente ( $p = 0,0080$ ) en los tejidos con daño por sol. Estos aumentos fueron de un 169 % en B, 212 % en L y un 139 % en M respecto a los tejidos sin daño por sol (Figura 2.8.A). No se observaron diferencias en la expresión respecto a la severidad del nivel de daño.

Las expansinas (EXP) son proteínas sin actividad hidrolítica conocida que participan en la relajación de la pared celular durante el crecimiento, desarrollo y maduración de los frutos. La expresión de PcEXP1 fue significativamente mayor ( $p = 0,0068$ ) en los tejidos con daño por sol. Los incrementos fueron de 176 % en B, 143 % en L y 208 % en M respecto a S, sin diferencias de expresión entre los niveles de daño por sol (Figura 2.8.B).



**Figura 2.8.** Expresión relativa de los genes PcXET (A) y PcEXP1 (B) en tejidos con distintos niveles de daño por sol en piel de frutos de pera Anjou al momento de cosecha. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B), leve (L) y moderado (M). XET: Xiloglucano endotransglucosidasa; EXP1: Expansina 1. Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 4). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.3. Ensayo B: Expresión de genes durante la exposición a elevada radiación solar

#### 2.3.3.1. Determinación de las condiciones óptimas para promover el estrés por elevada radiación solar en frutos de pera

En la Figura 2.9 se presentan los resultados promedios de las temperaturas superficiales de frutos (TSF) de pera Anjou durante las pruebas de exposición a la radiación solar directa.

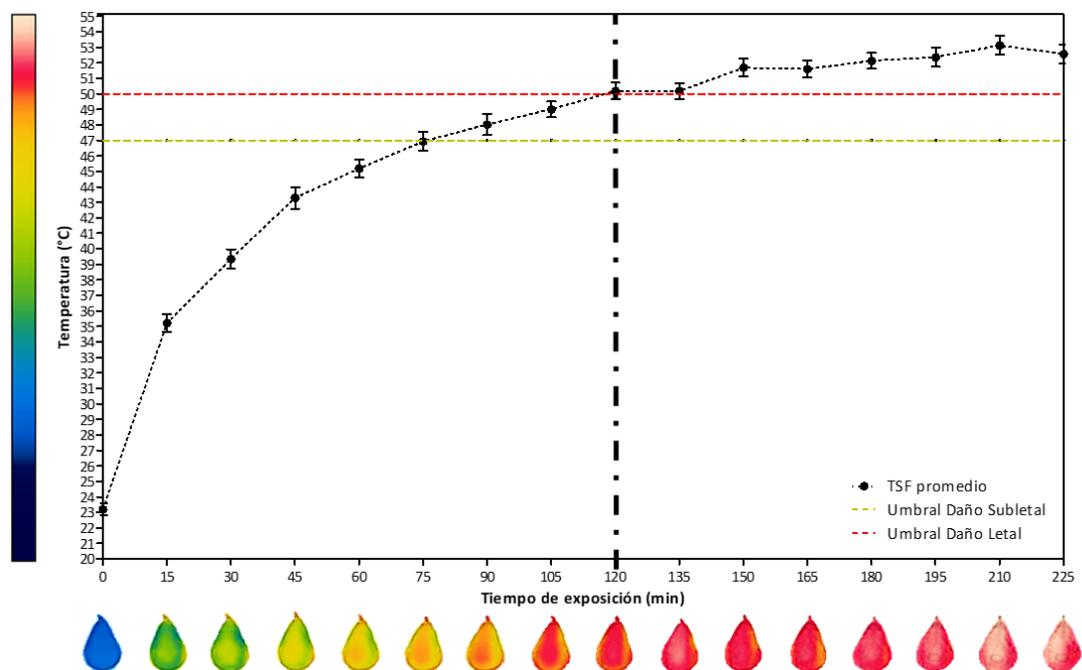
La TSF media, luego de 45 min de exposición superaba los 40 °C. A los 60 min de exposición, los frutos presentaban una temperatura superficial promedio de 45 °C. Este valor ha sido descrito como umbral térmico para el desarrollo de síntomas de daño por sol bronceado en frutos de manzana y pera asociado con la exposición directa a la luz solar (McClymont y col., 2016; Schrader y col., 2003).

Luego de 2 h de exposición, la TSF superó los 50 °C, temperatura considerada umbral de daño letal en frutos de pepita (Schrader y col., 2003). Valores por encima de los 50 °C durante 10 min promueven el desarrollo de daño necrótico en los tejidos.

En general, los frutos que no alcanzaron temperaturas mayores a los 50 °C, no presentaron síntomas severos de daño por sol visibles luego de 24 h post-exposición. Se observó decoloración del tono verde característico de esta variedad sobre el área expuesta. Los frutos que alcanzaron temperaturas superiores a los 50 °C, presentaron luego de 24 h post-exposición, pérdida de coloración verde en el área afectada asociada a un pardeamiento de la piel, lo cual indica que estos tejidos sufrieron daño foto-oxidativo y térmico severo, conducente a la necrosis del tejido.

A partir de estos resultados se determinó que el tiempo de exposición de los frutos para el ensayo B sería de dos horas consecutivas, en días despejados con

pronóstico de temperaturas máximas superiores a 30 °C y elevada radiación solar (>1500 W m<sup>-2</sup>) durante el mediodía (entre las 11 a 14 horas).



**Figura 2.9. Incremento de la temperatura en la piel de frutos de pera Anjou de la cara del lado expuesto al sol.** Línea punteada roja indica la temperatura en la cual el fruto comienza a sufrir daño letal en los tejidos expuestos (daño por sol necrótico). Línea punteada amarilla indica la temperatura en la cual el fruto comienza a sufrir daño por sol leve en los tejidos expuesto. Las pruebas se realizaron durante los primeros días del mes de febrero entre las 11:00 h a 16:00 h, con nubosidad nula a baja. La temperatura se midió con una cámara infrarroja FLIR C2.

### 2.3.3.2. Expresión de genes durante la exposición a elevada radiación solar

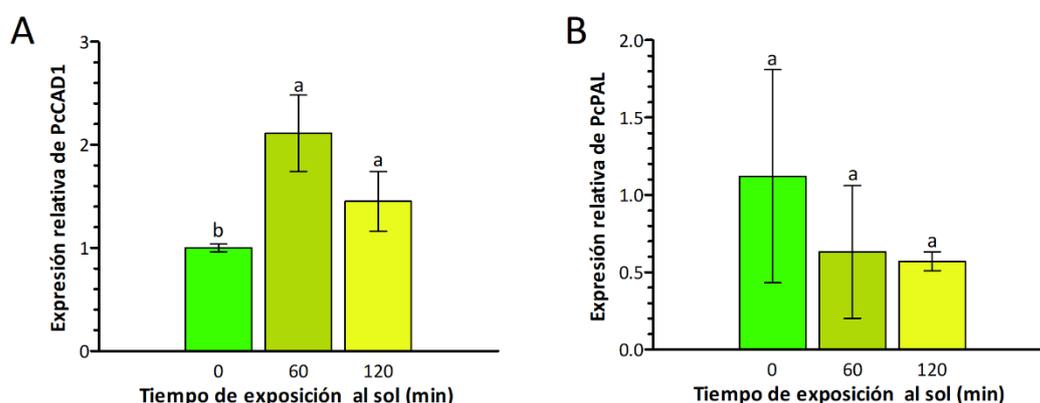
Durante el procesamiento de las muestras para la obtención de cDNA, de los siete experimentos solo se obtuvo ARN de calidad en tres de ellos. Esto derivó en un  $n = 3$ , para el análisis de datos de expresión de genes.

#### 2.3.3.2.1. Expresión de genes asociados a la biosíntesis de lignina

La expresión de PcCAD1 aumentó significativamente durante la exposición de los tejidos a la radiación solar directa (Figura 2.10.A). A los 60 minutos de exposición, alcanzo el máximo de expresión, aumentando en más de 100 % respecto del tiempo cero de exposición.

En la Figura 2.10.B, se observa la expresión de PcPAL durante la exposición a la luz solar directa. A diferencia de PcCAD1, se observó un descenso de la expresión de

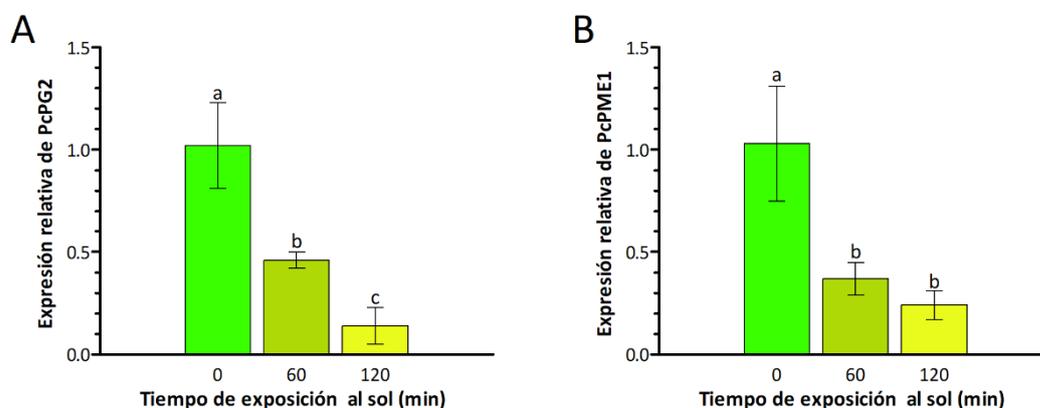
PcPAL con el incremento del tiempo de exposición respecto al tiempo cero, sin bien estas diferencias no fueron significativas ( $p = 0,3528$ ).



**Figura 2.10. Expresión relativa de los genes PcCAD1 (A) y PcPAL (B) en tejidos de piel de frutos de pera Anjou durante 120 min de exposición a luz solar directa.** Los experimentos se realizaron entre las 11:00 h a 14:00 h durante el mes de febrero, en días despejados de elevada radiación solar ( $> 1500 \text{ W m}^{-2}$ ), altas temperaturas ( $> 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), baja humedad relativa ( $< 40 \%$ ) y vientos bajos ( $< 10 \text{ km/h}$ ). Los frutos se encontraban separados de la planta. CAD: Cinamil-alcohol deshidrogenasa; PAL: Fenilalanina amonioliasa. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.3.2.2. Expresión de genes asociados con la degradación de pectinas

La expresión de los genes PcPG2 y PcPME1 se redujo significativamente con el incremento del tiempo de exposición a la luz solar directa ( $p = 0,0006$  y  $0,003$ , respectivamente).



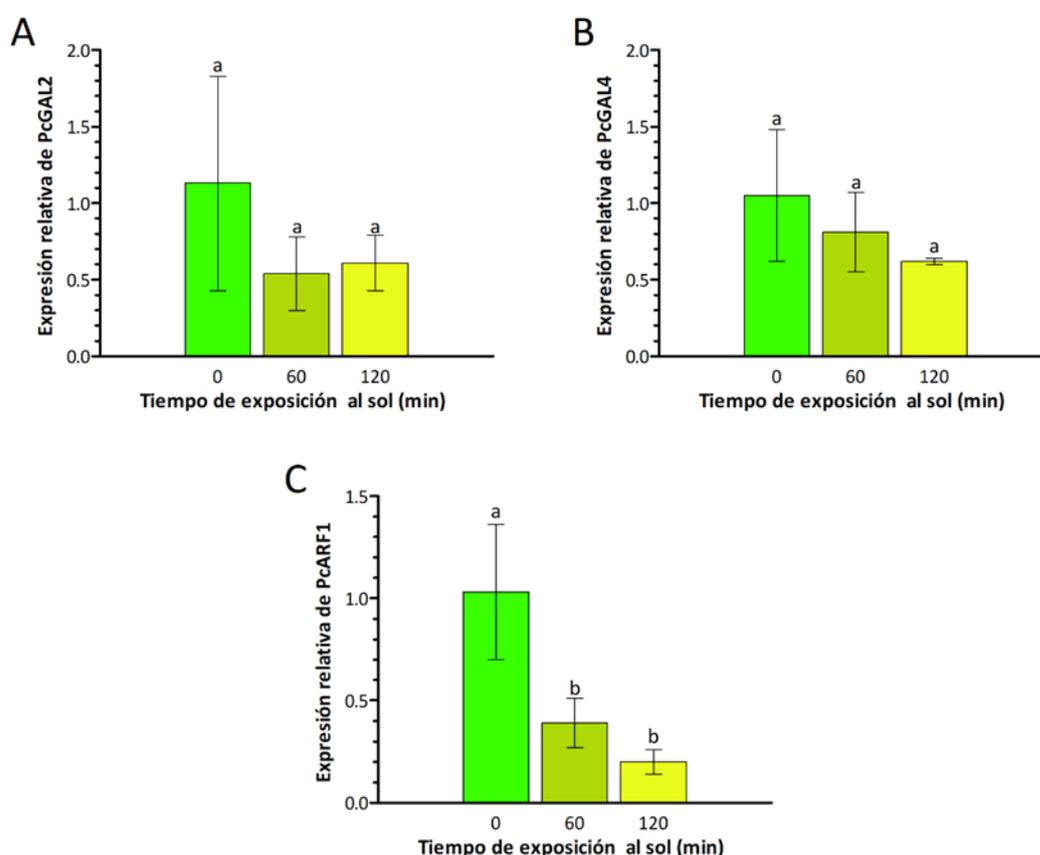
**Figura 2.11. Expresión relativa de los genes PcPG2 (A) y PcPME1 (B) en tejidos de piel de frutos de pera Anjou durante 120 min de exposición a luz solar directa.** Los experimentos se realizaron entre las 11:00 h a 14:00 h durante el mes de febrero, en días despejados de elevada radiación solar ( $> 1500 \text{ W m}^{-2}$ ), altas temperaturas ( $> 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), baja humedad relativa ( $< 40 \%$ ) y vientos bajos ( $< 10 \text{ km/h}$ ). Los frutos se encontraban separados de la planta. PG: Poligalacturonasa; PME: Pectin metilesterasa. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

La caída de la expresión de PcPG2 se incrementó estadísticamente con el tiempo de exposición (Figura 2.11.A). Los descensos fueron de 55 % a 60 min y 86 % a 120 min respecto del tiempo cero de exposición

La expresión de PcPME1 se redujo significativamente en un 64 % luego de 60 min de exposición (Figura 2.11.B). A los 120 min de exposición, su expresión se mantuvo estadísticamente similar que a los 60 min, descendiendo un 77 % respecto al tiempo cero de exposición.

### 2.3.3.2.3. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de cadenas laterales

En las Figuras 2.12.A-B, la expresión de PcGAL2 y PcGAL4 mostró un descenso durante la exposición a la luz solar directa, sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores medios entre los distintos tiempos de exposición ( $p = 0,2811$  y  $0,2662$ , respectivamente).

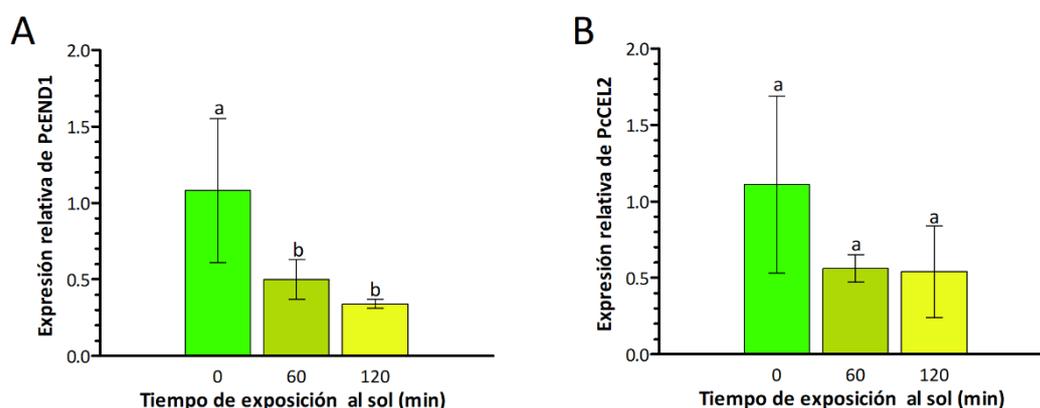


**Figura 2.12.** Expresión relativa de los genes PcGAL2 (A), PcGAL4 (B) y PcARF (C) en tejidos de piel de frutos de pera Anjou durante 120 min de exposición a luz solar directa. Los experimentos se realizaron entre las 11:00 h a 14:00 h durante el mes de febrero, en días despejados de elevada radiación solar ( $> 1500 \text{ W m}^{-2}$ ), altas temperaturas ( $> 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), baja humedad relativa ( $< 40 \%$ ) y vientos bajos ( $< 10 \text{ km/h}$ ). Los frutos se encontraban separados de la planta. GAL:  $\beta$ -D-galactosidasas; ARF:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

Por otro lado, hubo un marcado descenso de la expresión de PcARF1 durante la exposición a la radiación solar (Figura 2.12.C). La reducción de expresión en los tiempos 60 y 120 min de exposición fue de 62 % y 81 % respectivamente, no diferenciándose estadísticamente entre sí.

#### 2.3.3.2.4. Expresión de genes asociados con la hidrólisis de hemicelulosas

La expresión de PcEND1 se redujo significativamente frente a la exposición de luz directa, con descenso de 54 % a 60 min y 69 % a 120 min (Figura 2.13A). La reducción de la expresión de PcCEL2 fue cercana a 50 % para ambos tiempos de exposición, pero no presentó diferencias significativas ( $p = 0,1907$ ) respecto al tiempo cero de exposición (Figura 2.13.B).

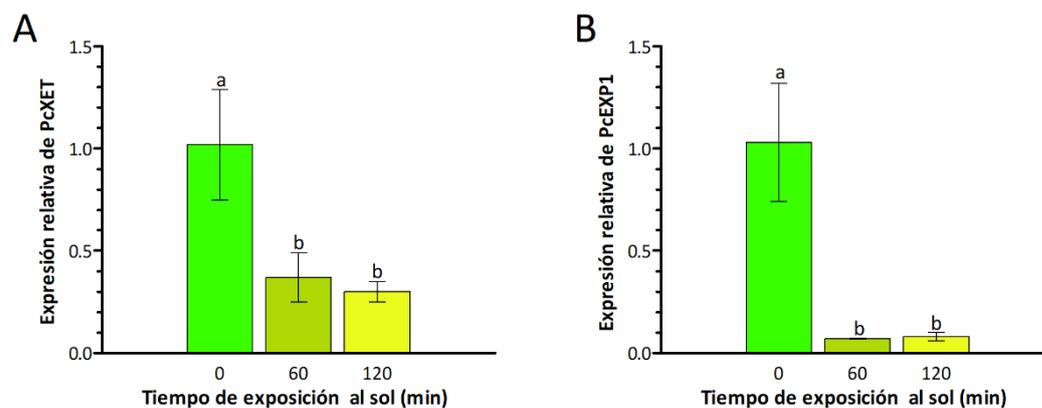


**Figura 2.13. Expresión relativa de los genes PcEND1 (A) y PcCEL2 (B) en tejidos de piel de frutos de pera Anjou durante 120 min de exposición a luz solar directa.** Los experimentos se realizaron entre las 11:00 h a 14:00 h durante el mes de febrero, en días despejados de elevada radiación solar ( $> 1500 \text{ W m}^{-2}$ ), altas temperaturas ( $>30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), baja humedad relativa ( $< 40 \%$ ) y vientos bajos ( $< 10 \text{ km/h}$ ). Los frutos se encontraban separados de la planta. END: Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa; CEL: Celulasa. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

#### 2.3.3.2.5. Expresión de genes asociados con modificación la pared celular

La expresión de PcXET y PcEXP1 se vio marcadamente afectada con la exposición a la luz solar incidente. La expresión de PcXET se redujo significativamente en un 64 % a los 60 min y en un 71 % a los 120 min de exposición respecto de los tejidos en el tiempo cero (Figura 2.14.A).

La expresión de PcEXP1 (Figura 2.13.B) se vio fuertemente afectada por la exposición a la radiación solar, presentado una reducción significativa ( $p = 0,0006$ ) respecto del tiempo cero. El descenso de la expresión de la expansina superó el 90 % a los 60 min de exposición.



**Figura 2.14. Expresión relativa de los genes PcXET (A) y PcEXP (B) en tejidos de piel de frutos de pera Anjou durante 120 min de exposición a luz solar directa.** Los experimentos se realizaron entre las 11:00 h a 14:00 h durante el mes de febrero, en días despejados de elevada radiación solar ( $> 1500 \text{ W m}^{-2}$ ), altas temperaturas ( $> 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), baja humedad relativa ( $< 40 \%$ ) y vientos bajos ( $< 10 \text{ km/h}$ ). Los frutos se encontraban separados de la planta. XET: Xiloglucano endotransglucosidasa; EXP: Expansina. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

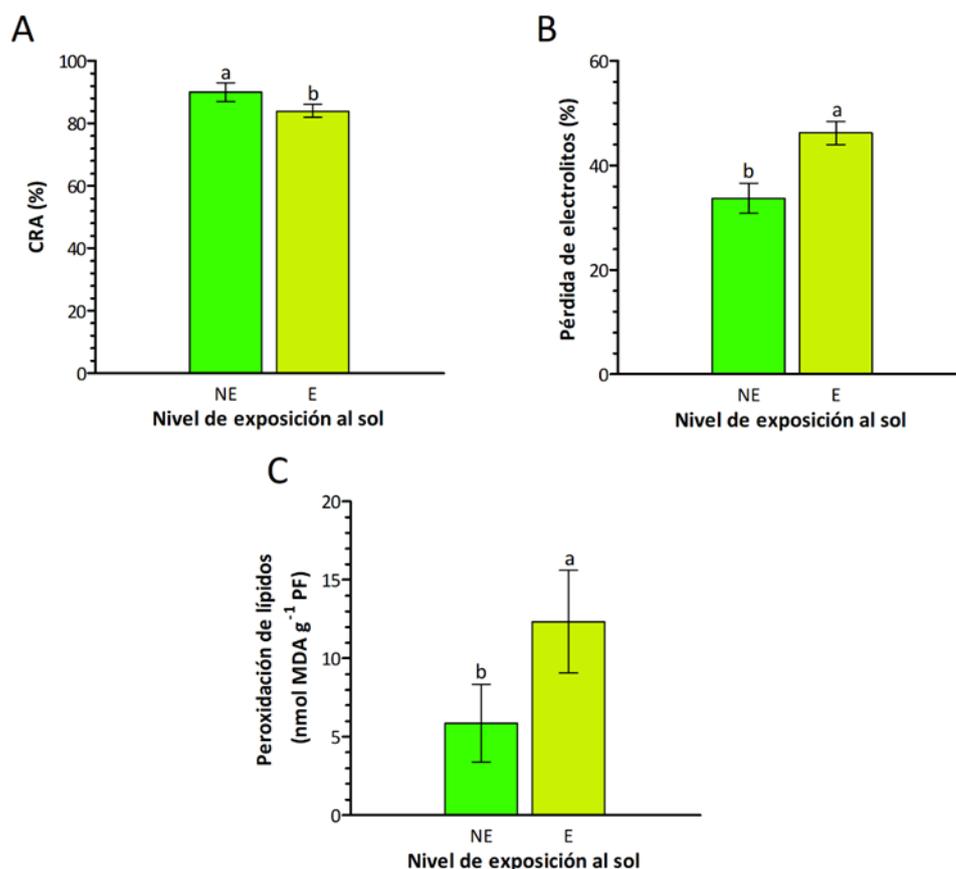
### 2.3.3.2.6. Estado de los tejidos de piel de pera post-exposición a la luz solar directa en campo

El daño por sol es una fisiopatía que se caracteriza por presentar daño oxidativo en los tejidos afectados. Para evaluar si la exposición a la luz solar directa de los frutos empleados en los experimentos era semejante al daño que produce la elevada radiación solar y las altas temperaturas durante el desarrollo de los frutos en las plantas, se determinaron los parámetros contenido relativo de agua, pérdida de electrolitos y peroxidación de lípidos sobre los tejidos de la cara expuesta (E) y no expuesta (NE).

Los tejidos E mostraron una reducción significativa del contenido de agua equivalente al 7 % del peso en respecto a los tejidos NE (Figura 2.15.A).

Las variables pérdida de electrolitos y peroxidación de lípidos fueron afectadas por la exposición a la luz directa ( $p = 0,0002$  y  $p = 0,0379$ , respectivamente). Los tejidos E presentaron un incremento en la pérdida de electrolitos del 35 % respecto a los tejidos NE (Figura 2.15.B).

En la Figura 2.15.C se observa el contenido de MDA en los tejidos expuesto y no expuesto. La exposición de los frutos a la luz solar directa provocó un marcado incremento del daño oxidativo en los tejidos E, aumentando en más del doble respecto a los tejidos NE ( $5,86 \text{ nmol MDA g}^{-1} \text{ PF}$ ).



**Figura 2.15.** Estado de los tejidos de piel de frutos de pera Anjou luego de la exposición a luz solar directa. (A) Contenido Relativo de Agua (CRA); (B) Pérdida de electrolitos; (C) Peroxidación de lípidos de membrana. Los experimentos se realizaron entre las 11:00 h a 14:00 h durante el mes de febrero, en días despejados de elevada radiación solar ( $> 1500 \text{ W m}^{-2}$ ), altas temperaturas ( $> 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), baja humedad relativa ( $< 40 \%$ ) y vientos bajos ( $< 10 \text{ km/h}$ ). El estado de los tejidos se analizó 24 h después de la exposición, conservados a  $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en laboratorio. (NE) lado no expuesto a la luz solar directa; (E) lado expuesto a la luz solar directa. Los valores de CRA y CE se expresaron como porcentaje (%), los valores de peroxidación de lípidos se expresaron como nmoles de malondialdehído por g PF de piel por reacción con el ácido tiobarbitúrico. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

En la Tabla 2.4 se comparan estos resultados con los obtenidos en el Capítulo 1 en los tejidos con distintos niveles de daño por sol (Figura 1.6 y 1.7). El estado hídrico de los tejidos no presentó diferencias entre los distintos tratamientos y niveles de daños comparados ( $p = 0,1089$ ). Los valores de pérdida de electrolitos de los tejidos E a luz directa durante dos horas fueron estadísticamente similares a los observados en tejidos con daño por sol blush y leve. Mientras, los tejidos NE presentaron el mínimo valor de pérdida de electrolitos, seguido por los tejidos sanos. El daño oxidativo se determinó mediante la cuantificación del contenido de MDA. Los tejidos NE y S no presentaron diferencia significativa en relación con esta variable, mientras los tejidos expuestos a luz solar directa y con daño por sol mostraron un marcado incremento de peroxidación de lípidos comparados a los tejidos sanos.

**Tabla 2.4. Comparación del estado de los tejidos de piel de frutos de pera Anjou luego de la exposición a luz solar directa controlada y con distintos niveles de daño por sol al momento de cosecha.**

Exposición/Nivel de daño	Contenido relativo de agua (%)	Pérdida de electrolitos (%)	Peroxidación de membrana (nmol MDA g <sup>-1</sup> PF)
NE	90,0 ± 3,3 A	33,7 ± 2,9 d	5,9 ± 2,5 b
E	84,4 ± 1,8 A	46,3 ± 2,1 b	10,6 ± 4,1 a
S	86,6 ± 4,8 A	42,0 ± 2,3 c	6,7 ± 0,5 b
B	87,5 ± 1,1 A	50,1 ± 3,3 b	10,7 ± 0,9 a
L	89,2 ± 3,2 A	48,6 ± 4,3 b	13,3 ± 3,9 a
M	87,1 ± 1,4 A	57,4 ± 4,3 a	9,2 ± 2,5 a

Las siglas corresponden a: cara no expuesta (NE) y cara expuesta (E) de fruto expuestos durante 2 h a radiación solar directa (temperatura superficial del fruto > 40 ° C y < 50 °C); frutos sin daño por sol (S) y frutos con daño por sol blush (B), leve (L) y moderado (M) al momento de cosecha. Los datos corresponden a la media ± D.E. (n = 5). Letras distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas (DGC; p ≤ 0,05).

## 2.4. DISCUSIÓN

### 2.4.1. La expresión de genes de enzimas asociadas a la pared celular se ve alterada en la piel de los frutos con daños por sol

Las plantas presentan un complejo y específico sistema de monitoreo, señalización, control y respuesta frente a las condiciones ambientales que les permite activar diversas vías transcripcionales para promover diferentes mecanismos (morfológicos, anatómicos, fisiológicos y bioquímicos) para la defensa, adaptación y supervivencia (Novaković y col., 2018).

Se ha reportado en plantas bajo distintas situaciones de estrés que la síntesis de lignina y su incorporación en la pared celular primaria responden a mecanismos de defensa cumpliendo este compuesto un rol fundamental en el fortalecimiento de sus propiedades mecánicas y biofísicas (Barros y col., 2015; Lagunes y Zavaleta, 2015). Distintos genes involucrados en la expresión de enzimas asociadas a la síntesis de precursores y biosíntesis de lignina en las plantas son regulados positivamente bajo condiciones de alta irradiación y/o cambios térmicos (Le Gall y col., 2015).

En este trabajo se decidió analizar el patrón de expresión de PcPAL y PcCAD1, genes de enzimas que inciden en la síntesis de lignina. En la piel de los frutos con daño por sol (B, L y M) se observó un incremento de la expresión relativa de PcPAL y PcCAD1, aunque no fue significativa respecto de los tejidos sanos (Figura 2.4). En frutos de manzano expuesto a luz solar directa y con daño por sol se reportaron resultados similares, sin embargo la expresión de genes relacionados con la síntesis de lignina en estos tejidos se mantuvo en alza respecto a los tejidos sin daño incluso 15 días después de la exposición (Torres y col., 2020). Los resultados observados en este trabajo pueden deberse a la desactivación progresiva de esta vía transcripcional frente

a la ausencia del estímulo lumínico por un tiempo prolongado, sin embargo el incremento de lignina en la pared así como la mayor concentración de compuesto fenólicos en los tejidos estresados confirma la respuesta de expresión de genes como PAL y CAD.

Durante el crecimiento y desarrollo del fruto, diversas enzimas participan en la síntesis y remodelación continua de la pared celular (Wei y col., 2010). Particularmente en el proceso de maduración de frutos, algunas de estas enzimas contribuyen a su desmontaje, reduciendo las conexiones intercelulares y solubilizando y despolimerizando sus compuestos. Diversos estudios han demostrado que tratamientos térmicos postcosecha retrasan la maduración de frutos, como resultado de la inactivación o pérdida de actividad de enzimas de pared e inhibición o reducción de la expresión de sus genes correspondientes (Langer y col., 2018; Paull y Jung Chen, 2000). Informes de Pombo y col. (2009) demostraron que tratamientos de irradiación con UV-C en frutilla promovieron cambios en los perfiles de expresión de diferentes genes que codifican enzimas y proteínas que modifican la pared celular (EXP, END, CEL, PG, PME), asociados al incremento de firmeza y vida útil de los frutos. Resultados similares se reportaron en tomates tratados con UV en la postcosecha logrando un retraso del desmontaje de la pared celular asociado a la reducción de la expresión transcripcional y/o inhibición de la actividad de enzimas que degradan la pared como PME, PG y CEL (Bu y col., 2013; Ait Barka y col., 2000).

Los resultados observados en la pared celular de los tejidos con daño por sol de los frutos de pera presentados en el capítulo anterior, demuestran que las condiciones adversas en las cuales estos se desarrollaron promovieron cambios en sus componentes y estos cambios presentan similitud con los descritos en frutos que se desarrollaron en condiciones de mayor incidencia de radiación solar (Raffo y col., 2011) o recibieron tratamientos térmicos postcosecha (Lara y col., 2006; Paull y Jung Chen, 2000; Shalom y col., 1993; Klein y col., 1990). Le Gall y col. (2015) proponen que bajo condiciones de estrés ambiental hay una implícita participación de las enzimas modeladoras de la pared celular involucradas en la biosíntesis y/o modificación de sus componentes para la adquisición de tolerancia y supervivencia de los tejidos.

Distintos autores exponen que PG es probablemente la enzima más importante durante el ablandamiento de pera, pero requiere de la intervención de otras enzimas para actuar sobre las pectinas (Song y col., 2016; Wei y col., 2010; Fonseca y col., 2005). Con relación a la maduración de las peras, se ha observado que variedades que presentan un mayor ablandamiento muestran una elevada expresión y actividad de esta enzima, mientras que dichos parámetros son notoriamente más bajos en variedades de ablandamiento lento (Wei y col., 2015; Hiwasa y col., 2004). En Anjou se reportó un incremento progresivo pero limitado de la actividad de PG durante la maduración (Dong y col., 2018), coincidente con su clasificación como pera de ablandamiento lento. Hiwasa y col. (2003a) registraron actividad de P<sub>c</sub>PG1 y P<sub>c</sub>PG2 en frutos de pera europea, con una baja expresión durante el preclimaterio que se

incrementó durante la maduración, presentando PcPG2 mayores niveles de expresión que PcPG1. Por otro lado, tratamientos térmicos y con exposición a radiación UV en frutos de tomate y frutilla, mostraron reducción de la actividad de PG incluso durante varios días posteriores a los tratamientos (Langer y col., 2018; Pombo y col., 2009; Ait Barka y col., 2000). En los estudios de la presente tesis, la expresión de PcPG2 no se modificó en los frutos con daño *blush* y leve respecto de los tejidos sin daño, pero se incrementó marcadamente en los tejidos con daño por sol moderado (Figura 2.5.A). Esta diferencia en la expresión de PG no se vio reflejado en cambios en el contenido de AU en las pectinas totales, ni en ninguna de las tres fracciones de pectinas analizadas, como se discutió en el capítulo anterior. Esta aparente contradicción sugiere que la sobreexpresión de PG, en frutos con daño moderado, podría responder a un mecanismo compensatorio en respuesta a una mayor integridad de la pared celular en los tejidos con daño por sol. Otra posibilidad es que, como se discute a continuación, la actividad de PG depende de la actividad de PME.

Wu y col. (2018) expusieron que PME es una enzima que puede participar en la adquisición de termo-tolerancia en la pared celular en tejidos sometidos a condiciones adversas, al determinar que el grado de desmetilación en las pectinas es clave para el control de rigidez y estado hídrico de la matriz pectínica, y para mantener la homeostasis de calcio en el apoplasto. Por otro lado, esta enzima es fundamental durante el proceso de maduración y el ablandamiento de los frutos al incrementar la afinidad de PG a su sustrato, dado que esta última actúa principalmente sobre pectinas desmetiladas. Durante la maduración de peras Anjou, se informó que la actividad de PME se incrementa levemente, pero presenta una relación directa y negativa con la firmeza de los frutos (Dong y col., 2018). Distintos trabajos que evaluaron la expresión de PME frente a factores físicos obtuvieron resultados contradictorios. En tratamientos térmicos, la expresión y actividad de PME se incrementó en frutos de frutilla y col china (Langer y col., 2018; Yang y col., 2006) mientras que en tomates, frutillas y duraznos bajo tratamiento UV la expresión relativa y la actividad enzimática de PME disminuyeron en los frutos tratados (Santin y col., 2019; Bu y col., 2013; Pombo y col., 2009). En este trabajo PcPME1 no presentó diferencias a nivel transcripcional entre los distintos niveles de daño por sol (Figura 2.5.B). Este resultado puede asociarse con la ausencia de cambios en el contenido de AU en las pectinas entre los tejidos con y sin daño por sol. Los resultados de la expresión génica de las enzimas PME y PG analizadas (Figura 2.5), junto a la ausencia de cambios en el contenido de los dominios lineales de las pectinas (Figura 1.11.B y 1.12.A), sugieren que el daño por sol no promovió procesos de solubilización o depolimerización de las pectinas.

En las peras europeas, distintos autores han reportado que la pérdida de galactósidos, arabinósidos y otros residuos de cadenas laterales son un evento importante en la solubilidad de pectinas durante el ablandamiento y maduración de los frutos (Brahem y col., 2017; Mwaniki y col., 2007; Fonseca y col., 2005; Urzúa Barahona, 2001); incluso, Urzúa Barahona (2001) destacó que las enzimas

desglicosilantes tienen un papel de mayor importancia que PG en el ablandamiento de peras var. Packham's Triumph y Beurré Bosco. En este trabajo se analizó la expresión de los genes PcGAL2, PcGAL4 y PcARF1 involucrados en el proceso de ablandamiento durante la maduración de peras europeas (Song y col., 2016). La expresión de estos genes mostró un aumento frente a la severidad del daño por sol en los tejidos comparados a los tejidos sanos (Figura 2.6). El incremento de la expresión de estos genes, y los cambios observados en la fracción PSH (Figura 1.12.B) sugiere que la eliminación de cadenas laterales ocurre principalmente mientras las pectinas están ligadas a la pared celular. De este modo, una mayor actividad de las enzimas desglicosilantes en los frutos con daño por sol provocaría una mayor eliminación de azúcares neutros de las cadenas laterales en la fracción de pectinas covalentemente unidas a la pared, cambios que tendrían incidencia en el empaquetamiento e interacciones de los componentes de pared celular, alterando propiedades de la matriz como la porosidad, elasticidad y rigidez.

PcEND1 y PcCEL2 son genes que expresan enzimas hidrolíticas que actúan sobre hemicelulosas y celulosa amorfa. Yang y col. (2016) demostraron que la expresión de endoglucanasas y celulasas en frutos de pera durante la maduración es diferencial según las especies y variedades observándose patrones de ablandamiento distintos. Asimismo, Song y col. (2016) demostraron que PcEND1 (PcCEL1a+1b) se correlaciona fuertemente con el ablandamiento en peras europeas durante la maduración, mientras PcCEL2 no participaría de forma crucial en este proceso. En los frutos de pera con daño por sol, la expresión de PcEND1 no varió significativamente entre los distintos niveles de daño en la piel (Figura 2.7.A). En cambio, los tejidos con daño por sol presentaron una reducción de la expresión de PcCEL2 (Figura 2.7.B). La baja expresión de PcCEL2 podría asociarse con el mayor contenido de hemicelulosas observado en la piel de los frutos con daño por sol.

Trabajos de investigación en plantas bajo condiciones de estrés abióticos han reportado regulación positiva de genes XHT y EXP, asociados a la remodelación y fortalecimiento de la pared celular al reforzar las conexiones de hemicelulosas entre sí y con otros polisacáridos (Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015). Han y col. (2017) trabajaron en plantas de tomate y arabidopsis modificadas genéticamente para sobreexpresar XTH y a partir de sus resultados sugirieron que XTH mantuvo la integridad de la pared celular y de las células, mejorando la tolerancia a estrés abióticos en ambas plantas y retrasando la madurez de los frutos transgénicos de tomate. Resultados similares se obtuvieron en frutos de frutilla bajo tratamiento térmico, donde los frutos tratados con calor presentaron aumento de expresión y actividad de XET, XEH y EXP, lo cual fue asociado con el refuerzo y modulación de la interacción hemicelulosas-celulosa (Langer y col., 2018). Los resultados obtenidos en piel de frutos de pera mostraron un incremento marcado de la expresión de PcXET y PcEXP1 en los tejidos con daño por sol (Figura 2.8). Estos cambios podrían asociarse con el mayor contenido de hemicelulosas en los tejidos dañados, dado que las

expansinas permiten la relajación de la red fibrilar de la pared, y facilitar el acceso de las enzimas xiloglucano endotransglucosidasas para aumentar las interconexiones de hemicelulosas, como también incorporar material nuevo (Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015; Yang y col., 2006). La sobreexpresión de ambos genes en los tejidos analizados fortalece la idea de que en la pared celular estresada se generan cambios entre las interacciones de sus componentes con el fin de tolerar la tensión externa a la cual está siendo sometida.

Los tejidos de piel de pera con daño por sol presentaron cambios en los perfiles de expresión de genes de enzimas asociadas a la remodelación de la pared celular respecto de los tejidos sin daño. Estos cambios sugieren que frutos sometidos a condiciones ambientales estresantes como elevada radiación solar y temperatura, que provocan daño por sol, responden con mecanismos de respuesta adaptativos frente a estrés que involucra el fortalecimiento de la pared celular de la piel. Por otra parte, la ausencia de cambios en la expresión de genes asociados al ablandamiento de las peras como PcPG2, PcPME1 y PcEND1 pone en observación el planteo de que frutos con daño por sol presentan un estado de madurez más avanzado, por lo menos en relación con el metabolismo de la pared celular.

### **2.4.2. La expresión de genes de enzimas asociadas a remodelación de la pared celular se reduce durante la exposición a luz solar directa**

Durante el crecimiento de los frutos hasta su madurez de cosecha, estos se desarrollan expuesto a condiciones cambiantes de calidad, intensidad y cantidad de luz, que muchas veces promueve respuestas de estrés abiótico. El desarrollo del daño por sol en los frutos es un proceso crónico difícil de reproducir en condiciones controladas. Esto ha provocado que la mayor parte del conocimiento relacionado al estudio del daño por sol sea puntuales y descriptivos sobre el síntoma. Los estudios que han avanzado sobre la dinámica de la respuesta en el tiempo y desarrollo de los síntomas de daño por sol son escasos, pero fundamentales para comprender la respuesta de los tejidos y desarrollar estrategias que permitan reducir o mitigar las pérdidas ocasionadas por estrés por alta radiación y temperatura.

La respuesta transcriptómica durante eventos de estrés lumínico y térmico es aún poco conocida. En relación con la luz solar (estrés de luz fluctuante y estrés por fotoperiodo), distintos actores han observado cambios notables y dinámicos en la transcripción celular, resaltando la activación de genes asociados a la vía de fenilpropanoide, como genes que codifican enzimas responsables de la eliminación de EROs (Roeber y col., 2021; Huang y col., 2019).

Con relación a la pared celular, si bien existen reportes sobre la respuesta transcripcional de la recuperación de la pared celular posterior a los eventos estresantes (Novaković y col., 2018; Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015), se desconoce cómo se modula la expresión de los genes de pared celular durante la

respuesta frente al estrés. A partir de este interrogante, se intentó dilucidar en parte que sucede con la expresión génica de enzimas modeladoras de la pared celular durante eventos estresantes relacionados al desarrollo de síntomas de daño por sol.

Durante los ensayos de la exposición directa de frutos de pera a la luz solar, se observó un incremento significativo de la expresión de PcCAD1, mientras PcPAL no presentó cambios notables en su expresión (Figura 2.10). Estudios en *Arabidopsis* señalaron una activación positiva en la transcripción de genes relacionado a la vía de los fenilpropanoides durante eventos de estrés por alta irradiación (Huang y col., 2019) coincidente con los resultados observado en este trabajo. Asimismo, se ha reportado el incremento de la expresión y actividad de enzimas relacionadas a la biosíntesis de lignina bajo situaciones de estrés lumínico (Morales-Quintana y col., 2020; Torres y col., 2020; Le Gall y col., 2015). La expresión de estos genes durante la inducción del estímulo estresante sugiere una respuesta celular temprana de protección a través de la activación de vías de producción de distintos compuestos fenólicos. El incremento en el contenido de polifenoles y antocianinas (Figura 1.5.D y 1.8.B), así como el aumento de lignina en la pared celular (Figura 1.11.F) observado en los tejidos con daño por sol demuestran que hubo una efectiva activación de la vía de los fenilpropanoides y biosíntesis de lignina como respuesta al incremento de la expresión de estos genes. Por otro lado, se sugiere que en la piel de los frutos que presentaron daño por sol (B, L y M), la modulación positiva de estos genes retorna a niveles basales similares a los tejidos no expuestos luego de los eventos estresantes.

En relación con las enzimas modeladoras de la pared celular se observaron distintos tipos de respuesta a la exposición a luz solar directa. Los genes PcPG2, PcPME1, PcARF1, PcEND1, PcXET y PcEXP1 presentaron una caída drástica de la expresión génica respecto a los valores de los tejidos en el tiempo cero. Mientras, PcGAL2, PcGAL4 y CEL2 no mostraron variaciones en la expresión génica durante las 2 h de exposición a luz solar directa en comparación con el tiempo cero. Langer y col. (2018) observaron un comportamiento similar en distintos genes relacionados a las enzimas modeladoras de pared en frutillas bajo tratamiento postcosecha térmicos, exponiendo que determinados genes fueron regulados negativamente (FaPG1, FaPLB, FaPLC, FaGAL3, FaGAL4, FaXHT2) frente al estímulo calor, mientras otros no presentaron diferencias (FaPLA, FaGAL1, FaGAL2, FaXYL1, FaEXP2) o incluso aumentaron su expresión (FaPME1, FaXTH1, FaEXP1). Sasidharan y col. (2011) plantearon que la expresión de genes que pertenecen a familias multigénicas, como es el caso de estas enzimas, es regulada de forma diferencial por factores ambientales y hormonales, respondiendo de diversas formas como se observó en el presente trabajo. A partir de los resultados obtenidos se propone que los mecanismos relacionados a la reparación y remodelación de la pared celular por vías enzimáticas no serían respuestas que se inducen durante eventos estresantes asociados a elevada radiación solar y temperatura. Es posible, que durante estos eventos se priorice la modulación

de respuestas asociadas a la defensa antioxidante y protección de organelas y biomoléculas vitales (Roeber y col., 2021).

La exposición de frutos de pera Anjou durante dos horas a luz solar directa promovió daños fisiológicos y bioquímicos similares a los observados en frutos con síntomas de daño por sol. El incremento de permeabilidad de membrana y el aumento de peroxidación lipídica en los tejidos expuestos presentó valores semejantes a los reportados en frutos con daño por sol. Esto sugiere que las condiciones bajo las cuales se realizó el ensayo podrían simular/representar un día del ciclo de exposiciones con alta irradiación y temperatura a la que se encuentran sometidos los frutos y que promueve el desarrollo de síntomas de daño por sol en el campo. Por último, los resultados de la expresión de los genes durante y posterior al estrés por altas radiación y temperatura, permite especular que los eventos moleculares descritos se suceden encadenados y repetidamente en los frutos generando cambios metabólicos específicos y dinámicos que activan mecanismos de defensa, reparación y adaptación en la pared celular, así como también en el metabolismo oxidativo de las células.

### **2.5. CONCLUSIÓN**

En la piel de frutos de pera Anjou expuestos a alta radiación y temperatura se promueve cambios transcripcionales asociados con la activación de vías de síntesis de compuestos fenólicos, mientras la expresión de genes asociados a la remodelación de la pared celular es regulada negativamente. Esto señala que los tejidos estresados modulan respuestas moleculares específicas que permiten contribuir con la supervivencia, promoviendo la síntesis de sustancias que reducen o mitigan el daño durante la inducción del estrés. Luego de las exposiciones a alta radiación y temperatura, se activan mecanismos de reparación que contribuyen, en parte, con la modificación de la composición y distribución de componentes de la pared celular en los tejidos de piel de pera con daño por sol. El incremento de la expresión génica de enzimas como XET y EXP, y de genes asociados a la biosíntesis de lignina en los tejidos con daño por sol, expone la capacidad de las células para corregir y modificar los daños producidos por el estrés. Finalmente, el perfil de expresión de genes asociados a la modificación de la pared celular que presentan los tejidos con daño por sol en frutos de pera Anjou no se relaciona con los perfiles observados durante el desmontaje de la pared celular en procesos de maduración de peras europeas. Contrariamente, estos resultados presentan mayor similitud con los cambios de expresión génica de enzimas de pared celulares reportados en tratamientos postcosecha utilizados para retrasar la madurez en frutos, como los tratamientos térmicos o de irradiación UV.

## **CAPÍTULO 3: Efecto de la exposición precosecha a elevada radiación solar y temperatura sobre parámetros asociados a la maduración postcosecha de frutos de pera**

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

La maduración consiste en una serie de eventos genéticamente programados, caracterizados por procesos oxidativos, enzimáticos, bioquímicos y fisiológicos que influyen en la calidad externa e interna de los frutos. Estos cambios, aunque varían entre especies, generalmente incluyen modificaciones de color, aroma, sabor y textura (Gapper y col., 2013; Giovannoni, 2001). El cambio del color es resultado principalmente de la degradación de la clorofila y el incremento de pigmentos asociados con tonos amarillos, rojos y marrones como los carotenoides, las antocianinas y polifenoles presentes en la piel de los frutos. Los cambios en el contenido de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles tienen un efecto directo en la calidad nutricional, el sabor y el aroma del fruto. A su vez, el ablandamiento y los cambios de textura son debidos principalmente a variaciones en la turgencia de los tejidos y el metabolismo de la pared celular. Específicamente, la transformación de la pared celular durante la maduración de los frutos depende de cinco procesos específicos: solubilización de pectinas, depolimerización de pectinas, pérdida de cadenas laterales de pectinas y hemicelulosas, depolimerización de hemicelulosas y depolimerización de celulosa. La participación de cada uno, su intensidad y el momento en el que se desarrollan varían en los distintos frutos, incluso entre variedades, resultando en una amplia gama de texturas (Brummell, 2006; Brummell y col., 2004).

La pera es un fruto climatérico, dado que presenta un incremento de la producción de etileno y de la respiración durante la maduración, que suele coincidir con la madurez de consumo (Calvo y Colodner, 2022). Durante el proceso de maduración, las peras de piel verde sufren un cambio de color desarrollando tonos verdes amarillos a amarillos debido a la degradación de clorofilas (Argenta y col., 2003), mientras el contenido de ácido málico desciende y los azúcares libres aumentan (Musacchi y Serra, 2018; Rudell y col., 2017). En general, la textura de las peras cambia de dura y seca a mantecosa y jugosa, debido al ablandamiento del fruto como resultado del desmantelamiento de la pared celular. En estos frutos el ablandamiento de la pared se debe principalmente a procesos de pérdida de cadenas laterales y solubilización de pectinas (Brahem y col., 2017; Wei y col., 2015; Murayama y col., 2006).

Las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollan los frutos afectan su calidad externa e interna e influyen en la capacidad de conservación, maduración y

vida postcosecha (McTavish y col., 2020; Racskó y Schrader, 2012; Woolf y Ferguson, 2000). Distintos estudios han reportado diferencias en la composición metabólica de los frutos en relación con la incidencia de luz solar, las cuales deben ser consideradas durante el manejo postcosecha para reducir pérdidas en calidad y cantidad (McTavish y col., 2020; Mupambi y col., 2018; Rudell y col., 2017; Zhao y col., 2016). En particular el daño por sol es un desorden que se desarrolla en la superficie de los frutos expuesta diariamente a condiciones de elevada radiación y temperatura, considerándose un defecto comercial. El área afectada presenta cambios en los índices de madurez que se han asociado directamente a un avance en el estado madurativo de estos frutos y a una vida postcosecha más corta (Munné-Bosch y Vincent, 2019). El efecto sobre la calidad externa e interna en los frutos con daño por sol determina que estos sean clasificados en categorías comerciales inferiores o directamente descartados. El síntoma de daño por sol genera un rechazo visual por parte del consumidor. Sin embargo, frutos de manzana con daño por sol recibieron mejores clasificaciones en las evaluaciones sensoriales realizadas luego de la conservación (Racskó y Schrader, 2012). A su vez, Schrader y col. (2009) estudiaron el comportamiento de manzanas con distintos niveles de daño por sol durante la conservación en frío, determinando que las diferencias en los índices de madurez establecidas en cosecha se mantuvieron durante la conservación, pero se redujeron e hicieron más sutiles en los frutos con periodos de guarda más prolongados.

Por otro lado, se ha observado que los tejidos con daño por sol presentan mayor concentración de compuestos antioxidantes y aumento en la actividad del sistema de defensas antioxidantes. Este tipo de compuestos ha sido asociado con una mejor calidad de conservación y tolerancia a condiciones adversas (Woolf y col., 1999; Zhao y col., 2016). Asimismo, el consumo de un mayor contenido de compuestos antioxidantes se ha relacionado con efectos favorables en la nutrición y salud humana, representando una oportunidad comercial para insertar frutos con síntomas de daño por sol en el mercado (Yuri y col., 2010).

Diversas tecnologías postcosecha emplean altas temperaturas y exposiciones a distintas longitudes de onda para promover mecanismos de defensa en los frutos de forma que ralenticen los procesos de maduración e incrementen la tolerancia a condiciones adversas bióticas o abióticas. En este sentido, Woolf y Ferguson (2000) sugieren que los frutos que se han desarrollado bajo situaciones de altas temperaturas en campo, podrían presentar comportamientos similares durante la maduración que los que fueron sometidos a tratamientos postcosecha. En capítulos anteriores se demostró que los tejidos con diferentes niveles de daño por sol presentan alteraciones metabólicas con relación a su capacidad antioxidante y la composición de la pared celular. Los cambios descritos en peras Anjou presentan similitudes con modificaciones metabólicas descritas en frutos bajo tratamientos térmicos o lumínicos que promueven mejoras en la conservación y vida post cosecha.

Los frutos de pera y manzana que se desarrollan expuestos a radiación solar o presentan síntomas de daño por sol en cosecha presentan diferencias notorias en el estado de madurez. Estas alteraciones han supuesto un estado avanzado en la madurez de estos frutos, afectando directamente su conservación y maduración y requiriendo manejos postcosecha diferenciales de los frutos sanos o no expuestos (Morales-Quintana y col., 2020; Racskó y Schrader, 2012; Serra y col., 2018). Sin embargo, no se han encontrado estudios sobre el comportamiento de la maduración de frutos de pera con daño por sol durante su postcosecha que verifiquen este supuesto.

### **3.1.1. Hipótesis**

El efecto de la exposición precosecha a elevada radiación solar y temperatura en peras, que desarrollan síntomas de daño por sol, afecta la maduración postcosecha de los frutos.

### **3.1.2. Objetivo específico**

Analizar parámetros asociados al proceso de maduración en frutos con daño por sol durante su vida postcosecha.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Material Vegetal**

Se emplearon frutos de pera Anjou cosechados durante la temporada 2018/2019 y conservados en cámaras a  $0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  y 95 % HR (usualmente denominada a este tipo de conservación frío convencional) durante 145 días. Se trabajó con frutos sanos (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L), descriptos en la sección 1.2 de Materiales y Métodos. Estas categorías de daño por sol suelen ingresar y ser procesadas en las líneas de empaque para su comercialización en categorías de bajo valor comercial.

### **3.2.2. Medida de variables**

Las descripciones metodológicas de las variables medidas fueron realizadas en la sección Materiales y Métodos. Las determinaciones que se realizaron fueron:

- Tasa de producción de etileno en fruto entero.
- Índices de madurez (firmeza de pulpa, sólidos solubles, acidez titulable).

- Metabolismo oxidativo (peroxidación de lípidos; capacidad antioxidante; contenido de polifenoles totales; contenido de clorofilas, carotenoides y antocianinas).
- Componentes de pared celular (RIA; contenido de almidón; pectinas totales; hemicelulosas; celulosa y lignina; contenido de AU y AN en fracciones de pectinas PSA, PSE, PSH).

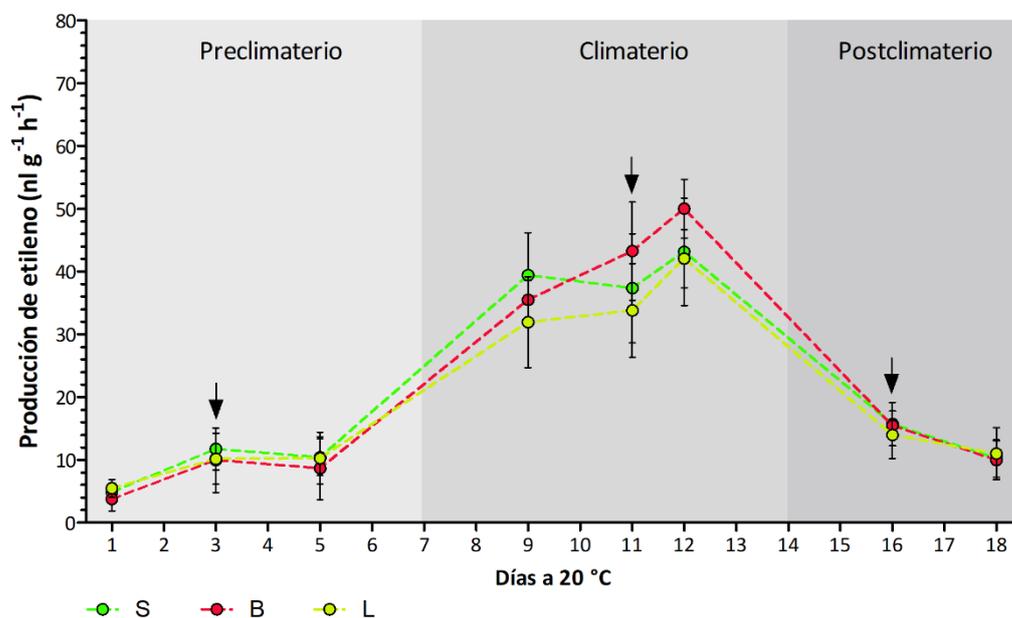
### 3.2.3. Análisis estadístico

En este capítulo se trabajó con un  $n = 5$  para todas las variables de estudio.

## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1. Determinación de los estadios madurativos

En la Figura 3.1 se presentan las curvas de producción de etileno para los frutos sin daño por sol y con daño blush y leve durante la maduración a 20 °C luego de 145 días de conservación a 0°C ± 0,5 °C y 95 % HR.



**Figura 3.1. Producción de etileno en frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional (0°C ± 0,5 °C y 95 % HR).** Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Las flechas (→) indican los momentos de muestreo. Los resultados se expresaron como  $\text{nl g}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Los valores son la media ± D.E. ( $n = 5$ ). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

No hubo diferencias significativas en la tasa de producción de etileno diaria entre los tres niveles de daño por sol. Luego de la conservación en frío por 5 meses, la producción de etileno en los frutos fue de 4,9, 3,8 y 5,5  $\text{nl g}^{-1} \text{h}^{-1}$  en S, B y L respectivamente. La tasa de producción se mantuvo por debajo de 15  $\text{nl g}^{-1} \text{h}^{-1}$  en todos los niveles de daño durante los primeros 5 días a 20 °C. Entre los días 5 y 9, se produjo un marcado incremento de la emisión de etileno, determinando el inicio del pico climatérico. A partir de ese momento, la producción de etileno se mantuvo en aumento hasta el día 12 inclusive alcanzando los valores máximos registrados. Estos valores fueron de 43,2, 50,0 y 42,1  $\text{nl g}^{-1} \text{h}^{-1}$  en S, B y L respectivamente. Luego, la tasa de producción de etileno descendió significativamente, finalizando la determinación a los 18 días a 20 °C, con valores medios de 10,2, 10,0 y 11,0  $\text{nl g}^{-1} \text{h}^{-1}$  en S, B y L respectivamente.

A partir de las curvas de producción de etileno se determinaron las etapas del climaterio de los frutos de pera Anjou durante la maduración a 20 °C luego de la conservación frigorífica por 145 días a 0 °C  $\pm$  0,5 °C y 95 % HR. La etapa preclimaterio se inicia el día 1 y finaliza el día 7, periodo durante el cual la tasa de producción de etileno se incrementó paulatinamente sin presentar diferencias significativas entre los valores diarios. La etapa del climaterio, en la cual se produce el pico máximo de emisión de etileno, se produce en el intervalo definido entre los días 7 y 14. Durante este periodo se produce un aumento significativo de la emisión de etileno en los frutos respecto de la etapa anterior, representado por más del doble de producción de etileno. Finalmente, la etapa de postclimaterio comprendió el periodo entre los 14 a 18 días de salida de cámara, donde la tasa de producción de etileno descendió marcadamente. A partir de la determinación de las etapas del climaterio de los frutos, se establecieron los momentos de muestreo para analizar distintos parámetros asociados a la maduración de los tejidos con daño por sol. En la Figura 3.1 se observa que no hubo diferencias significativas en la producción de etileno entre los frutos con distintos niveles de daño por sol durante el periodo de maduración evaluado. En base a estos resultados, se definió que los muestreos para las determinaciones de calidad, metabolismo oxidativo y composición de pared celular se realizarían los días 3, 11 y 16 posteriores a la salida de cámara, representando las etapas de preclimaterio, climaterio y postclimaterio respectivamente.

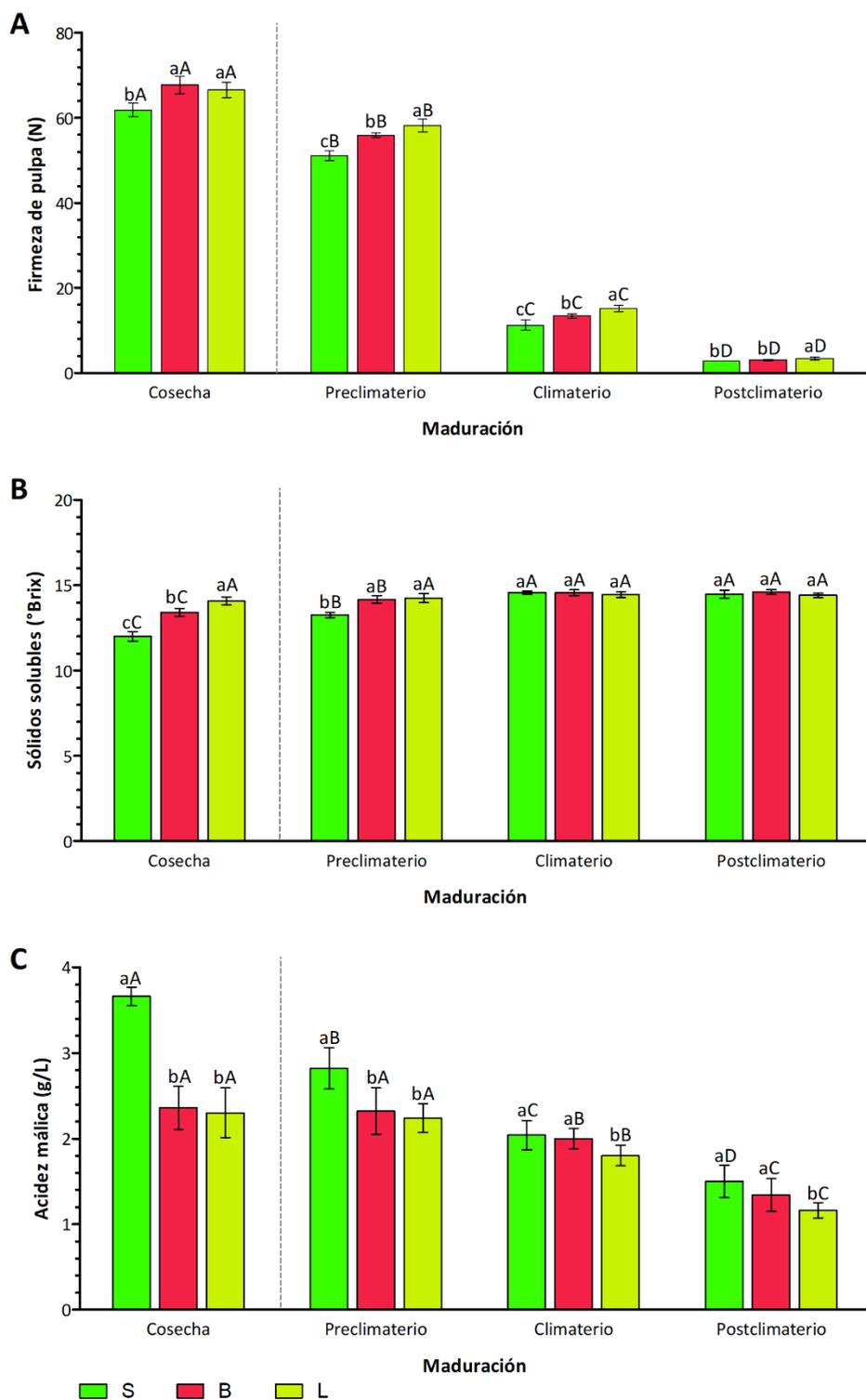
### **3.3.2. Evolución de la calidad de los frutos con daño por sol durante la maduración**

El comportamiento de los índices de calidad durante la maduración a 20 °C en la pulpa de los tejidos con daño por sol se presenta en la Figura 3.2. La firmeza se redujo significativamente en todos los tejidos durante la conservación y la maduración (Figura 3.2.A). Comparado con los valores a cosecha, la caída de presión de los tejidos en el preclimaterio fue de 17,4 %, 17,5 % y 12,6 % para los tejidos S, B y L respectivamente. En el climaterio, los valores medios de firmeza en los tejidos fueron

11,3, 13,4 y 15,1 N en S, B y L respectivamente, con un marcado descenso equivalente al 80 % respecto de los valores a cosecha. La firmeza de pulpa óptima para el consumo de esta variedad varía entre 13 a 18 N, indicando que la madurez de consumo para Anjou coincide con la etapa climatérica del fruto luego de una conservación a  $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 95 % HR por 145 días. En el postclimaterio, los valores de firmeza en los tejidos alcanzaron un valor promedio de 3,1 N, fruto no apto para consumo. Los tejidos con daño por sol presentaron un valor superior de firmeza de pulpa durante la maduración respecto de S, diferencia establecida desde la cosecha. Durante las etapas preclimaterio y climaterio, las diferencias de firmeza fueron significativas entre los distintos niveles de daño por sol, acentuándose con la severidad del daño. En el postclimaterio, solo se diferenció el tejido L, con un valor 18 % superior respecto de S.

Se observó un incremento en el contenido de sólidos solubles en los tejidos S y B durante la conservación y el preclimaterio (Figura 3.2.B). Los tejidos L no mostraron diferencias en esta variable durante la maduración. Las diferencias en el contenido de sólidos solubles entre los niveles de daño por sol observadas en cosecha se mantuvieron hasta el preclimaterio, con valores superiores en B y L respecto de S. En cambio, los valores de sólidos solubles fueron estadísticamente iguales en climaterio y postclimaterio, con un valor promedio para todos los tejidos de 14,5 °Brix.

En la Figura 3.2.C, se presentan los cambios en el contenido de acidez málica entre los tejidos con distintos niveles de daño por sol y durante la maduración a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se observa una caída significativa del porcentaje de acidez durante la maduración en los tres tejidos evaluados. En los tejidos sanos hubo una notoria reducción de la acidez durante la conservación, equivalente a un descenso del 23 % respecto a cosecha. Este comportamiento no se observó en los frutos con daño por sol, donde los valores de acidez a cosecha y luego de la conservación en frío fueron equivalente estadísticamente. Por otro lado, los tejidos con daño por sol presentaron valores de acidez menores respecto a S durante la maduración. Las diferencias de acidez se fueron atenuando hacia el postclimaterio, con valores promedio finales de 1,5, 1,3 y 1,2 g/L en S, B y L respectivamente.



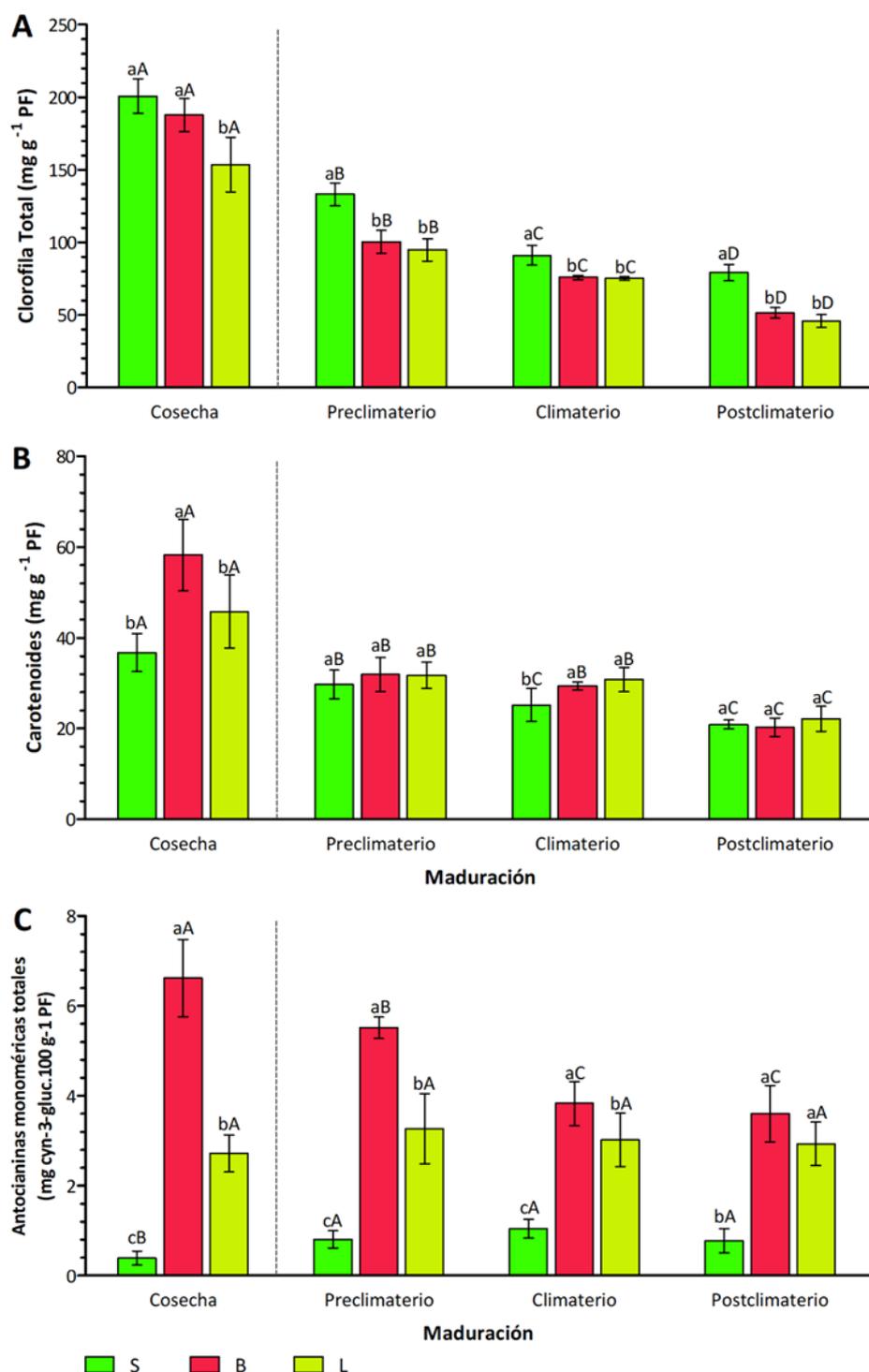
**Figura 3.2.** Índices de madurez en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou a cosecha y su evolución durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional (0°C ± 0,5 °C y 95 % HR). (A) Firmeza de pulpa (N); (B) Sólidos solubles (°Brix); (C) Acidez málica (%). Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre distintos momentos de muestreo para un mismo nivel de daño por sol (DGC; p ≤ 0,05).

### 3.3.3. Evolución del metabolismo oxidativo de la piel durante la maduración

El contenido de clorofila total descendió significativamente durante el periodo evaluado (Figura 3.3.A). En cosecha, los tejidos con daño por sol presentaron menor contenido de clorofila total respecto de los tejidos sin daño, con diferencias sustanciales en el tejido L respecto de S. Luego de la conservación en frío, el contenido de clorofila total fue significativamente menor en los tejidos B y L respecto de S, diferencia que se mantuvo durante todo el proceso de maduración. Los valores promedio de clorofila total para S fueron 133,1, 91,3 y 79,1 mg g<sup>-1</sup> PF en preclimaterio, climaterio y postclimaterio respectivamente. Las reducciones en el contenido de clorofila total respecto de S fueron de 25 % y 29 % en el preclimaterio y 17 % y 18 % en el climaterio y 35 % y 42 % en el postclimaterio para B y L respectivamente.

En la Figura 3.3.B se presenta la variación del contenido de carotenoides en los tejidos con daño por sol. En cosecha, los tejidos evaluados presentan concentraciones diferenciales de este pigmento, con valores significativamente superiores en los tejidos B. Luego de la conservación en frío, se observó un marcado descenso en el contenido de carotenoides en los tres tejidos. Esta diferencia fue relevante en los tejidos con daño por sol, con descensos de 45 % en B y 31 % en L, mientras en S se registró una caída de solo 19 %. Durante el proceso de maduración, no se observaron variaciones significativas en el contenido de este pigmento. Los tejidos S presentaron un descenso del contenido de carotenoides entre el preclimaterio al climaterio, manteniéndose constantes hasta el postclimaterio con un valor final de 20,9 mg g<sup>-1</sup> PF. Los tejidos con daño por sol no presentaron diferencias en el contenido de carotenoides en las primeras etapas de la maduración, con valores medios de 31,9 y 29,4 mg g<sup>-1</sup> PF en B y 31,7 y 30,8 mg g<sup>-1</sup> PF en L en preclimaterio y climaterio respectivamente. Se observó una reducción importante del contenido de carotenoides en los tejidos con daño por sol en el postclimaterio. El valor promedio final del contenido de este pigmento fue similar en los tres tejidos.

El contenido de antocianinas presentó variaciones en su concentración durante el periodo de evaluación en función del tipo de tejido (Figura 3.4.C). En los tejidos sin daño (S), el contenido de antocianinas monoméricas totales presentó un incremento del 108 % respecto del valor a cosecha (0,39 mg cya-3-gluc g<sup>-1</sup> PF) después de la conservación en frío. Durante la maduración, los tejidos S no mostraron cambios en el contenido de antocianinas, con valores significativamente menores a los tejidos con daño por sol. Los tejidos B presentaron una reducción significativa en el contenido de antocianinas luego de la conservación en frío, descendiendo de 6,6 mg cyanidina-3-glucósido g<sup>-1</sup> PF en cosecha a 5,5 mg cya-3-gluc g<sup>-1</sup> PF en preclimaterio. Dicho valor continuó descendiendo durante la maduración hasta un valor medio de 3,6 mg cya-3-gluc g<sup>-1</sup> PF. Los tejidos con daño L, no presentaron diferencias en el contenido de antocianinas luego de la conservación en frío y maduración a 20 °C respecto de los valores observados en cosecha.



**Figura 3.3. Variación del contenido de pigmentos en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou a cosecha y su evolución durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional (0°C ± 0,5 °C y 95 % HR).** (A) Clorofila Total (mg g<sup>-1</sup> PF); (B) Carotenoides (mg g<sup>-1</sup> PF); (C) Antocianinas monoméricas totales (mg cya-3-gluc.100 g<sup>-1</sup> PF). Los niveles de daño por sol evaluados fueron: sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo; letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre distintos momentos de muestreo para un mismo nivel de daño por sol (DGC; p ≤ 0,05).

El contenido de polifenoles totales fue mayor en los tejidos con daño por sol a cosecha y durante el proceso de maduración de los frutos luego de la conservación en frío respecto de S (Figura 3.4.A). Los tejidos S presentaron un valor promedio de 337,9 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> PF a cosecha, y sin presentar variaciones significativas durante la maduración. Los tejidos L presentaron un comportamiento similar a S, pero con un contenido de polifenoles significativamente superior (790,1 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> PF). Los tejidos B no mostraron diferencias en el contenido total de polifenoles luego de la conservación en frío, sin embargo, se observó una caída significativa durante el climaterio correspondiente a un 15 % del contenido respecto del valor en el preclimaterio (779,2 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> PF).

Los tejidos con daño por sol presentaron valores significativamente mayores en la peroxidación de lípidos a cosecha respecto de S (Figura 3.4.B). Luego de la conservación en frío, todos los tejidos presentaron mayor concentración de MDA en comparación con sus respectivos valores a cosecha, siendo significativas estas diferencias en B y L. Durante la maduración, los tejidos sin daño por sol mostraron un incremento significativo en la peroxidación de lípidos, aumentando de 6,7 nmol MDA g<sup>-1</sup> PF a 13,5 nmol MDA g<sup>-1</sup> PF en postclimaterio. Asimismo, estos valores fueron significativamente inferiores comparados con los tejidos con daño por sol. Contrariamente los tejidos B no mostraron cambios en la peroxidación de lípidos durante la maduración a 20 °C.

En la Figura 3.4.C, se comparó la capacidad antioxidante de los tejidos con distintos niveles de daño por sol desde la cosecha hasta el postclimaterio de los frutos. La capacidad antioxidante de los tejidos evaluados no se modificó significativamente durante el periodo de conservación refrigerada, y mostro leves cambios durante la maduración de los frutos. En los tejidos sin daño por sol hubo un descenso significativo de la capacidad antioxidante entre el climaterio y el postclimaterio, alcanzando un valor promedio final de 14,8 % DPPH. En los tejidos con daño por sol, si bien se observa un leve descenso de la capacidad antioxidante durante el proceso de maduración, estas diferencias no fueron significativas. Los tejidos con daño por sol presentaron valores superiores del porcentaje de inhibición del DPPH respecto de los tejidos sin daño en cosecha y durante la maduración.

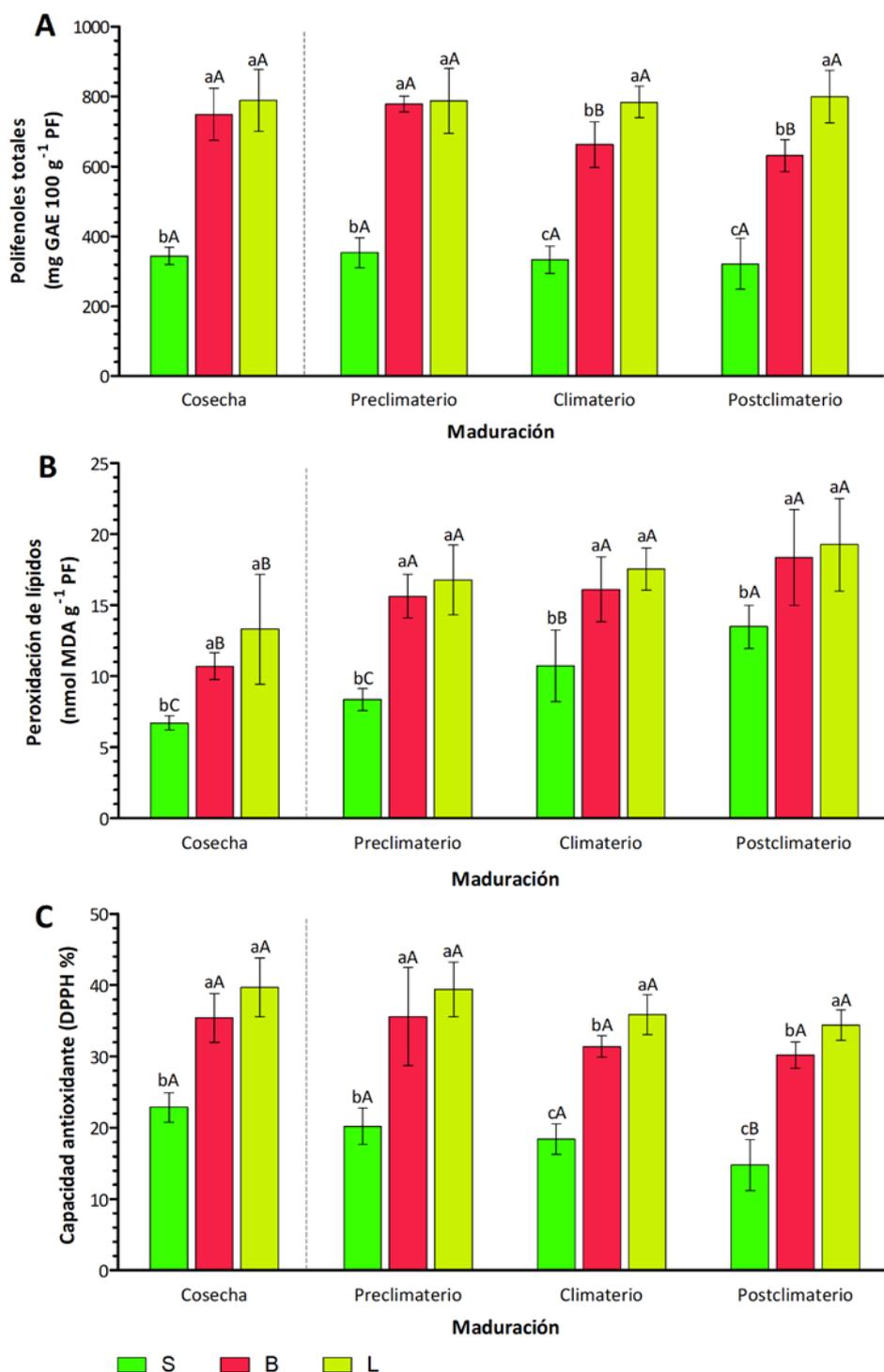
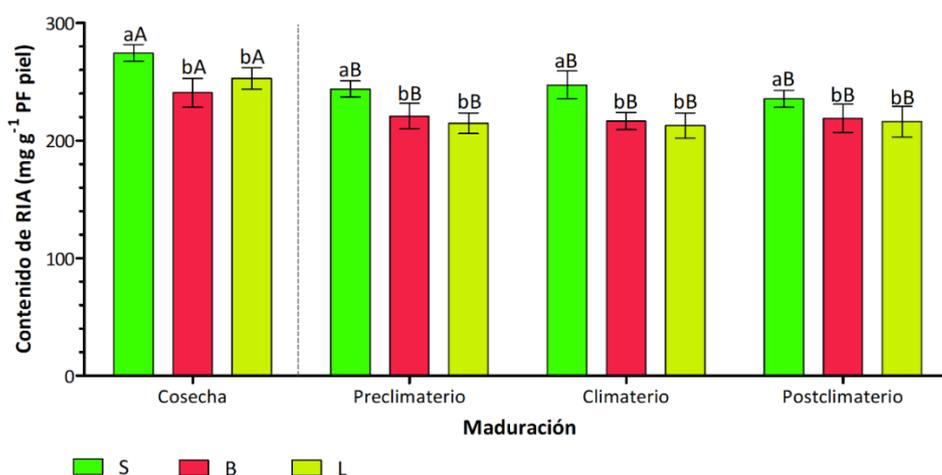


Figura 3.4. Cambios en el estado de oxidación en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou a cosecha y su evolución durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional (0°C ± 0,5 °C y 95 % HR). (A) Polifenoles totales (mg GAE 100 g<sup>-1</sup> PF); (B) Peroxidación de lípidos (nmol MDA g<sup>-1</sup> PF); (C) Capacidad antioxidante (porcentaje de inhibición de DPPH %). Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre distintos momentos de muestreo para un mismo nivel de daño por sol (DGC; p ≤ 0,05).

### 3.3.4. Evolución de los componentes de pared celular durante la maduración

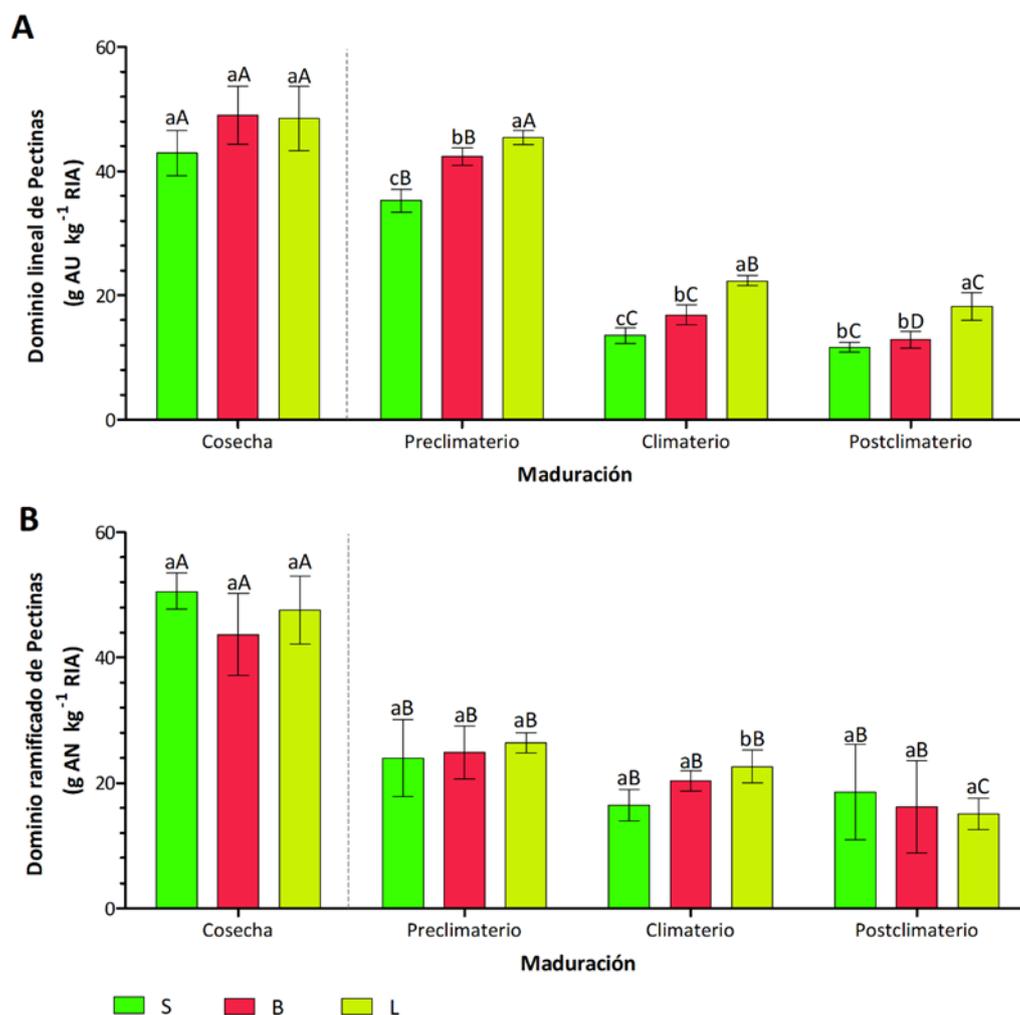
El contenido de RIA fue significativamente menor en los tejidos B y L en comparación a S, en la cosecha, resultado que se mantuvo luego de la conservación y durante la maduración de los frutos (Figura 3.5). Luego de la conservación en frío, hubo una reducción significativa en el contenido de RIA en los tejidos evaluados. Los valores descendieron un 11 % para S, 8 % para B y 15 % para L respecto del contenido de RIA en cosecha. Durante la maduración, no hubo variaciones significativas en el contenido de RIA en los tejidos sin y con daño por sol.



**Figura 3.5. Contenido de RIA en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou a cosecha y su evolución durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional (0°C ± 0,5 °C y 95 % HR).** Los resultados se expresaron en g de residuo insoluble en alcohol (RIA) cada kg de piel. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre distintos momentos de muestreo para un mismo nivel de daño por sol (DGC; p ≤ 0,05).

En las Figuras 3.6 y 3.7 se presentan los cambios en el contenido de los componentes de la pared celular (pectinas, hemicelulosas, celulosa y lignina) en cosecha y durante la maduración de los frutos. Las pectinas son compuestos que se ven seriamente afectados durante el proceso de maduración en las peras. Para un análisis detallado se analizó el comportamiento de los dominios lineales y ramificados de las pectinas totales durante la maduración (Figura 3.6). En la Figura 3.6.A, se observan los cambios en el contenido de los dominios lineales de las pectinas totales, representado por la variación de AU en el RIA. En cosecha, si bien se observa menor contenido de AU en los tejidos S, estadísticamente no hubo diferencias en el contenido de dominios lineales entre los distintos niveles de daño por sol evaluados. Luego de la conservación, se observó una reducción significativa del contenido de AU en los tejidos S y B, no así en los tejidos L. Durante el preclimaterio y climaterio, los tejidos con daño

por sol mantuvieron valores de AU significativamente superiores respecto de S. Durante la maduración de los frutos, y principalmente entre las etapas preclimaterio y climaterio, se produjo un marcado descenso del contenido de AU en todos los tejidos, equivalente a 62 % en S, 60 % en B y 50 % en L.



**Figura 3.6.** Variación del contenido de pectinas en la pared celular en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou a cosecha y su evolución durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional (0°C ± 0,5 °C y 95 % HR). (A) Dominios lineales; (B) Dominios ramificados. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Los resultados se expresaron como g de ácidos urónicos (AU) y g de azúcares neutros (AN) por kg de RIA (residuo insoluble en alcohol) para los dominios lineales y ramificados de pectinas respectivamente. Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre distintos momentos de muestreo para un mismo nivel de daño por sol (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

Los cambios en los dominios ramificados de las pectinas totales se determinaron a partir del contenido de AN (Figura 3.6.B). Se observó una reducción significativa de AN en los tejidos con y sin daño por sol luego de la conservación en

frío, con descensos del 53 % en S, 43 % en B y 45 % en L, comparado con los valores promedio de cada tejido a cosecha. Durante la maduración, el contenido de AN se redujo levemente, sin presentar diferencias significativas entre los diferentes daños por sol y los momentos evaluados, a excepción de los tejidos L, que presentaron un descenso considerable del contenido de AN entre climaterio y postclimaterio.

En la Figura 3.7.A, se presentan las variaciones en el contenido de hemicelulosas durante la maduración de los tejidos con daño por sol. Luego de la conservación en frío, el único tejido que presentó cambios en el contenido de hemicelulosas fue S, con un leve incremento respecto del contenido en cosecha, equivalente a un 12 %. Durante el preclimaterio y climaterio, el contenido de hemicelulosas se mantuvo constante y sin diferencias estadísticas entre los tres niveles de daño por sol. En el postclimaterio los tejidos con daño por sol presentaron una reducción significativa en comparación al tejido S (14 % en B y 15 % en L) y respecto a los valores de éstos en la etapa anterior (19 % en B y 23 % en L). Los valores finales de hemicelulosas fueron de 62,7, 53,6 y 53,9 mg G kg<sup>-1</sup> RIA en los tejidos S, B y L, respectivamente.

Los tejidos evaluados no presentaron diferencias significativas en el contenido de celulosa en cosecha. Este comportamiento se mantuvo en los distintos momentos evaluados de la maduración de los frutos, presentando los tres tipos de tejidos valores estadísticamente similares entre sí (Figura 3.7.B). Respecto a la evolución de este compuesto a lo largo de la maduración, se observó un incremento significativo en el contenido de celulosa en el postclimaterio en los tejidos S, B y L, superior al 20 % respecto de los valores en la etapa climaterio.

Los tejidos con daño de sol mostraron un incremento significativo en el contenido de lignina respecto de tejidos S a cosecha (Figura 3.7.C). El mayor contenido de lignina observado a cosecha en los tejidos con daño por sol respecto de los tejidos sanos se mantuvo durante la maduración de los frutos. Durante el proceso de maduración, se observó un leve pero significativo incremento del contenido de lignina en el tejido B, en la etapa postclimaterio, mientras S y L mantuvieron valores similares a los observados a cosecha.

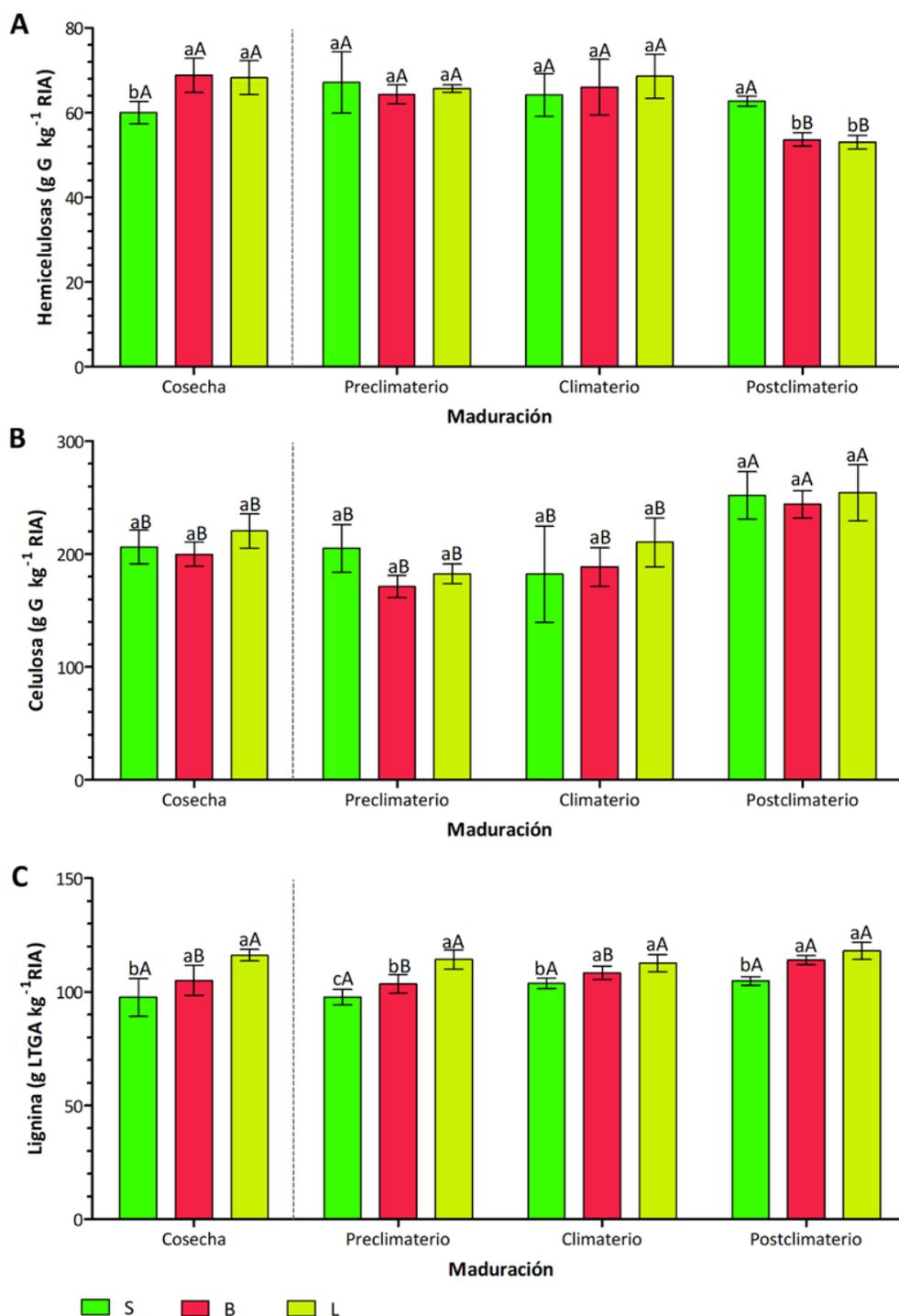


Figura 3.7. Variación del contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina en la pared celular en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou a cosecha y su evolución durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional ( $0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  y 95 % HR). (A) Hemicelulosas; (B) Celulosa; (C) Lignina. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Los resultados de hemicelulosas y celulosa se expresaron como g de glucosa (G) por kg de RIA (residuo insoluble en alcohol). Los resultados de lignina se expresaron como g del complejo LTGA por kg de RIA. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre distintos momentos de muestreo para un mismo nivel de daño por sol (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

Con el fin de profundizar sobre los cambios observados en las pectinas, se analizó la variación de contenido de dominios lineales y ramificados en las distintas fracciones pectínicas: PSA (pectinas solubles en agua), PSE (pectinas solubles en EDTA) y PSH (pectinas solubles en ácido).

En la Figura 3.8, se exponen los cambios de los dominios lineales en las fracciones pectínicas desde la cosecha y durante la maduración de los tejidos con distintos niveles de daño por sol. Al momento de la cosecha, se observaron diferencias en la cantidad de AU presentes en las distintas fracciones de pectinas resultado del daño por sol. Los tejidos con daño por sol presentaron mayor contenido de AU respecto de S en las tres fracciones pectínicas, sin embargo, estas diferencias fueron significativas solo en la fracción PSE. La distribución de AU en las distintas fracciones no se vio afectada por el daño por sol, presentando los tres tipos de tejido mayor cantidad de AU en la fracción PSH, seguida de PSA y en muy baja cantidad en PSE. En los tejidos sanos, hubo un cambio sustancial en la concentración de AU en las fracciones PSA y PSE luego de la conservación en frío. Se observó una reducción significativa del contenido de AU en la fracción PSA (49 % respecto al contenido a cosecha), junto a un incremento altamente significativo del contenido de AU en PSE, de aproximadamente 400 % respecto al contenido a cosecha (Figura 3.8.A-B). La fracción PSH no presentó variaciones luego de la conservación con relación al contenido de AU (Figura 3.8.C). En los tejidos con daño por sol, se observaron modificaciones similares en el contenido de AU luego de la conservación en frío. Los descensos en la fracción PSA fueron de 32 % en B y 39 % en L con incrementos de 329 % en B y 521 % en L en PSE, respecto a los valores en cosecha. En el tejido con *blush* hubo una reducción significativa de AU en la fracción PSH luego de la conservación en frío.

Luego de la conservación en frío, la concentración de AU en las distintas fracciones pectínicas presentó diferencias significativas entre los distintos tejidos evaluados. El contenido de AU en los tejidos dañados fue superior respecto a los tejidos S luego de la conservación en frío. En preclimaterio, los tejidos B y L presentaron un contenido de AU 39 % mayor respecto de los tejidos S en PSA. En las etapas climaterio y postclimaterio, solo el tejido L mantuvo valores superiores y significativos respecto de los tejidos S. En la fracción de pectinas iónicamente unidas (PSE), los tejidos con daño por sol presentaron un mayor contenido de AU respecto de los tejidos S en las tres etapas climáticas evaluadas. En PSH, solo hubo diferencias significativas entre los tejidos sanos y con daño por sol en la etapa preclimaterica, con valores de AU superiores en 11 % para B y 20 % para L, respecto de S (23,8 g AG kg<sup>-1</sup> RIA).

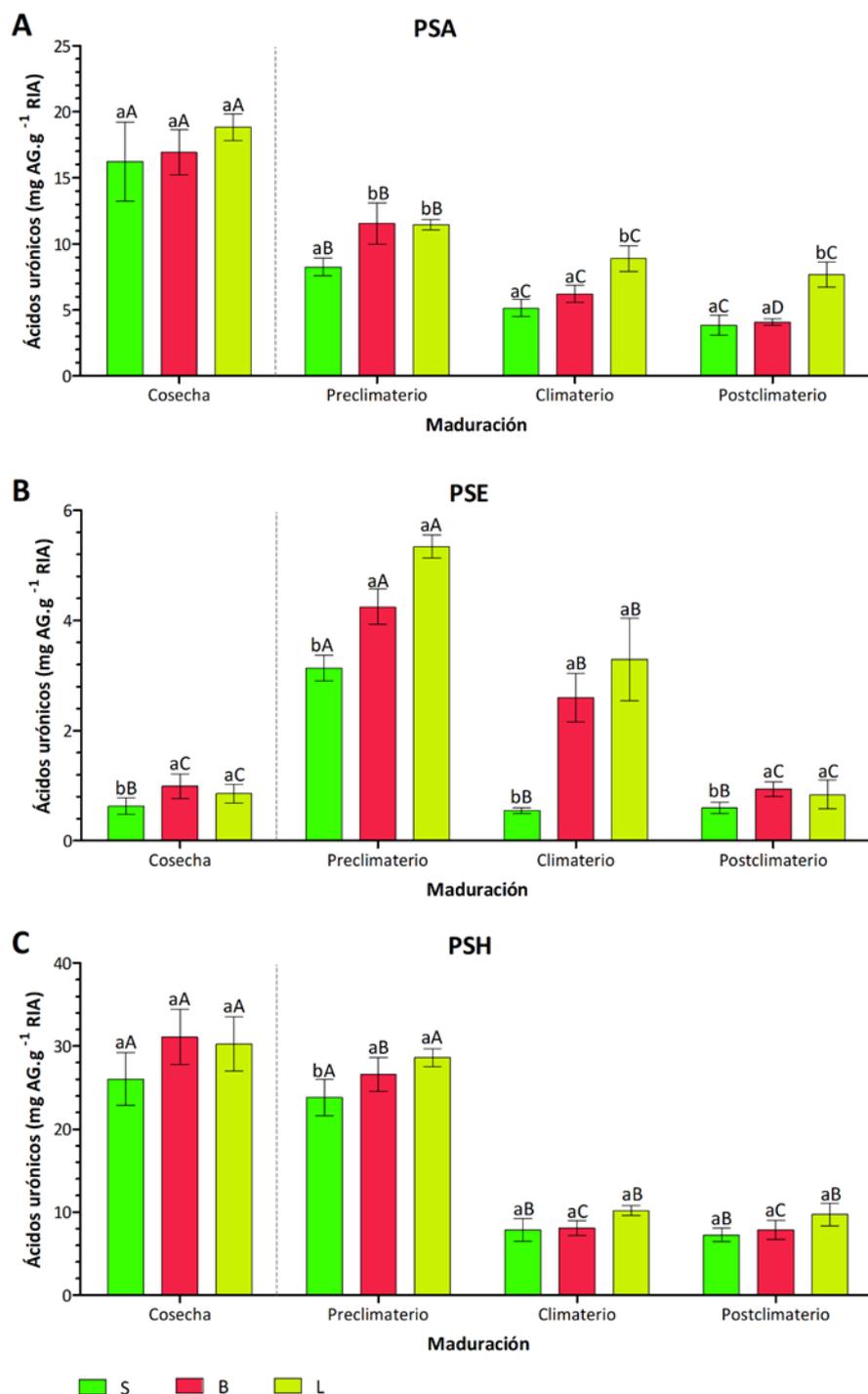
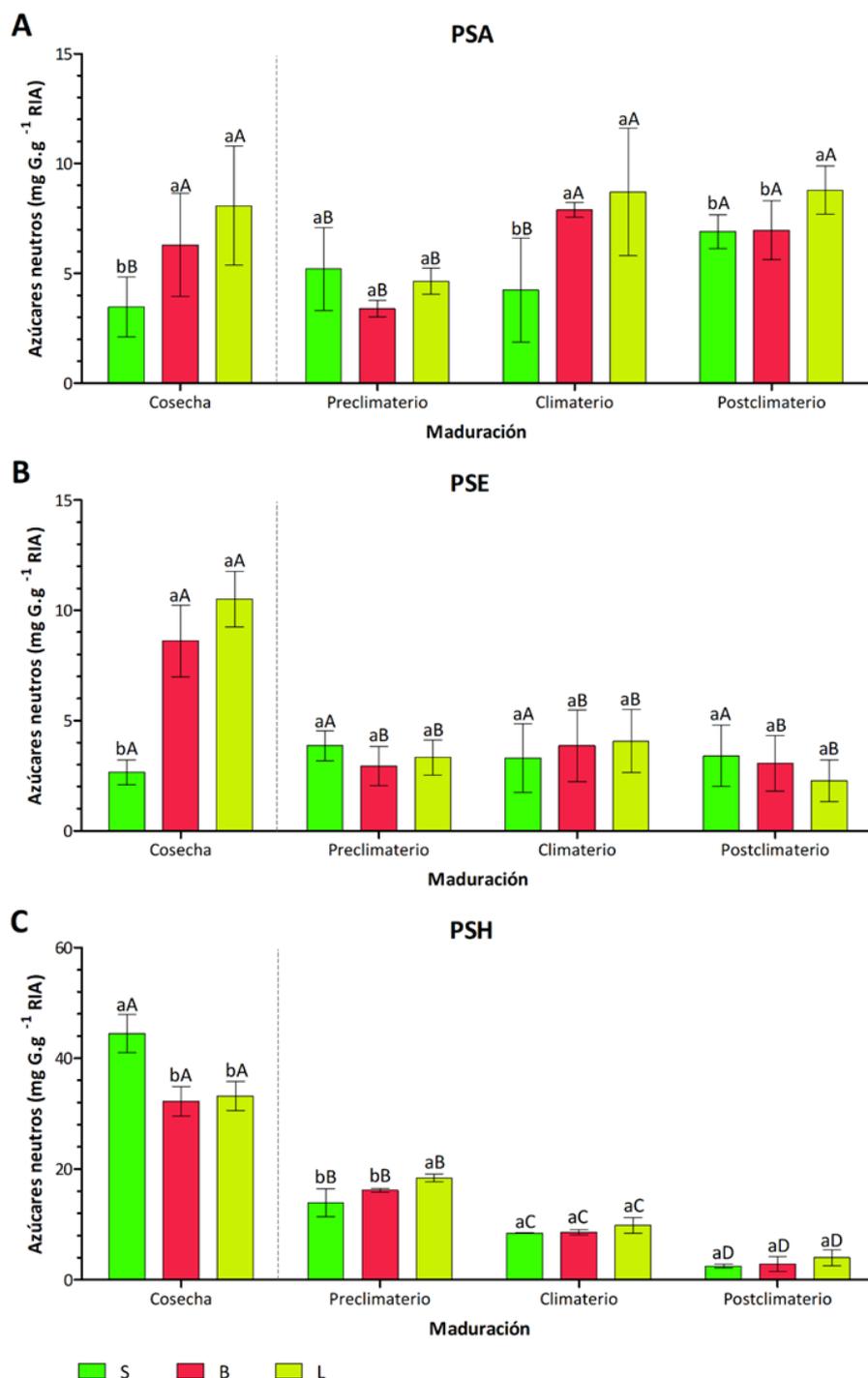


Figura 3.9. Variación del contenido de dominios lineales en las distintas fracciones de pectinas en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou a cosecha y su evolución durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional (0°C ± 0,5 °C y 95 % HR). (A) PSA: Pectinas solubles en agua; (B) PSE: Pectinas solubles en EDTA; (C) PSH: Pectinas solubles en ácido. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Los resultados se expresaron como g de AG (ácidos galacturónicos) por kg de RIA (residuo insoluble en alcohol). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre distintos momentos de muestreo para un mismo nivel de daño por sol (DGC; p ≤ 0,05).

Durante el proceso de maduración, se produce una marcada pérdida de AU en los dominios líneas de las tres fracciones pectínicas en los tejidos sanos y con daño por sol. Los tejidos S presentaron una reducción significativa en el contenido de AU en las tres fracciones pectínicas entre el preclimaterio y climaterio. Mientras, en la etapa final de la maduración, no hubo modificaciones significativas en la cantidad de pectinas lineales presentes en la pared celular de los tejidos sanos. En los tejidos con daño por sol, se observó un comportamiento similar al descrito en los tejidos sano para las fracciones PSA y PSH, con una reducción notoria en el contenido de AU entre el preclimaterio y climaterio. Sin embargo, en PSE, los tejidos con daño por sol presentaron un descenso significativo y continuo del contenido de AU a lo largo de todo el proceso de maduración.

En la Figura 3.10 se presentan los cambios de los dominios ramificados en las fracciones de pectinas durante la maduración de los tejidos con distintos niveles de daño por sol. Al momento de la cosecha, se observan diferencias marcadas en la distribución de los dominios ramificados en las fracciones pectínicas debidas al daño por sol. Los tejidos sanos presentaron un mayor contenido de ramificaciones en la fracción PSH, diferenciándose significativamente de los tejidos B y L. En las fracciones de pectinas más solubles (PSA y PSE), el contenido de AN fue superior en los tejidos con daño por sol respecto a S. Luego de la conservación en frío, los tejidos sanos presentaron cambios significativos en el contenido de AN en las fracciones PSA y PSH. El contenido de AN se redujo en la fracción PSH y se incrementó en PSA. No se observaron modificaciones en el contenido de AN en PSE. En los tejidos con daño por sol, se observó un comportamiento similar a los tejidos sanos en las fracciones PSA y PSH, luego de la conservación. Contrariamente, la alta concentración de AN en la fracción PSE que diferencio a los tejidos con daño por sol de los sanos a cosecha, se redujo significativamente luego de la conservación en frío, hasta valores estadísticamente similares a los observados en S. Esta reducción en los tejidos B y L respecto de los valores a cosecha fue del orden del 66 % y 68 %, respectivamente.

Durante la maduración, los tejidos sanos presentaron una marcada y progresiva pérdida de dominios ramificados en la fracción PSH, con reducciones de 39 % en climaterio y 82 % en postclimaterio respecto del contenido de AN en preclimaterio (Figura 3.9.C). En PSA, se produce un incremento significativo de AN en la etapa postclimaterio, mientras no se observaron modificaciones de AN en la fracción PSE (Figura 3.9.A y B).



**Figura 3.10.** Variación del contenido de dominios ramificados en las distintas fracciones de pectinas en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou a cosecha y su evolución durante la maduración a 20°C luego de haber sido conservados 145 días en cámara de frío convencional (0°C ± 0,5 °C y 95 % HR). (A) PSA: Pectinas solubles en agua; (B) PSE: Pectinas solubles en EDTA; (C) PSH: Pectinas solubles en ácido. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño por sol blush (B) y leve (L). Los resultados se expresaron como g de G (glucosa) por kg de RIA (residuo insoluble en alcohol). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre distintos momentos de muestreo para un mismo nivel de daño por sol (DGC; p ≤ 0,05).

Los tejidos con daño por sol mostraron un patrón de cambios en las pérdidas de cadenas laterales similar al descrito en los tejidos S. En la fracción PSH, hubo un descenso progresivo y significativo del contenido de AN, y las diferencias entre los tejidos sanos y con daño se redujeron hasta alcanzar valores estadísticamente similares en climaterio (Figura 3.10.C). En la fracción PSA, los tejidos con daño presentaron un aumento del contenido de AN en el climaterio, diferenciándose del comportamiento de los tejidos sanos donde este incremento se dio en la última etapa de la maduración. En climaterio, el contenido de AN en la fracción PSA fue superior en B y L respecto de S, mientras en el postclimaterio, los tejidos L se diferenciaron significativamente del resto, con un contenido 27 % mayor respecto de S (Figura 3.10.A). Los valores de AN no variaron durante el proceso de maduración en los tejidos con daño por sol en la fracción PSE, presentando valores medios similares a los tejidos sin daño (Figura 3.10.B). Las diferencias iniciales en el contenido de AN entre los tejidos con y sin daño por sol, se fueron reduciendo durante el proceso de maduración, siendo irrelevantes en la etapa postcosecha.

### **3.4. DISCUSIÓN**

#### **3.4.1. Las diferencias en los índices de calidad en los tejidos con daño por sol se reducen durante la maduración**

La exposición a la luz solar tiene una marcada influencia en la calidad y la maduración de los frutos (McTavish y col., 2020; Serra y col., 2018; Rudell y col., 2017). En las peras, el grado de madurez en el momento de cosecha tiene relación directa con su capacidad de conservación, almacenaje y calidad (Calvo y Colodner, 2022; Blanckenberg y col., 2016). Los efectos de la exposición a la radiación solar en campo sobre la maduración de los frutos son aún poco conocidos, en particular en el caso de peras. Los escasos estudios realizados al respecto en frutos reportan una gran variación de respuestas metabólicas (Woolf y Ferguson, 2000). La pera Anjou pertenece al grupo de peras de invierno, caracterizadas por la necesidad fisiológica de los frutos de cubrir un requerimiento de frío para inducir la producción de etileno y madurar adecuadamente (Villalobos-Acuña y Mitcham, 2008). En particular, esta variedad requiere de periodos prolongados de almacenamiento a bajas temperaturas (2 a 6 meses) luego de su cosecha para madurar adecuadamente y desarrollar texturas mantecosas, fundentes y jugosas (Dong y col., 2018). En este trabajo, la recolección de las muestras se realizó en el momento de autorización oficial de cosecha (SENASA) para la variedad Anjou, y con valores promedios de los índices de madurez adecuados para un periodo de conservación y almacenamiento refrigerado de 4 a 6 meses.

Estudios realizados en esta variedad, luego de una conservación por 150 días en cámara de frío convencional, determinaron que el pico climatérico de los frutos se produce alrededor del día 11 de vida en estante (20 °C), con una producción de etileno

promedio de  $30 \text{ nl g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Calvo, 2016; Chen y Spotts, 2005). Dichos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo (Figura 3.1). Con relación al daño por sol, no se observaron diferencias en el patrón ni en la tasa de producción de etileno entre los frutos con y sin daño. Contrariamente, Serra y col. (2018) observaron que frutos de pera Anjou, desarrollados con mayor exposición a la luz solar y caracterizados por una mejilla rojiza (*blush*), presentaban incrementos significativos en la tasa de producción de etileno luego de 7 días a temperatura ambiente respecto de frutos desarrollados en el interior de la canopia. Estas diferencias podrían ser resultado del tipo de estructura de canopia de los árboles utilizados para los ensayos, estos autores trabajaron con árboles con copas voluminosas, donde los frutos no expuestos se desarrollaron con niveles de intercepción lumínica inferiores a 30 %, mientras en este trabajo se utilizaron árboles en conducción en espaldera, donde se maximiza la intercepción lumínica en toda la planta, logrando que todos los frutos se desarrollen bajo buena calidad lumínica.

Se ha reportado que los frutos con daño por sol presentan un estado avanzado de madurez comparado con frutos sin daño, debido a cambios en los índices de madurez sobre el área afectada y la tasa de producción de etileno. Esto ha determinado un manejo postcosecha diferencial para frutos con daño por sol leve para reducir pérdidas (Morales-Quintana y col., 2020; Zhang y col., 2016; Schrader y col., 2003). Contrariamente, Woolf y col. (1999) observaron que los frutos de palta con daño por sol presentaban una vida postcosecha más larga, una maduración más lenta y no sufrieron daño durante la conservación por frío ni desarrollo de podredumbres. Resultados similares se reportaron en frutos bajo tratamientos térmicos postcosecha, donde se ralentizaron procesos relacionados con la maduración, como la producción de etileno y el ablandamiento (Woolf y Ferguson, 2000; Lurie y col., 1996). Es importante resaltar, que es escasa la información existente en relación con el efecto del daño por sol sobre la evolución del proceso de la maduración en frutos (Musacchi y Serra, 2018).

A cosecha, la firmeza de la pulpa fue mayor en los tejidos con daño por sol respecto de los tejidos sanos, y se redujo progresivamente durante la maduración en ambos casos manteniendo siempre valores superiores en los tejidos B y L (Figura 3.2.A). Estos resultados concuerdan con estudios realizados en pera Bartlett (Raffo, 2013) y en distintas variedades de manzanas (Vita, 2018). Las diferencias de firmeza en la pulpa de los distintos tejidos podrían deberse a modificaciones en la composición y distribución de los componentes de la pared celular en la zona expuesta como sugiere Raffo (2013).

El contenido de sólidos solubles fue mayor en los tejidos con daño por sol a cosecha, y estos valores no se modificaron luego de la conservación y durante la maduración (Figura 3.2.B). Por el contrario, los tejidos sanos presentaron un marcado incremento de sólidos solubles luego de la conservación, sin modificaciones

sustanciales durante la maduración. Resultados similares fueron descritos en pera Abate Fetel y Roche (Dias y col., 2022; Predieri y Gatti, 2009). En peras, el incremento del contenido de azúcares solubles es consecuencia de la hidrólisis de almidón (Dias y col., 2022). Las diferencias observadas entre los tejidos evaluados se corresponden con diferentes periodos de degradación del almidón en los frutos. En los tejidos con daño por sol la degradación se produce durante la exposición a elevada radiación solar y temperaturas presentando a cosecha bajos contenido de este polisacárido, mientras en los frutos sanos el almidón se hidrolizo durante la conservación en frío. Luego de la conservación y durante la maduración, todos los tejidos presentaron valores similares con relación al contenido de azúcares solubles.

En los frutos, los ácidos orgánicos son empleados como fuente de carbono para distintos procesos metabólicos (Rudell y col., 2017). En cosecha, los valores inferiores de acidez en los tejidos con daño por sol podrían sugerir un metabolismo más activo debido a la activación de vías metabólicas para tolerar el estrés por elevada radiación solar y temperatura en comparación con los tejidos sanos. Durante la conservación en frío, los tejidos sanos presentaron una reducción de la acidez, comportamiento reportado en pera Roche (Dias y col., 2022), no así en los tejidos con daño que mantuvieron valores similares a cosecha (Figura 3.2.C). Durante la maduración, el porcentaje de acidez se redujo en todos los tejidos, comportamiento previamente reportado en distintas variedades de peras (Lindo-García y col., 2019; Predieri y Gatti, 2009), resultado del consumo de los ácidos orgánicos como sustratos primarios en la respiración (Dias y col., 2022). Las diferencias iniciales observadas entre los tejidos sanos y con daño en cosecha se reducen y diluyen luego de la conservación y durante la maduración. En manzana, McTavish y col. (2020) concluyeron que no es claro si la reducción de acidez en el área expuesta a la luz solar es evidencia de una madurez acelerada o de un metabolismo aberrante, no obstante, comprobaron que el metabolismo acelerado del ácido málico durante la maduración es un indicador de un estado más avanzado en madurez de los frutos. Durante la maduración, los tejidos con daño por sol no evidenciaron una degradación incrementada del ácido málico comparado a los tejidos sanos, lo que permite sugerir que no habría diferencias en el metabolismo madurativo de los frutos.

Al momento de la cosecha, los tejidos con daño por sol presentaron diferencias notables en los índices de madurez que fueron reduciéndose luego de la conservación y durante la maduración, comportamiento observado en manzanas con distintos niveles de daño por sol (Schrader y col., 2009). Los parámetros para consumo de pera Anjou se asocian con valores de firmeza entre 11 y 15 N, un contenido de sólidos solubles de 14 ° Brix, pH del jugo 4,2 y 2 g/L de acidez titulable (Siddiq y col., 2020; Chen y col., 2003). Estos valores son similares a los observados en el climaterio de los tejidos sin daño por sol y con daño *blush* y leve. Si bien en este trabajo, los valores de acidez en los tejidos con daño por sol fueron inferiores a los recomendados para

consumo, Chen y col. (1983) determinaron que los cambios en acidez titulable y sólidos solubles no se asocian con cambios en la aceptabilidad de la pera Anjou. Por esta razón, se considera importante la implementación de evaluaciones sensoriales para determinar el efecto de daño de sol en frutos de pera sobre la calidad y la percepción del consumidor. En paneles de evaluación sensorial, frutos de manzana con daño por sol presentaron calificaciones más altas en relación con el sabor y aroma, presentado menor acidez y mayor contenido de sólidos solubles que los frutos sanos, pero presentaron mayor rechazo por el aspecto exterior (Racskó y Schrader, 2012). Finalmente, a partir de los resultados obtenidos se puede sugerir que, si bien a cosecha los tejidos presentan diferencias notables en los índices de madurez, los frutos de pera Anjou con daño por sol blush y leve no exponen un avance acelerado del proceso de maduración luego de la conservación en frío y la vida postcosecha en comparación a los frutos sanos.

### **3.4.2. Los tejidos con daño por sol se ven menos afectados por los procesos oxidativos de la maduración**

Los resultados presentados en el Capítulo 1 mostraron claras diferencias bioquímicas y metabólicas en la piel de los tejidos con daño por sol. El daño por sol se caracteriza por promover la decoloración de la piel sobre el área afectada. En frutos de piel verde, como la variedad en estudio, provoca cambios a tonos rojizos, amarillos y/o amarillos-amarronados. Este cambio en el color es resultado de la pérdida de pigmentos fotosintéticos y el desmascaramiento de otros pigmentos presentes como carotenoides, antocianinas y compuestos fenólicos producto de la exposición a elevada radiación solar y temperatura y la respuesta de defensa antioxidante en los tejidos expuestos. Durante la maduración de los frutos, el cambio de color de la piel es un proceso clave para incrementar la aceptabilidad de los consumidores. En la pera Anjou, durante la maduración, se reduce el color verde de la piel como resultado de la degradación de clorofilas a tonos verde amarillentos (Argenta y col., 2003). En los tejidos sanos, hubo una pérdida progresiva del contenido de clorofilas totales durante la conservación en frío y la maduración a temperatura ambiente. Los tejidos con daño por sol presentaron un comportamiento similar respecto a la degradación de clorofilas comparados a los tejidos S (Figura 3.3.A), pero partiendo de valores inferiores debido a la destrucción de clorofilas por el daño lumínico y térmico durante el desarrollo de los frutos en campo (Felicetti y Schrader, 2009a; Merzlyak y col., 2002). Estas diferencias iniciales en el contenido de clorofilas entre los tejidos con y sin daño se mantuvieron durante la maduración.

Con relación a los carotenoides, las diferencias observadas a cosecha entre los tejidos con y sin daño por sol se redujeron y alcanzaron valores similares luego de la conservación en frío (Figura 3.3.B). La reducción de carotenoides en la piel de los frutos de pera durante su conservación pudo deberse a la alta sensibilidad de estos

compuestos a las bajas temperaturas que inhibe su biosíntesis y promueven la degradación al modificar su estructura como se ha reportado en naranjas y bananas (De Vasconcelos Facundo y col., 2015; Van Wyk y col., 2009). Durante la maduración, no hubo diferencias ni cambios en la concentración de carotenoides en los tejidos evaluados, resultados similares fueron reportados en distintas variedades de peras de piel verde (Charoenchongsuk y col., 2018). Los cambios de color en la piel de peras Anjou durante la maduración son resultado principalmente del desenmascaramiento de los carotenoides por la degradación de las clorofilas.

En los tejidos sin daño y con daño por sol leve no hubo cambios en el contenido de antocianinas durante la conservación y maduración (Figura 3.3.C), en coincidencia con datos reportados por (MacLean y col., 2007). En los tejidos con blush hubo un descenso importante de la concentración de antocianinas durante la conservación en frío, que continuó durante la maduración alcanzando valores similares a los observados en los tejidos con daño leve. Las antocianinas son degradadas por distintos mecanismos, incluyendo cambios de pH, vías enzimáticas, oxidación, temperaturas altas (Enaru y col., 2021). El tipo de conservación, a la cual se sometieron los frutos, no supone condiciones que favorezcan la degradación de este pigmento, como se observó en los tejidos sano y leve. Esto destaca la escasa información disponible sobre el comportamiento de frutos con blush durante conservación y postcosecha.

El contenido de polifenoles fue notoriamente superior en los tejidos con daño por sol, coincidente con datos reportados en frutos desarrollados bajo condiciones de mayor radiación solar en peras (Serra y col., 2018; Rudell y col., 2017). Trabajos previos en Anjou no reportaron variaciones en el contenido de polifenoles durante la conservación y maduración (Dong y col., 2018; Calvo, 2016). La concentración de polifenoles depende de factores precosecha, presentando la radiación solar un rol fundamental en la regulación positiva de la biosíntesis de estos compuestos en pera (Rudell y col., 2017). Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, donde no se observaron variaciones del contenido de polifenoles luego de la conservación y maduración de los tejidos, particularmente en S y L (Figura 3.4.A). Los polifenoles son compuestos que contribuyen a la conservación de los frutos al reducir la incidencia de enfermedades fúngicas y aumentar la capacidad de almacenamiento, prolongando la calidad y vida postcosecha de los frutos (Konarska, 2013). Por otro lado, es importante resaltar la participación de estos compuestos en la transición a colores en los frutos con daño por sol, al contribuir en los tonos amarillos amarillentos (Rudell y col., 2017). En consecuencia, la menor concentración de clorofilas y el mayor contenido de pigmentos fenólicos en el área con daño por sol, resaltan tonos amarillos bronceados sobre un fondo verde amarillento. Estos cambios afectan la calidad de los frutos de pera Anjou al generar rechazo en la aceptabilidad de los consumidores por el efecto negativo sobre el aspecto exterior (Racsó y Schrader, 2012).

La maduración es un proceso que implica procesos oxidativos (Airianah y col., 2016). En frutos de pera se comprobó que la maduración se regula inicialmente por estrés oxidativo, lo que promueve la síntesis y auto-catálisis de etileno, regulador de crecimiento necesario para la maduración climatérica (Lindo-García y col., 2019). A cosecha, los frutos con daño por sol presentaban notorio daño oxidativo en la piel, promovido por la exposición a elevada radiación y temperatura, asociado al incremento de la capacidad antioxidante como respuesta defensiva respecto de los tejidos sano (Figura 3.4.B-C). Durante la conservación en frío, los tejidos sanos no presentaron cambios en los parámetros oxidativos evaluados, pero sufrieron una evidente oxidación y pérdida de capacidad antioxidante durante la maduración, en concordancia con resultados documentados en distintas variedades de pera europea (Lindo-García y col., 2019; Dong y col., 2018; Calvo, 2016; Spinardi, 2005). El metabolismo oxidativo de los tejidos dañados presentó un comportamiento diferencial durante su conservación, con un incremento del daño oxidativo en membranas durante la conservación en frío únicamente. Sin embargo, durante la maduración no hubo cambios cuantitativos en el metabolismo oxidativo de los tejidos con daño por sol. Si bien estos tejidos presentaron mayor daño en las membranas, el mayor contenido de antioxidantes y polifenoles pudieron reducir el progreso de daños oxidativos asociados al proceso de maduración, evidente en los tejidos sanos. Este comportamiento respalda la idea que los tejidos que sobreviven a condiciones de estrés sufren adaptaciones en distintos niveles (anatómicos, metabólicos, fisiológicos, génicos) que les da mayor plasticidad para tolerar o resistir otros eventos estresantes (Le Gall y col., 2015; Woolf y Ferguson, 2000).

Estos resultados sugieren que el incremento de la capacidad antioxidante en los tejidos con daño por sol podría reducir el progreso de los procesos oxidativos propios de la maduración. Por otra parte, podría ser positivo en la resistencia a situaciones adversas como la conservación en frío, el desarrollo de fisiopatías y enfermedades fúngicas. Asimismo, el mayor contenido de polifenoles y antocianinas puede ser asociado con un mayor valor nutricional, aspecto que suma a la calidad interna del producto en detrimento de los tonos amarillos-amarronados asociados a estos compuestos y la degradación de clorofilas que afecta el color superficial (Galvis Sánchez y col., 2003).

### **3.4.3. El desmontaje de la pared celular durante la maduración se ve ralentizado en los tejidos con daño por sol**

La pared celular se ve seriamente comprometida durante la maduración de los frutos, su desmontaje y transformación determina cambios en la textura de los tejidos que define la aceptabilidad final del producto. Durante la maduración de las peras, se destaca el proceso de pérdida de cadenas laterales afectando la firmeza y flexibilidad de la pared, cambios que están asociados al desarrollo de texturas fundentes y jugosas

(Brummell, 2006). Junto con la pérdida de ARA y GAL, se produce la solubilización de HG, aumentando la concentración de AU en fracciones de pectinas débilmente unidas a la pared. Los procesos de depolimerización de pectinas y hemicelulosas no son relevantes en el ablandamiento de las peras, así como tampoco la degradación de las microfibrillas de celulosa (Brahem y col., 2017; Song y col., 2016; Raffo, 2013; Murayama y col., 2002; Martin-Cabrejas y col., 1994). En las peras se destacan distintos comportamientos en el ablandamiento de los frutos, como respuesta a diferencias en los patrones de expresión de genes y de actividad enzimática de proteínas remodeladoras de la pared celular. Las peras de ablandamiento rápido se destacan por una temprana y alta actividad de enzimas como PG, GAL, ARF y PME, mientras en peras de ablandamiento lento, como la variedad Anjou, se destaca la actividad de enzimas glicosidasas, como GAL y ARF, que incrementan lentamente su expresión y actividad durante el proceso de maduración (Wei y col., 2015; Eccher Zerbini, 2002; Urzúa Barahona, 2001). La piel (capas celulares superficiales) presenta funciones importantes en la determinación de la calidad de los productos fruti-hortícolas durante su desarrollo, conservación y maduración (Konarska, 2013). En las peras, la composición de la pared celular de la piel se caracteriza por presentar un menor porcentaje de pectinas y mayor contenido de hemicelulosas, celulosa y lignina en comparación con células de la pulpa (Brahem y col., 2017; Raffo, 2013). Durante la maduración, la pared celular de la piel presenta cambios similares a los descritos en la pulpa, pero no tan notorios debido a su menor contenido de pectinas, contribuyendo a la protección del fruto y al mantenimiento de la calidad durante la vida postcosecha (Brahem y col., 2017). La piel de los tejidos con daño por sol presentó menor contenido de RIA comparado con los tejidos sin daño, diferencia que se mantuvo durante el proceso de maduración a temperatura ambiente (Figura 3.5). Luego de la conservación, hubo una reducción del RIA en todos los tejidos evaluados, sin cambios durante la maduración. En frutos de pera Bartlett, Raffo (2013) observó un comportamiento similar, con reducción de RIA entre el momento de cosecha y 13 días después de cosecha, manteniéndose constante en el avance de la madurez. Las pectinas son los componentes de la pared celular más afectados durante la maduración de las peras, asociado con la disolución de la laminilla media y la desintegración gradual de la matriz pectínica (Urzúa Barahona, 2001). En la piel sana de Anjou se observó una caída gradual de los dominios lineales de las pectinas luego de la conservación y durante la maduración. En los tejidos con daño por sol, la disminución del contenido de las pectinas se mostró retrasada comparada con los tejidos sin daño, siendo este efecto más evidente en los frutos con daño por sol leve (Figura 3.6.A). La reducción de la degradación de pectinas ha sido descrita en diferentes frutos sometidos a tratamientos postcosecha térmicos (Lara y col., 2006; Shalom y col., 1993; Klein y col., 1990) y con radiación UV (Santin y col., 2019; Bu y col., 2013; Pombo, 2009). En relación con los dominios ramificados de pectinas totales, se observó una reducción pronunciada luego de la conservación en frío, sin variaciones

durante el avance de la madurez ni diferencias entre los niveles de daño por sol (Figura 3.6.B). La desramificación de las pectinas en peras durante el almacenamiento refrigerado ha sido atribuida a la inducción de enzimas desglucosilantes (Li y col., 2019).

Durante la maduración de frutos de peras, se produce la reducción en el contenido de AU en las fracciones PSE y PSH y el incrementó en PSA (Yoshioka y col., 2019; Song y col., 2016; Eccher Zerbini, 2002). Contrariamente, en la piel de frutos de pera Anjou, se observó un descenso del contenido de AU en todas las fracciones de pectinas de los tejidos evaluados (Figura 3.9). Estas diferencias podrían deberse a la rápida metabolización de las pectinas desprendidas de la pared, no siendo detectadas en la fracción de pectinas solubles en agua (PSA).

Durante la maduración de los frutos, los tejidos con daño por sol presentaron valores más altos de AU en las tres fracciones pectínicas respecto de los tejidos sin daño, diferencias que se fueron atenuando al final del proceso. En particular, los tejidos con daño por sol presentaron un mayor contenido de AU en la fracción PSE (Figura 3.9.B), lo cual podría estar asociado con la participación de PME desmetilando HG e incrementando la posibilidad de formación de enlaces iónicos con calcio en la pared celular (Wu y col., 2018). Esto se relacionaría con una mayor integridad de la matriz y adherencia de la laminilla media resultando en más firmeza y rigidez de los tejidos.

Los cambios en los dominios lineales de las pectinas en la piel sugieren que el proceso de solubilización se ve alterado en los tejidos con daño por sol. El retraso de solubilización de las pectinas podría ser resultado de un acceso limitado de las enzimas hidrolíticas debido al refuerzo de la pared celular, o de cambios en la expresión y actividad de estas enzimas inducidos por el estrés por elevada radiación y temperaturas sufrido en campo.

Con relación a las cadenas laterales, los tejidos con daño por sol presentaron diferencias notorias en la distribución de AN en las distintas fracciones pectínicas a cosecha. En PSH, los tejidos blush y leve presentaron menor contenido de AN en comparación con los tejidos sin daño. Luego de la conservación en frío, hubo una notoria caída del contenido de AN en la fracción de pectinas fuertemente unidas a la pared celular en la piel, en todos los tejidos. Esta reducción fue más relevante en los tejidos sin daño por sol, alcanzando valores similares a los observados en los tejidos con daño por sol, en preclimaterio. Durante la maduración, la pérdida de cadenas laterales en la fracción PSH continuó gradualmente y sin diferencias entre los tejidos con y sin daño por sol. En las fracciones PSE y PSA, el contenido de AN fue mayor en los tejidos con daño por sol a cosecha. Luego de la conservación en frío, hubo una reducción notable del contenido de AN en estos tejidos, mientras no hubo modificaciones en los tejidos sanos. Durante la maduración de los frutos y entre los niveles de daño por sol, no hubo cambios perceptibles en las cadenas laterales en la fracción de pectinas iónicamente unidas (PSE). Probablemente, las diferencias de AN

entre cosecha y preclimaterio en los tejidos con daño por sol, sean resultado de la solubilización de cadenas laterales, provenientes de PSH que quedaron retenidas en PSE durante la remodelación de la pared celular frente al estrés por elevada radiación y temperatura, durante la conservación y al iniciar el proceso de maduración. Con relación a la fracción de pectinas débilmente unidas a la pared celular, el contenido de AN presentó un comportamiento particular comparado con las fracciones anteriores. En el preclimaterio, no se observaron diferencias entre los tejidos S, B y L. Sin embargo, durante el avance de la maduración hubo un aumento apreciable del contenido de AN en los tejidos con daño por sol durante el climaterio, mientras en los tejidos sanos ocurrió durante el postclimaterio. Estas cadenas ramificadas podrían provenir del desprendimiento de fragmentos unidos covalentemente a la pared celular. El cambio de las ramificaciones en la pared de la piel mostró un comportamiento similar a los reportados en pulpa, reafirmando el rol fundamental de la solubilización y depolimerización de los dominios ramificados en el desmontaje de la pared celular en las peras. A su vez, las diferencias en la distribución de AN durante la maduración, sugiere que el proceso de depolimerización de las cadenas laterales se encuentra ligeramente disminuido en los tejidos con daño por sol en comparación con los tejidos sin daño.

Los cambios en el contenido y la distribución de las pectinas en la piel durante la maduración de los frutos de pera coinciden con los descritos por Brahem y col. (2017). En relación con daño por sol, los resultados permiten sugerir que los procesos de solubilización y depolimerización de pectinas se encuentran ralentizados en los tejidos dañados, resultados coincidentes con los reportados por Raffo (2013) en peras Bartlett desarrolladas bajo diferentes condiciones de luz solar. La disminución de estos procesos puede deberse a cambios en la expresión y actividad de enzimas de pared celular tal como se ha observado en tratamientos térmicos y UV postcosecha, y/o debido a un impedimento fisicoquímico que limite el acceso de las enzimas resultado del fortalecimiento y remodelación adaptativa que sufrió la pared celular de la piel de los frutos con daño por sol.

Además de las pectinas, en la pared celular de la piel participan, en mayor proporción que en la pulpa, otros componentes como hemicelulosas, celulosa y lignina. Las diferencias en el contenido de hemicelulosas entre los tejidos con y sin daño a cosecha, no se mantuvieron luego de la conservación. Durante la maduración, el contenido de hemicelulosas se mantuvo estable en los tejidos sin daño, resultado coincidente con datos reportados por Brahem y col. (2017). Los tejidos con daño por sol presentaron valores similares de hemicelulosas a los observados en los tejidos sanos durante el preclimaterio y climaterio, mientras que presentaron un marcado descenso en el postclimaterio. El contenido de celulosa no fue afectado por el daño por sol, ni sufrió alteraciones durante la conservación y maduración (Figura 3.7.B). Si bien se observó un incremento del contenido de celulosa en todos los tejidos en la

etapa postclimática, este cambio probablemente responde a un enriquecimiento de este polímero en el RIA como resultado de la degradación y pérdida de otros componentes de la pared celular como las pectinas. El contenido de lignina en la piel de frutos con daño B y L fue mayor a cosecha en comparación a frutos sanos. No se detectaron cambios en el contenido de este compuesto luego de la conservación en frío. El proceso de maduración no afectó significativamente el metabolismo de la lignina en los tejidos evaluados (Figura 3.7.C).

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que la piel de frutos con daño por sol, no presenta un desmontaje acelerado de los componentes de la pared celular que se asocian a un avance madurativo. Contrario a esto, el efecto de la exposición de frutos a elevada radiación solar y temperaturas que desarrolló síntomas de daño por sol bronceado, tuvo como respuesta defensiva y adaptativa el fortalecimiento de la pared celular de la piel y el cambio de expresión en los genes asociados a su remodelación (Capítulo 1 y 2). Durante el proceso de maduración, la pared celular de la piel de los frutos con daño por sol presentó un desmontaje más lento en comparación con la piel de los frutos sanos, pudiendo esta alteración tener un efecto benéfico en la conservación y vida útil del fruto.

### 3.5. CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en este capítulo no evidencian que el daño por sol leve afecte negativamente el proceso de maduración de los tejidos de frutos de pera Anjou. El daño por sol afectó el color, el contenido de sólidos solubles y la acidez titulable en los frutos, cambios asociados con un estado de madurez más avanzado, pero no hubo diferencias en la tasa de producción de etileno, proceso metabólico directamente relacionado con la maduración en frutos climatéricos. El comportamiento postcosecha de los frutos con daño y sin daño fue similar, presentando valores equivalentes y aceptables en los parámetros de calidad interna en la etapa climática.

La mayor capacidad antioxidante en los frutos con daño por sol, adquirida como respuesta de defensa frente al estrés por alta radiación y temperatura en precosecha, contribuyó a reducir los efectos oxidativos propios de la maduración y senescencia. Los procesos de desmontaje de la pared celular en la piel de los frutos con daño por sol son ralentizados durante la maduración de los frutos. La menor solubilización y depolimerización de las pectinas reduce la pérdida de integridad de la pared celular. Estas modificaciones en el desmontaje de componentes pectínicos tendría un efecto positivo al prolongar la función protectora de la pared e influir directamente en la calidad del fruto.

## **CAPÍTULO 4. Agrupación de los frutos de pera Anjou con daño por sol según la similitud en composición y comportamiento madurativo**

### **4.1. INTRODUCCIÓN**

La determinación del momento de cosecha óptimo, el manejo y destino postcosecha de los frutos se basa exclusivamente en el uso de indicadores de madurez como firmeza de pulpa, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y color de la piel (Mesa Juliani, 2015). La variabilidad en la calidad de los frutos por el efecto de la luz solar, con relación a la intensidad lumínica recibida durante el desarrollo, ha sido descrita por distintos investigadores con resultados contradictorios (Serra y col., 2018; Rudell y col., 2017; Yang y col., 2016; Raffo y col., 2011; Murray y col., 2005; Woolf y col., 1999; Crisosto y col., 1995).

La exposición a la luz solar influye en la calidad externa e interna de la fruta generando variaciones en la composición organoléptica, el color, el comportamiento postcosecha y la susceptibilidad a fisiopatías (Colavita, 2022; Munné-Bosch y Vincent, 2019; Musacchi y Serra, 2018; Vita, 2018). En particular, los frutos que presentan síntomas de daño por sol exhiben cambios notorios en su composición y metabolismo en el área afectada. Estos cambios han sido, en general, atribuidos a un avance en el estado de madurez al considerarse principalmente los cambios en parámetros de madurez (Morales-Quintana y col., 2020; Munné-Bosch y Vincent, 2019). Sin embargo, se ha reportado que el contenido de sólidos solubles y de acidez no son indicadores confiables de madurez en peras (Saquet, 2019; Predieri y Gatti, 2009). Tampoco se ha podido corroborar que los cambios promovidos en la acidez en frutos con daño por sol se deban a la activación de vías metabólicas relacionadas con la maduración (McTavish y col., 2020). Por otro lado, los tejidos con daño por sol presentan incrementos sustanciales en la firmeza de pulpa, modificación que no se relaciona con una madurez avanzada. Se ha propuesto que este aumento de la firmeza de los tejidos con daño por sol es resultado de la disminución de la turgencia celular, la reducción del tamaño celular y/o la modificación de la composición y estructura de la pared celular (Raffo, 2013; Torres y col., 2013; Racskó y col., 2005).

El proceso de maduración de las peras ha sido descrito en un gran número de variedades, asociado a distintos sistemas de conservación o tratamientos postcosecha. Estos estudios han aportado información sobre los patrones de ablandamiento, la expresión de genes y actividad de enzimas asociadas a la maduración permitiendo aplicar distintas tecnologías para lograr una mejor conservación y vida útil del fruto (Lindo-García y col., 2020; Brahem y col., 2017; Yang y col., 2016; Wei y col., 2015; Hiwasa y col., 2004; Murayama y col., 2002). Sin embargo, es importante señalar la escasez de información sobre el comportamiento postcosecha de frutos con daño por sol. Se han priorizado las investigaciones sobre cómo mitigar su efecto en lugar de

profundizar en el estudio de la evolución y comportamiento de frutos con esta fisiopatía durante la conservación (Musacchi y Serra, 2018). Esto ha determinado que los frutos con daño por sol que llegan a los empaques sean clasificados en categorías comerciales inferiores con tiempos de almacenamientos más cortos, o que sean directamente descartados. No se ha tenido en cuenta que estos frutos presentan alteraciones metabólicas que pueden mejorar la calidad nutricional del producto, como el incremento del contenido de metabolitos y enzimas antioxidantes que contribuyen a atenuar procesos oxidativos relacionados con el almacenamiento y la maduración, así como reducir la susceptibilidad a distintas fisiopatías (Lindo-García y col., 2020; Zhao y col., 2016; Spinardi, 2005; Woolf y col., 1999; Yuri, 1998). Asimismo, los tejidos con daño por sol presentan cambios en la composición y estructura de la pared celular como respuesta adaptativa al estrés por sol, modificaciones asociadas con el fortalecimiento de los tejidos, evidenciando una reducción del ablandamiento, menor incidencia de podredumbres en el área afectada y adquisición de termotolerancia (Le Gall y col., 2015; Raffo y col., 2011; Woolf y col., 1999).

Comercialmente y a diferencia de los frutos que presentan daño por sol tipo bronceado, el daño por *blush* no es considerado un desorden fisiológico asociado a la respuesta de elevada radiación y temperatura. Por el contrario, en la variedad Anjou, la presencia del color rojo aumenta el atractivo para el comprador y, por ende, la rentabilidad del cultivo (Peavey y col., 2022; Thomson y col., 2018; Ngo, 2007). La aparición de tonos rojizos en la piel de peras es resultado de la síntesis de antocianinas. Estos compuestos son sintetizados durante etapas tempranas e intermedias del desarrollo del fruto y disminuyendo gradualmente con la maduración (Peavey y col., 2022). La síntesis de antocianinas en peras verdes se estimula con luz y temperaturas hasta 25 °C, superando las tasas de degradación (Steyn y col., 2004a, 2004b). A su vez, estos pigmentos participan en la reducción de la incidencia del daño por sol, como también pueden enmascarar el síntoma promovido por la exposición a elevada radiación solar y temperatura (McClymont y col., 2016).

Durante la clasificación y el proceso de embalaje, los frutos de pera Anjou con piel totalmente verde y con blush se colocan juntos en categorías superiores, con destino de larga conservación y hacia mercados de ultramar, sin considerar el estado de madurez del área con blush como se hace en los frutos con daño por sol bronceado (Trincheró y col., 2004). Mientras, los frutos con daño por sol bronceado son clasificados junto a los frutos maduros en categorías inferiores destinadas a corta conservación y mercados internos (Zhang y col., 2016). En capítulos anteriores se han analizado tejidos con distintos niveles de daño por sol en pera Anjou con relación a parámetros de madurez, metabolismo oxidativo y composición de la pared celular. Los tejidos con blush presentaron un comportamiento intermedio en las variables medidas respecto de los tejidos sin daño y con daño leve, sin poder determinar claramente con cuál presenta mayor similitud. Por esta razón, creemos necesario profundizar en la

identificación y agrupación de distintos niveles de daño por sol según su comportamiento metabólico y madurativo, a través de herramientas metodológicas de análisis multivariado. Esta información podría contribuir en la determinación de manejos adecuados en relación con la clasificación, embalaje, conservación, destino y comercialización de estos frutos.

### **4.1.1. Hipótesis**

Los daños por sol *blush* y leve promueven cambios metabólicos similares en los frutos, alterando su comportamiento madurativo respecto a frutos sin daño por sol.

### **4.1.2. Objetivo específico**

Agrupar los tejidos con distintos niveles de daño por sol según la similitud en características metabólicas y el comportamiento madurativo a cosecha y durante la maduración.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Material vegetal y variables de análisis**

Para el desarrollo de este capítulo se trabajó con los datos obtenidos en el Capítulo 1 y Capítulo 3, para los momentos: cosecha, preclimaterio, climaterio y postclimaterio. El material vegetal utilizado corresponde al descrito en la sección 1.1 y 3.1. de los respectivos capítulos.

### **4.2.2. Medida de variables**

Las variables respuesta utilizadas fueron:

- Índices de madurez/calidad: firmeza de pulpa; sólidos solubles; acidez titulable; degradación de almidón (este parámetro solo se utilizó en frutos a momento de cosecha).
- Metabolismo oxidativo: Contenido relativo de agua; conductividad eléctrica; peroxidación de lípidos; capacidad antioxidante; polifenoles totales; antocianinas monoméricas totales; carotenoides; clorofila A; clorofila B; enzimas antioxidantes APX, SOD, CAT y proteínas solubles totales. En el análisis de madurez no se realizaron determinaciones de enzimas antioxidantes.
- Componentes de pared celular: RIA; almidón; pectinas totales (dominios lineales y ramificados); contenido de AU y AN en fracciones PSA, PSE y PSH; hemicelulosas; celulosa; lignina.

### 4.2.3. Análisis estadísticos

Con el objetivo de establecer diferencias y similitudes entre los distintos niveles de daño por sol asociados con la respuesta a la madurez, el metabolismo oxidativo y la composición de la pared de la piel, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) junto con un Análisis de Conglomerados (AC).

A través del ACP se determinó qué variables contribuyen de manera sustancial a la variabilidad en la respuesta de los tejidos con daño por sol. Este tipo de análisis permite examinar y reducir la dimensión original de datos (número de variables) para sintetizar la información en un menor número de factores que explica gran parte de la variabilidad (Balzarini y col., 2008). La información resumida de ACP, se presenta en un gráfico de dos ejes (componentes principales) con la dirección y magnitud de las variables seleccionadas junto a la dispersión de las muestras.

A partir de la determinación y selección de las variables respuestas que mayor correlación tenían con los componentes principales, se procedió a realizar el AC. La elección de las variables se realizó en función del coeficiente de correlación con las componentes principales CP1 y CP2, utilizándose para el AC aquellas que presentaran valores iguales o superiores a 0,80. Por medio del AC se facilita considerablemente la visualización de relaciones multivariadas de naturaleza compleja y permite identificar categorías cuya similitud es máxima bajo criterios determinados (Balzarini y col., 2008). Las agrupaciones se obtuvieron por el método de encadenamiento de vinculación promedio (Average linkage) con distancia Euclídea. Los resultados se presentaron en forma de dendrograma con un eje horizontal de distancias que representan el valor de similitud para el análisis de las agrupaciones. Para unificar el sistema de agrupación, se definió el valor medio de la distancia máxima que incluye a todos los tejidos en un solo grupo. Este valor consiste en el eje imaginario de corte para la obtención y descripción de los grupos de estudio.

Estos análisis fueron realizados en el programa InfoStat en interferencia con la plataforma R (Di Rienzo y col., 2018).

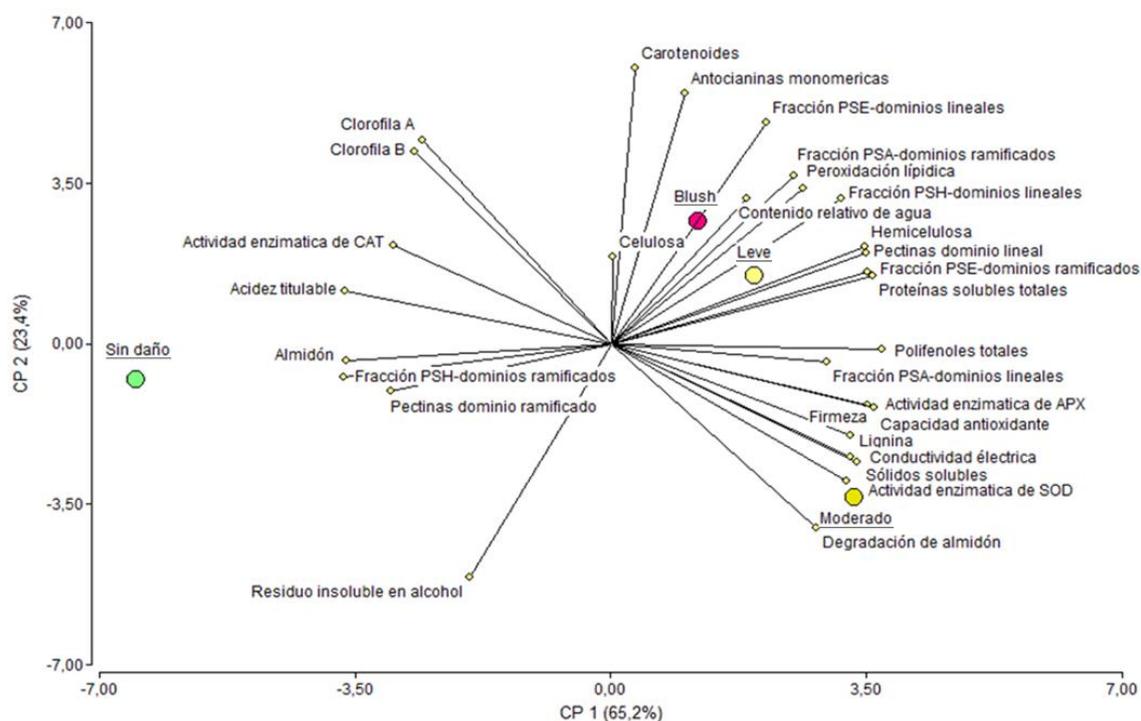
## 4.3. RESULTADOS

### 4.3.1. Análisis multivariado en los tejidos con daño por sol a cosecha

#### 4.3.1.1. Variables respuestas que determinan diferencias entre los tejidos con daño por sol

En la Figura 4.1. se presenta el gráfico de las componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) con la dispersión de las variables respuesta. Entre la CP1 y CP2 se explicó el 88,6 % de la variabilidad de respuesta con relación al metabolismo de los tejidos con

daño por sol. La componente CP1 se relacionó principalmente con los índices de madurez de la pulpa, el metabolismo oxidativo y los componentes de la pared celular de la piel. Mientras, la componente CP2 agrupó variables relacionadas con el color de la piel, como los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores.



**Figura 4.1.** Gráfico de las componentes principales determinadas en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2.

En la Tabla 4.1. se presentan los coeficientes de correlación entre las variables originales y las componentes principales. Valores absolutos altos en los coeficientes de correlación señalan que la variable explica mejor la variabilidad del daño por sol en los tejidos. Las variables repuestas seleccionadas para el AC, que presentan mayor correlación con CP1, fueron: almidón, pectinas totales (dominios ramificados y lineales), dominios lineales de fracción PSH, dominios ramificados en las fracciones PSE y PSH, hemicelulosas, lignina en relación a la composición de la pared celular; firmeza de pulpa, sólidos solubles y acidez titulable en relación a los índices de madurez; y conductividad eléctrica, capacidad antioxidante, polifenoles totales, y actividad enzimática APX, CAT y SOD junto al contenido de proteínas solubles en relación al metabolismo oxidativo. En cambio, en CP2, las variables que aportan más información y que se utilizaron en AC fueron: residuo insoluble en alcohol, antocianinas monoméricas totales y carotenoides.

**Tabla 4.1. Coeficientes de correlaciones de las componentes principales con las variables de respuesta originales.**

Variables de respuesta	CP 1	CP 2
Residuo Insoluble en Alcohol	-0,52	-0,82
Almidón	-0,97	-0,06
Pectinas totales-dominio lineales	0,94	0,32
Pectinas totales-dominios ramificados	-0,81	-0,17
Hemicelulosas	0,94	0,34
Celulosa	0,01	0,31
Lignina	0,89	-0,32
Fracción PSA-dominios lineales	0,79	-0,07
Fracción PSE-dominios lineales	0,58	0,78
Fracción PSH-dominios lineales	0,85	0,51
Fracción PSA-dominios ramificados	0,68	0,59
Fracción PSE-dominios ramificados	0,94	0,25
Fracción PSH-dominios ramificados	-0,99	-0,12
Firmeza	0,95	-0,21
Sólidos solubles	0,91	-0,42
Acidez titulable	-0,98	0,19
Degradación de almidón	0,76	-0,65
Contenido relativo de agua	0,50	0,51
Conductividad eléctrica	0,88	-0,40
Antocianinas monoméricas	0,27	0,88
Polifenoles totales	1,00	-0,02
Capacidad antioxidante	0,97	-0,23
Peroxidación de lípidos	0,71	0,55
Clorofila A	-0,70	0,72
Clorofila B	-0,72	0,68
Carotenoides	0,09	0,97
Actividad enzimática APX	0,97	-0,23
Actividad enzimática CAT	-0,80	0,34
Actividad enzimática SOD	0,87	-0,48
Proteínas totales	0,97	0,24

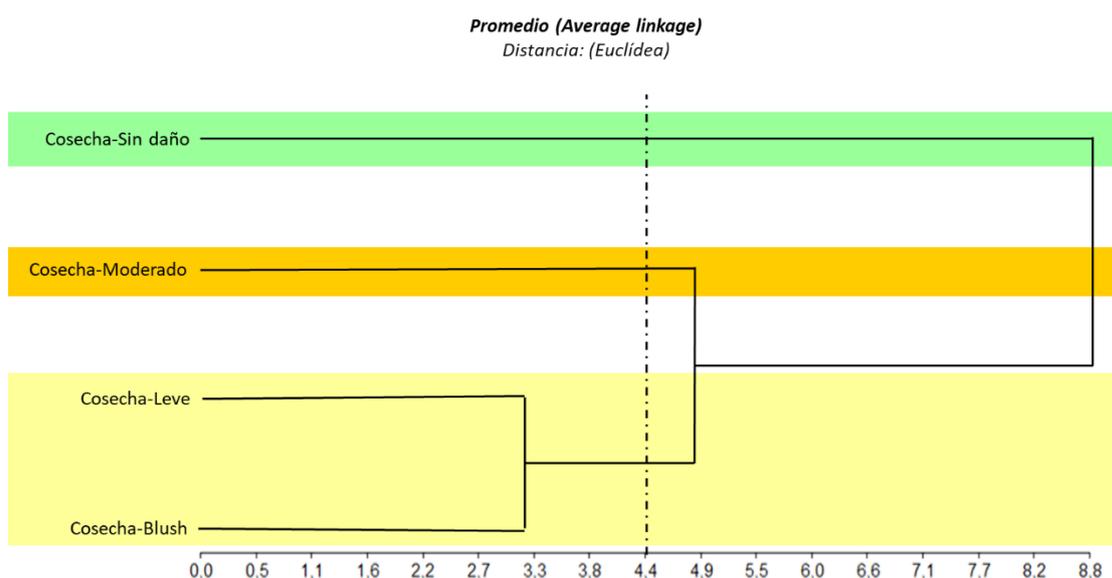
Correlación cofenética= 0,967

#### 4.3.1.2. Agrupamiento de los tejidos con daño por sol en cosecha

El agrupamiento de los distintos niveles de daño por sol se realizó según variables relacionadas al estado de madurez, la respuesta oxidativa y la composición de la pared celular. El valor índice determinado para obtener las agrupaciones de tejido fue el valor medio de la distancia que representa la similitud entre todos los tejidos analizados.

En la Figura 4.2 se observa el eje imaginario de corte en la distancia 4,4 a través del cual se determina la formación de tres grupos de daño por sol en respuesta al estado de los tejidos sometidos a estrés por elevada radiación y temperatura.

El primer grupo corresponde a tejidos sin daño por sol. Los tejidos con daño *blush* y daño leve presentan un comportamiento similar en las variables respuestas, estableciendo el segundo grupo. El tercer grupo corresponde a los tejidos con daño por sol moderado. Si el eje imaginario de corte se plantea a una distancia 5, se observa que los tejidos con daño por sol representan un grupo relativamente homogéneo, pero apreciablemente diferente a los tejidos sin daño por sol.

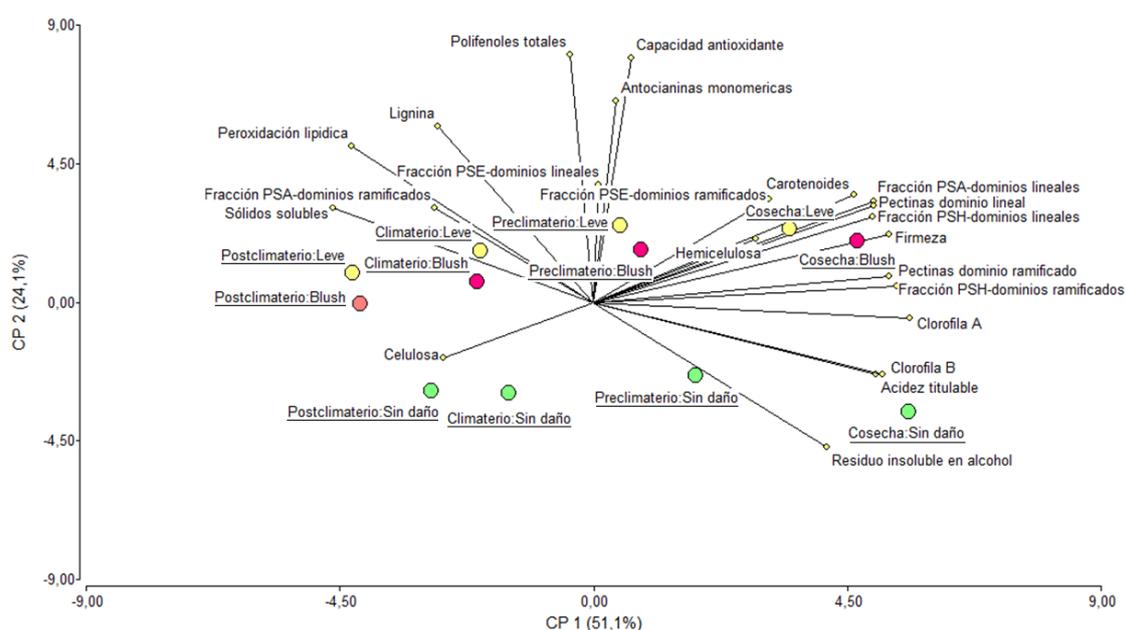


**Figura 4.2.** Agrupamiento de los tejidos por el tipo de daño por sol en frutos de pera Anjou en cosecha por similitud en características relacionadas con la madurez, la respuesta antioxidante y la composición de la pared celular. Método basado en los promedios (Average linkage) y distancia Euclídea. Correlación cofonética: 0,972.

### 4.3.2. Análisis multivariado en los tejidos con daño durante la maduración

#### 4.3.2.1. Variables respuestas que determinan diferencias entre los tejidos con daño por sol durante distintas etapas de la maduración

En el ACP, los componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) explicaron el 75,2 % de la variabilidad de respuesta de los tejidos con distintos niveles de daño por sol durante la maduración (Figura 4.3). La componente CP1 explicó el 51,1 % de la variabilidad y se relacionó principalmente con cambios en la pared celular, la evolución de los parámetros de calidad y el daño oxidativo en los tejidos. Mientras la componente CP2 (24,1 %) se relacionó con la respuesta antioxidante y defensiva de los tejidos



**Figura 4.3. Gráfico de las componentes principales determinadas en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou durante la maduración.** CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2.

En la Tabla 4.2. se presentan los coeficientes de correlación entre las variables originales y las componentes principales. Las variables respuestas seleccionadas para el AC, que presentan mayor correlación con CP1, fueron: pectinas totales-dominios lineales y ramificados, dominios lineales en las fracciones PSA y PSH, dominios ramificados en la fracción PSH en relación con la composición de la pared celular; firmeza de pulpa, sólidos solubles y acidez titulable en relación con los índices de calidad; y clorofila A y B y carotenoides en función al daño oxidativo. Mientras, las variables originales que aportan más información a CP2, fueron: capacidad antioxidante, antocianinas monoméricas y polifenoles totales.

**Tabla 4.2. Coeficientes de correlaciones de las componentes principales con las variables de respuesta originales.**

VARIABLES DE RESPUESTA	CP 1	CP 2
Residuo Insoluble en Alcohol	0,73	-0,57
Pectinas totales-dominios lineales	0,88	0,40
Pectinas totales-dominios ramificados	0,93	0,10
Hemicelulosas	0,51	0,25
Celulosa	-0,47	-0,22
Lignina	-0,49	0,69
Fracción PSA-dominios lineales	0,88	0,38
Fracción PSE-dominios lineales	0,01	0,46
Fracción PSH-dominios lineales	0,87	0,34
Fracción PSA-dominios ramificados	-0,50	0,37
Fracción PSE-dominios ramificados	0,55	0,41
Fracción PSH-dominios ramificados	0,95	0,06
Firmeza	0,93	0,27
Sólidos solubles	-0,81	0,37
Acidez titulable	0,88	-0,28
Antocianinas monoméricas	0,07	0,79
Polifenoles totales	-0,08	0,98
Capacidad antioxidante	0,12	0,96
Peroxidación de lípidos	-0,76	0,61
Clorofila A	0,99	-0,06
Clorofila B	0,91	-0,28
Carotenoides	0,82	0,42

Correlación cofenética= 0,966

#### 4.3.1.2. Agrupamiento de los tejidos con daño por sol en relación con su comportamiento durante la maduración

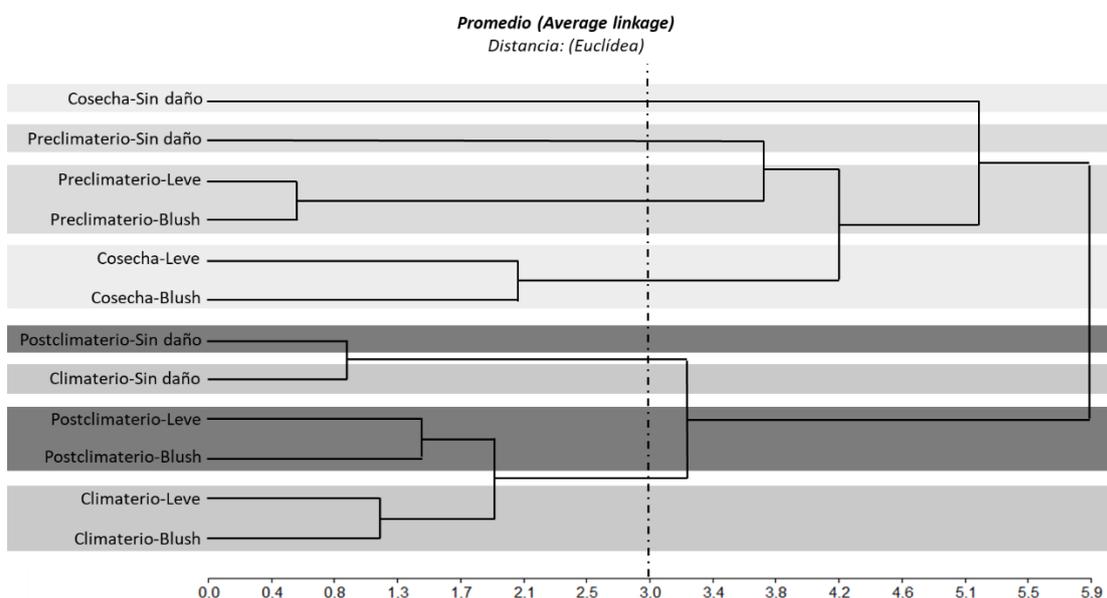
En la Figura 4.4 se presenta el agrupamiento de los tejidos con daño por sol en distintas etapas de su maduración. En el dendrograma, se observa claramente una división en dos grandes grupos que se asocia principalmente con cambios relacionados a la madurez de los tejidos, donde el efecto del daño por sol juega un rol menor. En la distancia de similitud 5,3 la separación de los tejidos muestra una categoría que contempla todos los tejidos en cosecha y preclimaterio, y otra categoría con los tejidos en etapas climaterio y postclimaterio. Los individuos que conforman la primera categoría presentan menor homogeneidad de respuesta comparada con los individuos que se ubican en la segunda categoría.

Al considerar el valor de distancia 3,0 (dato que indica las agrupaciones de tejido como la mitad de la distancia en la cual todos los tejidos se asocian) se observa una subdivisión de los tejidos en seis grupos.

El primer grupo corresponde a tejidos sin daño por sol al momento de cosecha. El segundo grupo corresponde a tejidos sin daño por sol en el preclimaterio luego de la conservación en frío durante 145 días.

El tercer y cuarto grupo corresponde a tejidos con daño por sol en preclimaterio y a cosecha, respectivamente. Ambos grupos abarcan los daños de sol blush y leve, con un comportamiento similar en las variables respuestas. Los tejidos del tercer grupo presentan mayor homogeneidad comparados con los tejidos del cuarto grupo, debido a la menor distancia en la cual se asocian, 0,6 y 2,1, respectivamente.

El quinto y sexto grupo abarca estadios de maduración avanzados (climaterio y postclimaterio) de los tejidos sin daño por sol y con daño por sol (blush y leve), respectivamente. Las distancias de similitud son 0,9 para el quinto grupo y 1,9 en el sexto grupo.



**Figura 4.4. Agrupamiento de los tejidos por el tipo de daño por sol en frutos de pera Anjou durante la maduración por similitud en características relacionadas con la madurez, la respuesta antioxidante y la composición de la pared celular. Método basado en los promedios (Average linkage) y distancia Euclídea. Correlación fonética: 0,749.**

### 4.4. DISCUSIÓN

#### 4.4.1. Los tejidos con daños por sol *blush* y leve presentan un comportamiento metabólico similar en cosecha

Durante el desarrollo del Capítulo 1, se realizó una descripción detallada de la respuesta a un gran número de variables relacionadas al estado de madurez, el metabolismo oxidativo y la composición de la piel de tejidos con distintos niveles de daño por sol. Sin embargo, este análisis no permitió dilucidar claramente similitudes y diferencias entre los tejidos que expliquen o se asocien con posibles comportamientos diferenciales en la postcosecha.

El ACP es una herramienta que permite examinar los datos en un espacio de menor dimensión que el original al agrupar las variables respuestas en distintas componentes que explican un porcentaje de la información total del sistema. En este caso, se optó por describir el comportamiento de los tejidos con daño por sol en base a dos componentes principales (CP1 y CP2) que explicaban el 89 % de la variabilidad de los datos. A su vez, el AC permite maximizar la homogeneidad de similitud y diferencia entre los objetos, clasificándolos en distintas categorías o grupos (Balzarini y col., 2008). Estas herramientas fueron empleadas con el objetivo de agrupar en forma definida los tejidos con distintos niveles de daño por sol en base a similitudes en el valor de las principales variables respuestas, determinadas a partir de las componentes principales, en cosecha.

La caracterización de los tejidos con distintos niveles de daño por sol al momento de cosecha incluyó 30 variables respuesta. A partir del ACP y la definición del valor de aporte mínimo de información para cada variable respuesta de 80 %, nueve variables fueron descartadas para el análisis en AC. Estas variables fueron: celulosa, dominios lineales de las fracciones PSA y PSE, dominios ramificados de la fracción PSA, degradación de almidón, contenido relativo de agua, peroxidación de lípidos, y contenido de clorofilas A y B.

A partir del AC, se obtuvo un dendrograma en el cual se visualizaron tres grupos bien definidos, determinando que las características de los tejidos se diferencian en relación con la incidencia del estrés a elevada radiación solar y temperatura al cual fueron sometidos (Figura 4.2). Esta diferenciación se vinculó con cambios en el metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos, la respuesta de defensa antioxidante y la modificación de la pared celular, discutidas en el Capítulo 1.

El primer grupo corresponde a los tejidos sin daño por sol, caracterizados por presentar menor firmeza de pulpa y sólidos solubles, mayor acidez y contenido de almidón comparados con el resto de los tejidos. Este comportamiento ha sido descrito en frutos de pera Anjou desarrollados en áreas de los árboles con menor exposición a la radiación solar (Serra y col., 2018; Rudell y col., 2017; Zhang y col.,

2016). Asimismo, al ser tejidos que no fueron sometidos a situaciones ambientales desfavorables, no se observan incrementos en los sistemas de defensa antioxidante como sucede en los tejidos que se desarrollan bajo condiciones de elevada radiación solar (Zhao y col., 2016). La composición de la pared celular no presenta modificaciones relacionadas con una respuesta de defensa o adaptativa a condiciones desfavorables (Le Gall y col., 2015), presentando menor concentración de hemicelulosas y ligninas respecto a los tejidos con daño por sol.

El segundo grupo abarca los tejidos con daño de sol blush y leve. Estos presentan un comportamiento similar en la respuesta metabólica adaptativa al estrés por elevada radiación solar, consistente en un aumento de la expresión del sistema de defensa antioxidante y la modificación de la pared celular. Se observa un incremento de la capacidad antioxidante, el contenido de polifenoles y de antocianinas, y de la actividad de enzimas antioxidantes como APX y SOD en comparación con los tejidos sin daño por sol. Modificaciones similares con relación a los metabolitos y enzimas antioxidantes han sido reportados en distintas variedades de manzanas con daño por sol leve (Colavita, 2022; Vita, 2018). Las paredes celulares de los tejidos de esta categoría presentan modificaciones en la distribución de las cadenas laterales en las fracciones pectínicas e incrementos en el contenido de hemicelulosas y lignina. Este tipo de modificaciones se han relacionado con una respuesta adaptativa a condiciones estresantes que permite fortalecer la pared celular y adquirir tolerancia a futuros sucesos desfavorables (Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015). Asimismo, presentan valores similares en los índices de madurez, ligeramente más acentuados en los tejidos leves, que se diferencian notoriamente de los valores promedios de los tejidos sin daño por sol. Estas diferencias en los parámetros de madurez entre los tejidos con y sin daño por sol han sido ampliamente reportadas en distintos productos frutihortícolas (Munné-Bosch y Vincent, 2019).

El tercer grupo se encuentra representado por los tejidos con daño por sol moderado. Este grupo se diferencia particularmente por presentar menor contenido de pigmentos fotoprotectores y fotosintéticos y divergencias más acentuadas en los índices de calidad respecto de los tejidos sin daño, como resultado del mayor grado de severidad del daño por sol sufrido en los tejidos (Schrader y col., 2009).

El efecto de la exposición a diferentes condiciones de radiación solar sobre la composición metabólica en frutos de pera Anjou ha sido observado en distintos trabajos que hacen hincapié en la importancia de determinar manejos diferenciales postcosecha según la ubicación de los frutos en el dosel de las plantas (Serra y col., 2018; Rudell y col., 2017; Zhang y col., 2016). En particular, la aparición de una mejilla ruborizada en esta variedad es una respuesta normal en los frutos que se desarrollan en condiciones de mayor intensidad lumínica (Serra y col., 2018). Asimismo, su presencia suele considerarse una ventaja comercial y su manejo postcosecha suele realizarse en forma conjunta con los frutos de piel verde (Ministerio de Agricultura,

2018). Contrariamente, los frutos que presentan en la piel tonos amarillentos a marrones son clasificados junto con frutos con madurez avanzada y en categorías comerciales inferiores.

Los resultados muestran claramente que los tejidos con daño blush y daño leve presentan características similares y homogéneas en su comportamiento metabólico, diferenciándose considerablemente de los tejidos sin daño por sol. Una diferencia clara y comercial entre los tejidos *blush* y leve corresponde a la coloración de la piel, de tonos rojizos en los primeros y amarillos en los segundos, afectando sensiblemente la respuesta del consumidor en la elección. McClymont y col. (2016) sugirieron que el mayor contenido de antocianinas, pigmento que determina la coloración rojiza en la piel de la cara expuesta de los frutos de peras verdes, podría inicialmente tener un rol importante en reducir o retardar el desarrollo del daño por sol, además de enmascarar niveles de daño por sol leve. Siguiendo esta idea, los tejidos con daño por sol leve presentaron menor contenido de antocianinas respecto a los tejidos con *blush* (Figura 1.5.D del Capítulo 1), lo cual podría ser consecuencia de una degradación parcial de estos pigmentos protectores del daño oxidativo debido a la exposición solar (Li y col., 2008). Mientras, el reducido contenido de antocianinas en los tejidos con daño por sol moderado indicaría que las condiciones en las cuales se desarrollaron estos frutos fueron más severas provocando la degradación total de estos pigmentos y acentuando los tonos amarillos amarronados.

Con relación a la capacidad antioxidante y la composición de la pared celular, las modificaciones observadas en los tejidos con daño blush son similares a los tejidos con daño leve, separándose notoriamente de los tejidos sanos. Estos cambios en las áreas con blush sugieren que los tejidos presentaron una respuesta de adaptación metabólica y estructural frente a las condiciones lumínicas bajo las cuales se desarrollaron (Le Gall y col., 2015; Tenhaken, 2015). Finalmente, los tejidos blush presentan mayor similitud a los tejidos con daño leve en relación con los parámetros de madurez evaluados, lo que sugiere que estos tejidos presentan estado de madurez diferente a los tejidos sanos (Morales-Quintana y col., 2020).

Del análisis de ACP y AC, surge claramente que el daño blush en las peras Anjou es un tipo de síntoma de daño por sol que presenta características y comportamiento metabólico similares al daño por sol leve. Se sugiere que, aunque la tonalidad rojiza aporta calidad visual al fruto, enmascara los síntomas de daño por sol leve asociado a un comportamiento metabólico de tejidos sometidos a estrés por elevada radiación y temperatura.

### **4.4.2. Los tejidos con daño por sol presentan un comportamiento diferencial respecto de los tejidos sanos durante la maduración**

Con el fin de profundizar sobre el comportamiento de los tejidos con daño por sol durante su maduración luego de un período de larga conservación, se realizó un ACP y AC sobre las 22 variables repuestas determinadas en el Capítulo 3 para los tejidos sin daño por sol y con daño por sol *blush* y leve.

El ACP permitió reducir el espacio original a 13 variables, las cuales aportaron el 75 % de información sobre el comportamiento de los tejidos con daño por sol durante la maduración. Las variables no empleadas para el AC fueron: residuo insoluble en alcohol, hemicelulosas, celulosa, lignina, dominios lineales de la fracción PSE, dominios ramificados de las fracciones PSA y PSE, antocianinas y peroxidación de lípidos. A partir del AC, los tejidos se asociaron en seis grupos, en función de la similitud de comportamiento de las variables respuesta (Figura 4.4).

Las variables respuestas que aportaron más información a la explicación del comportamiento de los tejidos con daño por sol durante la maduración se relacionan, por un lado, con cambios en los parámetros de calidad en la pulpa de los frutos, y por otro, con la solubilización de pectinas y pérdida de cadenas laterales en la pared celular. Ello sumado a cambios en la capacidad antioxidante en la piel de los tejidos evaluados.

El primer y segundo grupo están representados por tejidos sin daño por sol en distintos estados de madurez: madurez fisiológica (o momento de cosecha) y preclimaterio (luego de conservación en frío). Estos grupos se diferencian principalmente por una pérdida marcada en el contenido de clorofilas, cambios en la calidad y en el contenido de pectinas. Esto sugiere que, durante la conservación en frío, se producen cambios en los tejidos que limitan o ralentiza, pero no inhiben, los procesos de maduración (Saquet, 2019).

El tercer grupo contiene los tejidos con daño por sol *blush* y leve en cosecha, agrupados por similitud de comportamiento en las variables repuestas como se describió en 4.3.1. Mientras tanto el cuarto grupo se encuentra constituido por los tejidos con daño por sol en el estadio preclimaterio. Nuevamente las diferencias entre estos dos grupos se relacionan con cambios metabólicos asociados a la maduración durante la conservación en frío.

El quinto grupo está representado por tejidos sin daño por sol en madurez avanzada (climaterio y postclimaterio), presentando diferencias marcadas respecto del primer y segundo grupo. Los tejidos pertenecientes a este grupo se caracterizan por presentar valores bajos de firmeza y acidez, mayor contenido de azúcares solubles, pérdida considerable del color verde y degradación de la pared celular. Asimismo, el sexto grupo refleja la misma situación para los tejidos *blush* y leve.

Por otro lado, entre los tejidos con daño por sol y los distintos estadios de madurez, se observan diferencias asociadas al efecto de la elevada radiación solar a la cual fueron sometidos los frutos durante su desarrollo. Estas diferencias se asocian fundamentalmente con la respuesta incrementada del sistema de defensa antioxidante y al retraso en la solubilización de pectinas y pérdida de cadenas laterales en los tejidos estresados.

Estos resultados muestran que, incluso, durante la conservación en frío y la maduración, los tejidos con daño blush presentaron un comportamiento metabólico similar a los tejidos con daño leve, diferenciándose notoriamente de los tejidos sin daño por sol. Además, la distancia de similitud entre los grupos permite sugerir que las diferencias sustanciales observadas entre los tejidos con daño por sol y sin daño durante la cosecha, se reducen durante la maduración en esta variedad de pera. Resultados similares fueron reportados en manzanas con niveles de daño por sol luego de larga conservación en frío (Schrader y col., 2009).

En el Capítulo 3, se observó que todos los tejidos analizados en este trabajo presentaron valores próximos y similares a los parámetros de calidad interna de frutos de pera Anjou apta para consumo durante el pico climatérico. Asimismo, no se observaron diferencias en la producción de etileno asociadas con un estado de maduración distinto entre los tejidos con daño por sol respecto de los tejidos sanos. Estos resultados permiten sugerir que el daño por sol no promovió un avance de la maduración en los tejidos afectados de esta variedad de pera. Situación que se contradice con investigaciones realizadas en Anjou en las que se observaron incrementos en la producción de etileno luego de una larga conservación en frío en frutos expuestos al sol en comparación con frutos sombreados (Serra y col., 2018). Estas diferencias posiblemente se deban a la exposición de los frutos a la luz en las plantas. Serra y col. (2018) compararon frutos que se desarrollaron en intensidades de luz inferiores a 30 % (frutos sombreados) y mayores a 70 % (frutos expuestos), en arboles de canopia densa. En este trabajo se emplearon frutos con distintos niveles de daño por sol de plantas bajo conducción en espaldera con eje central, con una adecuada intercepción y distribución de la luz dentro de la copa (Raffo y Iglesias, 2004).

En etapas intermedias y avanzadas del climaterio, las diferencias asociadas con la caída de firmeza de pulpa y acidez e incrementos de sólidos solubles junto a la pérdida de pigmentos fotosintéticos en la piel entre los tejidos sin y con daño se diluyeron. Este comportamiento se reflejó en el dendrograma con la unión del quinto y sexto grupo a una distancia de similitud de 3,4, asociando tejidos con y sin daño por sol en climaterio y postclimaterio. Esto sugiere que, si bien el efecto del daño por sol promueve alteraciones a nivel metabólico reflejadas en estados de madurez distintos respecto de los tejidos sanos, también influye, directa o indirectamente, en distintas vías metabólicas de la maduración compensando las diferencias iniciales.

Un efecto del daño por sol sobre el proceso de maduración se observa en las diferencias sustanciales de firmeza superiores en la pulpa y menor solubilización y pérdida de cadenas laterales en las pectinas de los tejidos con daño por sol, que sugieren un retraso del ablandamiento en las zonas afectadas respecto de los tejidos sanos. Resultados similares fueron observados en pera var. Bartlett expuesta al sol (Raffo y col., 2011).

Por otro lado, se destaca que los tejidos con daño blush y leve presentan mayor similitud en cambios metabólicos durante la maduración, diferenciándose de los tejidos sin daño. Esto indicaría que, de ser necesario realizar manejos postcosecha diferenciales, sería más adecuado que los frutos con daño por sol leve y blush se traten como una categoría separada de los tejidos sin daño por sol, contrario al manejo que actualmente se lleva a cabo en los empaques de la región del Alto Valle.

### **4.5. CONCLUSIÓN**

El estado y la evolución de los tejidos con daño por sol blush y leve en cosecha y durante la maduración no presentan diferencias sustanciales, mientras que ambos son significativamente distintos a los tejidos sin daño por sol en las primeras etapas de climaterio.

El proceso de maduración de los tejidos con daño por sol blush y leve se ve ralentizado en comparación a los tejidos sanos, reduciendo las diferencias metabólicas preexistentes. En el climaterio, los tejidos con daño y sin daño presentan condiciones aptas y similares para su consumo.

Considerando las diferencias en el estado de madurez, la composición metabólica y la evolución postcosecha que presentaron los tejidos con daño por sol, se recomienda un manejo postcosecha diferencial y conjunto de frutos con daño blush y leve respecto de los frutos sanos para la variedad de pera Anjou.

## **CAPÍTULO 5. Efecto de aplicaciones de calcio por suelo en la incidencia del daño por sol en frutos durante la cosecha y postcosecha**

### **5.1. INTRODUCCIÓN**

El calcio como elemento nutricional juega un papel fundamental tanto en el crecimiento y desarrollo de las plantas como en las respuestas ambientales. Modificaciones transitorias y equilibradas entre el citosol y los reservorios de calcio promueven cambios en la expresión génica que regulan procesos metabólicos específicos, tales como la respuesta defensiva frente a condiciones de estrés (Hocking y col., 2016; Aghdam y col., 2012).

En relación con el estrés por elevada radiación y temperatura, distintos trabajos han reportado que los tratamientos con calcio reducen la incidencia del daño por sol en los montes frutales (Munné-Bosch y Vincent, 2019; Lötze y col., 2018; Bakeer, 2016). Sin embargo, hasta el momento no se ha dilucidado claramente la forma de acción de este elemento como atenuador del daño por sol. Se ha propuesto que el incremento de la tolerancia al daño por sol puede resultar de la participación del calcio en el fortalecimiento de la pared celular y en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular (Munné-Bosch y Vincent, 2019). También se puede mencionar la participación del calcio en el incremento de la capacidad de autodefensa de los frutos, reduciendo la acumulación de EROs y, por lo tanto, mejorando la tolerancia al daño oxidativo (Aghdam y col., 2012). Trabajos en vid y manzana, dieron cuenta de aumentos en el contenido de compuestos fenólicos junto a incremento de la capacidad antioxidante en frutos tratados con calcio (Conde y col., 2016; Bizjak y col., 2013; Awad y de Jager, 2002). La correlación positiva entre el incremento de calcio en los tejidos y el aumento de la capacidad antioxidante podría ser una de las razones por las cuales los frutos tratados presentan menor incidencia de daño por sol.

Por otro lado, el calcio participa en los procesos de maduración de los frutos a través de mecanismos físicos y bioquímicos (Aghdam y col., 2012). Durante la maduración, la disminución de la concentración de calcio fisiológicamente activo promueve la biosíntesis de etileno y la permeabilidad de las membranas. Este hecho sumado a la remoción del calcio de la laminilla media que afecta la integridad de la matriz y facilita el acceso de enzimas hidrolíticas a los componentes de la pared, son procesos fundamentales en la maduración de los frutos (Mengel y Kirkby, 2000). Por consiguiente, la concentración de calcio en los tejidos determina la calidad de los frutos al mantener la firmeza, retardar el ablandamiento, aumentar la tolerancia a condiciones desfavorables, disminuir las pudriciones postcosecha y reducir la incidencia de trastornos fisiológicos (Chéour y col., 2019; Sajid y col., 2019; Robertson, 2013; Sharma y col., 2012; Gerasopoulos y Drogoudi, 2005; Raese y col., 1995; Glenn y

Poovaiah, 1990). Particularmente, Anjou es una variedad de pera que presenta predisposición a desarrollar desórdenes por deficiencia o desequilibrios de calcio con otros nutrientes (nitrógeno, potasio y magnesio), tales como corcho (cork spot), verdeamiento (alfalfa greening) y ápice negro (black end) (Zhang y Cui, 2023; Raese y Drake, 2006; Benítez y col., 2005).

El daño por sol es considerado un defecto de calidad en los frutos asociado con pérdida de color en la piel y otros cambios en los parámetros de madurez debido a un avance madurativo resultado de la exposición a condiciones ambientales desfavorables. Los tratamientos con calcio pre cosecha y post cosecha se han utilizado como un método simple y seguro para aliviar el efecto de estrés abiótico y biótico, y para mejorar la vida útil de los productos frutihortícolas. En este contexto, surge el interés de profundizar en la comprensión del efecto de fertilizaciones tempranas de calcio vía suelo en relación con la incidencia del daño por sol, el metabolismo oxidativo y la composición de la pared celular de los frutos, así como evaluar el comportamiento de frutos con daño por sol leve durante la conservación y maduración.

### **5.1.1. Hipótesis**

El aumento de calcio en la estructura de la pared celular reduce la incidencia del daño por elevada radiación solar y temperatura a cosecha, y mejora la vida post cosecha de frutos con daño por sol leve.

### **5.1.2. Objetivo específico**

Determinar el efecto de fertilizaciones con calcio vía suelo sobre la composición de la pared celular en frutos afectados por estrés por elevada radiación solar y temperatura, y su influencia sobre la vida post cosecha.

## **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.1. Material Vegetal**

Se emplearon frutos de pera Anjou cosechados durante la temporada 2018/2019. Se trabajó con muestras en cosecha y muestras conservadas en cámara de frío convencional durante 145 días. La fruta se recolectó de las unidades observacionales con y sin fertilizaciones de calcio vía suelo (denominadas con calcio y sin calcio, respectivamente) descritas en la sección 1.3.1.1 de Materiales y Métodos. Los tratamientos se identificaron como:

- S-Sin calcio: Frutos sin daño por sol y sin fertilización con calcio.
- S-Con calcio: Frutos sin daño por sol y con fertilización con calcio.

- L-Sin calcio: Frutos con daño leve y sin fertilización con calcio.
- L-Con calcio: Frutos con daño leve y con fertilización con calcio.

### 5.2.2. Medida de variables

El efecto de la fertilización con calcio en relación con el daño por sol y la calidad de los frutos se trabajó en dos etapas. La Etapa 1 consistió en la evaluación del efecto de fertilizaciones con calcio vía suelo sobre la productividad del monte frutal, la incidencia del daño por sol y la calidad de los frutos con relación a madurez, metabolismo oxidativo y composición de la pared de celular, en cosecha. Las determinaciones que se realizaron fueron:

- Carga total, peso y diámetro de frutos.
- Incidencia del daño por sol.
- Índices de madurez (firmeza de pulpa, sólidos solubles, acidez titulable, degradación de almidón).
- Contenido de calcio
- Metabolismo oxidativo (peroxidación de lípidos; capacidad antioxidante; contenido de polifenoles totales; contenido de clorofilas totales, carotenoides y antocianinas).
- Componentes de pared celular (RIA; contenido de almidón; pectinas totales; hemicelulosas; celulosa y lignina; contenido de AU y AN en fracciones de pectinas PSA, PSE, PSH).

En la Etapa 2 (postcosecha), el objetivo fue determinar diferencias en la conservación y maduración de los frutos con y sin daño por sol asociado al efecto de las fertilizaciones con calcio. Los momentos de muestreo durante la maduración se determinaron como se describió en la sección 3.3.1. Las determinaciones realizadas fueron:

- Tasa de producción de etileno.
- Índices de madurez (firmeza de pulpa, sólidos solubles, acidez titulable).
- Metabolismo oxidativo (peroxidación de lípidos; capacidad antioxidante; contenido de polifenoles totales; contenido de clorofilas, carotenoides y antocianinas).
- Componentes de pared celular (RIA; contenido de almidón; pectinas totales; hemicelulosas; celulosa y lignina).

### 5.2.3. Análisis estadístico

En las variables pertenecientes a los grupos de determinaciones productividad, incidencia de daño por sol, índices de madurez, metabolismo oxidativo y componentes

de pared celular, se trabajó con un  $n = 5$ . En la determinación del contenido de calcio en pared celular se empleó un número de muestras igual a 4.

En el análisis estadístico de las variables en ambas etapas se evaluó la interacción del efecto combinado fertilizaciones con calcio y daño por sol.

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. ETAPA 1: COSECHA

##### 5.3.1.1. Efecto del calcio sobre la productividad del monte y la incidencia del daño por sol

Las plantas fertilizadas con calcio no presentaron diferencias significativas en la carga total, peso y diámetro promedio de los frutos en comparación con las plantas sin fertilización con calcio (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1. Carga total, peso y diámetro de los frutos de plantas de pera Anjou bajo distintas fertilizaciones con calcio al momento de cosecha.**

Fertilización	Carga total (frutos/pl)	Peso (g)	Diámetro (mm)
Sin calcio	332 a	145,2 a	65,6 a
Con calcio	325 a	159,6 a	66,1 a
P (Trat.)	0,7604	0,5587	0,5484

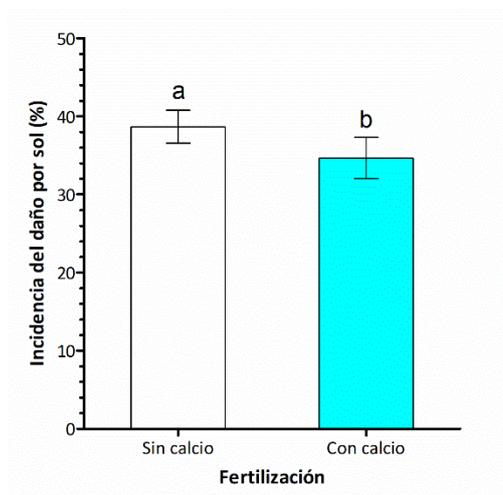
Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los valores indican la media ( $n = 5$ ). Letras distintas para los valores de una misma columna indican diferencias significativas (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

En las plantas bajo tratamiento con calcio se registró menor incidencia de daño por sol respecto a las plantas sin calcio. El porcentaje de frutos afectados por daño de sol fue de 35 % en las parcelas fertilizadas con calcio y de 39 % en las parcelas sin fertilización (Figura 5.1).

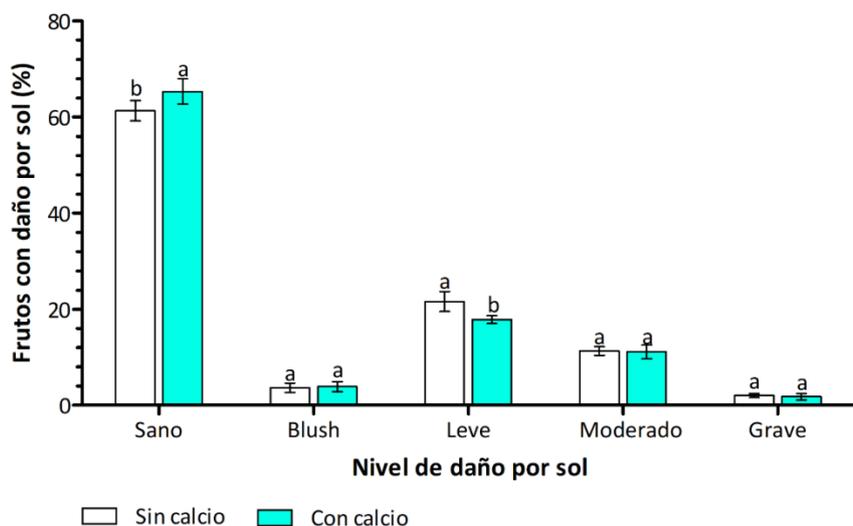
En la Figura 5.2 se presenta la distribución de la carga frutal en las diferentes categorías de daño por sol evaluadas.

Los frutos con síntomas de daño por sol leve fueron los más abundantes en relación con el resto de las categorías, seguida por el nivel de daño por sol moderado con un valor promedio de 11 %. El daño blush tuvo una incidencia menor al 4 % y el daño grave representó sólo el 2 % de la carga frutal total de las plantas en ambos tratamientos. No hubo diferencias en los porcentajes de frutos afectados con daño por sol blush, moderado y grave entre los tratamientos con y sin calcio. El nivel de daño leve presentó menor incidencia en las plantas fertilizadas con calcio, con un valor

promedio de 18 %, respecto a un 22 % de frutos afectados por daño leve en las parcelas sin calcio.



**Figura 5.1. Efecto de fertilizaciones de calcio en la incidencia del daño por sol en frutos de pera Anjou bajo al momento de cosecha.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo (DGC;  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 5.2. Efecto de fertilizaciones de calcio en la severidad del daño por sol en frutos de pera Anjou bajo al momento de cosecha.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los niveles de daño para un mismo momento de muestreo (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 5.3.1.2. Índices de madurez y metabolismo oxidativo de tejidos con daño por sol bajo fertilizaciones con calcio

Se evaluaron los índices de madurez y distintas variables relacionadas con el metabolismo oxidativo en frutos con daño por sol S y L de las parcelas con y sin fertilización cálcica. En la Tabla 5.2 se exponen los resultados de las variables firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles, acidez málica y degradación de almidón. No hubo interacción estadística entre el nivel de daño por sol y las fertilizaciones con calcio para las variables analizadas.

Los resultados mostraron que las fertilizaciones con calcio no tuvieron efecto apreciable sobre los parámetros de madurez evaluados en los frutos. Se observó un leve incremento de la firmeza en los tejidos con calcio, con una diferencia de 1,5 N entre los tejidos S-con calcio y S-sin calcio y de 0,4 N entre los tejidos L-con calcio y L-sin calcio.

Por otro lado, y como se observó en el Capítulo 1, el daño por sol afectó significativamente los parámetros de madurez. Los tejidos L presentaron incremento de la firmeza de pulpa, aumento en el contenido de sólidos solubles, reducción del porcentaje de acidez y un avance en la degradación del almidón respecto de los tejidos S.

**Tabla 5.2. Efecto de fertilizaciones de calcio en los índices de madurez en tejidos con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou al momento de cosecha.**

	Firmeza (N)	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez málica (g/L)	Degradación de almidón (%)
Nivel de daño por sol				
Sano (S)	62,6	12,2	3,7	20
Leve (L)	66,8	14,2	2,2	50
Significancia	*	*	*	*
Fertilización				
Sin calcio	64,2	13,0	3,0	40
Con calcio	65,2	13,1	2,8	30
Significancia	ns	ns	Ns	ns
Interacción				
S-Sin calcio	61,9	12,0	3,7	30
S-Con calcio	63,4	12,4	3,6	20
L-Sin calcio	66,6	14,1	2,3	60
L-Con Calcio	67,0	13,9	2,0	50
Significancia	ns	ns	Ns	ns

Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los valores son las medias (n =5) de los tratamientos (niveles de daño y fertilizaciones) e interacción. (DGC;  $p \leq 0,05$ ), ns: no significativo; \*: significativo.

No hubo interacción del daño por sol y fertilización con calcio en las variables contenido de clorofilas totales y carotenoides. Tampoco hubo efecto fertilización en

estas mismas variables. Mientras que el daño por sol tuvo un efecto estadísticamente significativo en el contenido de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores (Tabla 5.3). El daño por sol afectó considerablemente el contenido de clorofilas totales en los tejidos dañados, con una reducción del 24 % respecto de los tejidos sin daño. El contenido de carotenoides se incrementó un 20 % en los tejidos L respecto de los tejidos S.

**Tabla 5.3. Efecto de fertilizaciones de calcio en el contenido de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores en piel con distintitos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou al momento de cosecha.**

	Clorofila Totales (mg g <sup>-1</sup> PF)	Carotenoides (mg g <sup>-1</sup> PF)
Nivel de daño por sol		
Sano (S)	197,38	36,93
Leve (L)	150,84	44,24
Significancia	*	*
Fertilización		
Sin calcio	177,23	41,24
Con calcio	170,99	39,93
Significancia	ns	ns
Interacción		
S-Sin calcio	200,85	36,68
S-Con calcio	193,92	37,18
L-Sin calcio	153,61	45,80
L-Con Calcio	148,06	42,68
Significancia	ns	ns

Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. PF: peso fresco. Los valores son las medias (n =5) de los tratamientos (niveles de daño y fertilizaciones) e interacción. (DGC; p ≤ 0,05), ns: no significativo; \*: significativo.

En las variables contenido relativo de agua (CRA), pérdida de electrolitos y peroxidación de lípidos (MDA), no hubo interacción entre los factores de estudio (daño por sol x fertilización) y no hubo efecto significativo de las fertilizaciones con calcio (Tabla 5.4). Particularmente en el contenido de MDA, se observó en los tejidos S-con calcio y L-con calcio, un leve descenso comparado con los tejidos sin calcio, sin mostrar diferencias considerables.

Con relación al daño por sol, los tejidos dañados presentaron incremento significativo de la pérdida de electrolitos y peroxidación de lípidos respecto de los tejidos sin daño. El estado hídrico de los tejidos no presentó diferencias respecto a los niveles de daño por sol analizados.

**Tabla 5.4. Efecto de fertilizaciones de calcio en el contenido relativo de agua (CRA), la pérdida de electrolitos y la peroxidación de lípidos en piel con distintivos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou al momento de cosecha.**

	CRA (%)	Pérdida de electrolitos (%)	Peroxidación de lípidos (nmol MDA g <sup>-1</sup> PF)
Nivel de daño por sol			
Sano (S)	87,96	42,06	6,38
Leve (L)	89,04	48,78	12,42
Significancia	ns	*	*
Fertilización			
Sin calcio	87,93	45,26	10,01
Con calcio	89,07	45,58	8,79
Significancia	ns	ns	ns
Interacción			
S-Sin calcio	86,63	41,95	6,70
S-Con calcio	89,28	42,18	6,06
L-Sin calcio	89,22	48,57	13,31
L-Con Calcio	88,86	48,98	11,52
Significancia	ns	ns	ns

Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. CRA: Contenido relativo de agua; MDA: Malondialdehído; PF: Peso fresco. Los valores son las medias (n = 5) de los tratamientos (niveles de daño y fertilizaciones) e interacción. (DGC; p ≤ 0,05), ns: no significativo; \*: significativo.

En el análisis de las variables capacidad antioxidante, contenido de polifenoles totales y de antocianinas monoméricas totales, no se produjo interacción entre el daño por sol y fertilización (Tabla 5.5).

En los tejidos con daño por sol hubo un incremento significativo de la capacidad antioxidante asociado con el aumento del contenido de polifenoles totales respecto de los tejidos S. Se observó un incremento significativo de la capacidad antioxidante en los tejidos de frutos tratados con fertilizaciones de calcio, con un valor promedio de 36,5 % DPPH respecto de un 31,27 % DPPH en los tejidos provenientes de plantas sin tratamiento con calcio. Asimismo, hubo un aumento significativo del contenido de polifenoles totales en los tejidos bajo tratamiento con calcio, equivalente a un 21 % respecto de los tejidos sin tratamiento.

Las antocianinas son pigmentos fotoprotectores. El contenido de antocianinas no se vio afectado por las fertilizaciones con calcio. Sin embargo, el efecto del daño por sol promovió cambios relevantes en la concentración de estos pigmentos. Los tejidos L presentaron un incremento superior al 400 % en el contenido de antocianinas monoméricas totales respecto de los tejidos S.

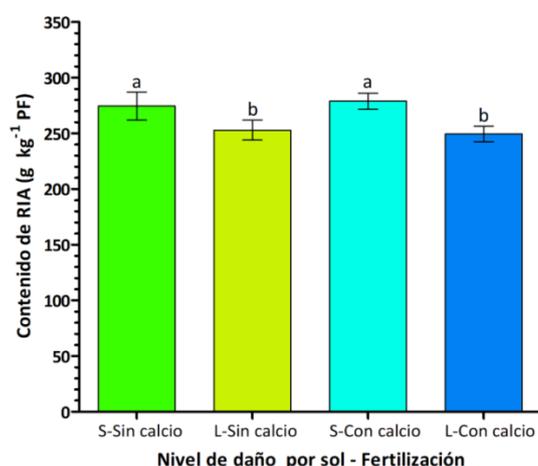
**Tabla 5.5. Efecto de fertilizaciones de calcio en la capacidad antioxidante, el contenido de polifenoles y antocianinas en piel con distintitos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou al momento de cosecha.**

	Capacidad antioxidante (DPPH %)	Polifenoles totales (mg GAE 100g <sup>-1</sup> PF)	Antocianinas monoméricas totales (mg cyn-3-gluc 100 g <sup>-1</sup> PF)
Nivel de daño por sol			
Sano (S)	26,69	411,72	0,44
Leve (L)	41,08	840,43	2,46
Significancia	*	*	*
Fertilización			
Sin calcio	31,27	566,58	1,56
Con calcio	36,50	685,57	1,34
Significancia	*	*	ns
Interacción			
S-Sin calcio	22,84	344,04	0,39
S-Con calcio	30,54	479,40	0,49
L-Sin calcio	39,70	789,12	2,72
L-Con Calcio	42,46	891,74	2,20
Significancia	ns	ns	ns

Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. DPPH: 2,2-difenil-2-picrilhidrazil; GAE: Ácido gálico equivalente; PF: Peso fresco; cyn-3-glu: Cianidina-3-glucósido. Los valores son las medias (n = 5) de los tratamientos (niveles de daño y fertilizaciones) e interacción. (DGC; p ≤ 0,05), ns: no significativo; \*: significativo.

### 5.3.1.3. Composición de la pared celular de la piel de tejidos con daño por sol y fertilizados con calcio en precosecha

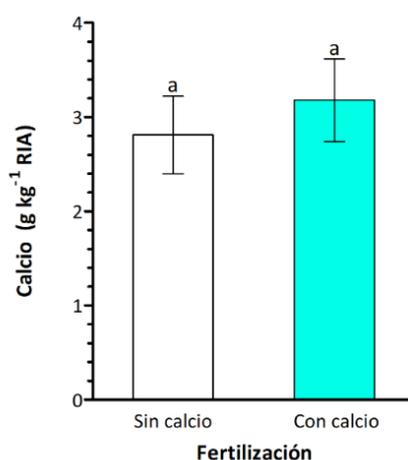
En la Figura 5.3 se presentan los valores medios del contenido de RIA en la piel de frutos de pera Anjou con daño por sol y con diferentes tratamientos de fertilización con calcio.



**Figura 5.3. Contenido de RIA en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio al momento de cosecha.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. RIA: Residuo insoluble en alcohol; PF: Peso fresco. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (DGC; p ≤ 0,05).

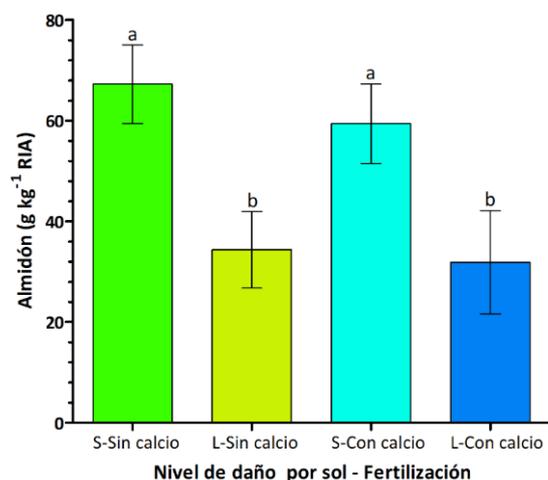
No hubo efecto interacción entre nivel de daño por sol y fertilización ( $p = 0,3420$ ). La fertilización con calcio no afectó el contenido de RIA en la piel de los frutos respecto de los tejidos no fertilizados ( $p = 0,8995$ ). En cambio, el daño por sol redujo significativamente el contenido de RIA en los tejidos L en comparación a los tejidos S.

El contenido de calcio se determinó únicamente en el RIA de los tejidos sanos con y sin calcio. El valor de calcio fijado en la pared celular mostró un incremento del 13 % en los tejidos de frutos obtenidos de las parcelas tratadas con fertilizaciones cálcicas respecto de los tejidos de las parcelas sin calcio ( $2,81 \text{ mg g}^{-1} \text{ RIA}$ ) sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Figura 5.4).



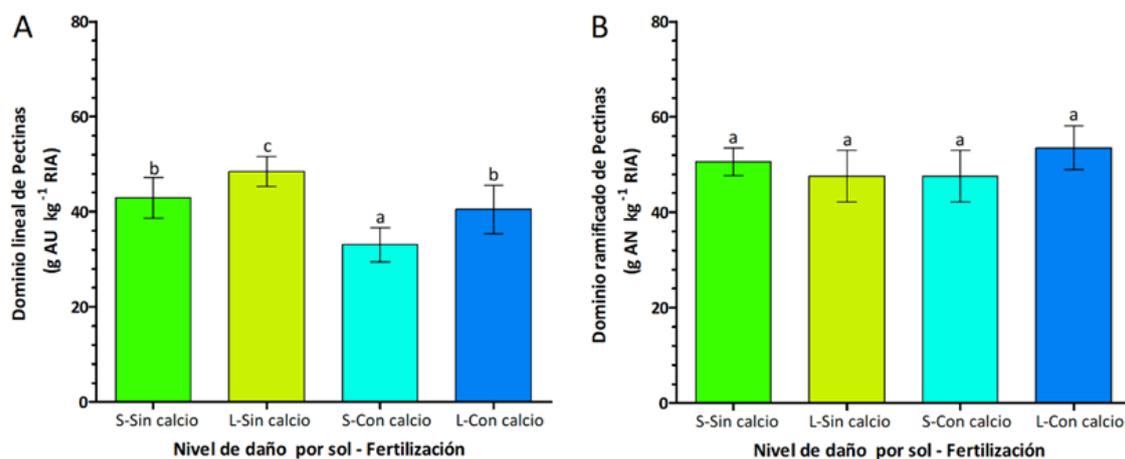
**Figura 5.4. Contenido de calcio en la pared celular de piel de pera Anjou con diferentes fertilizaciones con calcio al momento de cosecha.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . RIA: Residuo insoluble en alcohol. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 4$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

No hubo efecto interacción entre el nivel de daño por sol y los tratamientos con fertilizaciones de calcio en la variable contenido de almidón ( $p = 0,4858$ ), así como tampoco hubo efecto de las fertilizaciones con calcio ( $p = 0,1924$ ). El contenido de almidón en la pared celular de piel de los frutos se redujo significativamente en relación con el daño por sol (Figura 5.5). El descenso del contenido de almidón en los tejidos L superó el 45 % respecto de los tejidos S.



**Figura 5.5. Contenido de almidón en la pared celular de piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio al momento de cosecha.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. RIA: Residuo insoluble en alcohol. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (DGC; p ≤ 0,05).

En la Figura 5.6 se presenta la variación del contenido de pectinas totales en la pared celular de la piel de frutos de pera con relación al nivel de daño por sol y las fertilizaciones con calcio.

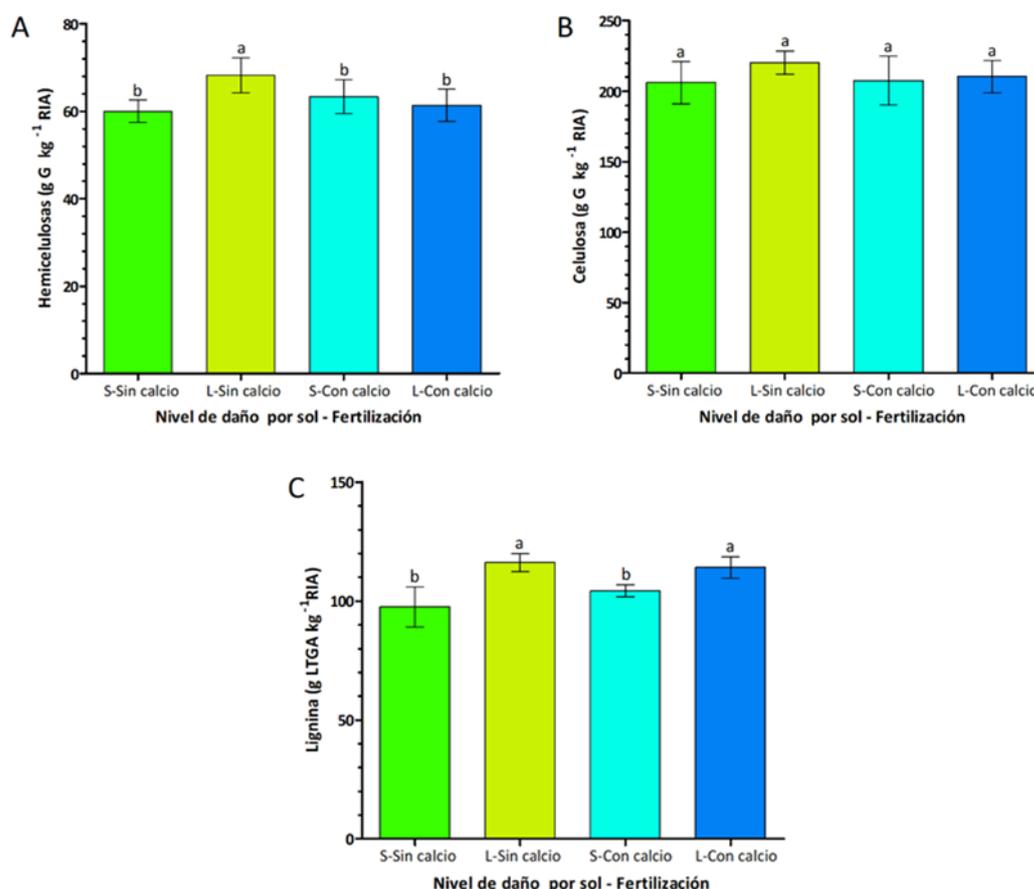


**Figura 5.6. Variación del contenido de pectinas totales en la pared celular de piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio al momento de cosecha.** (A) Dominios lineales de pectinas totales representados por el contenido de ácidos urónicos (AU). (B) Dominios ramificados de pectinas totales representados por el contenido de azúcares neutros (AN). Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). RIA: Residuo insoluble en alcohol. Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (DGC; p ≤ 0,05).

Respecto a la variación del contenido de AU en los dominios lineales de las pectinas totales, no hubo efecto interacción daño por sol y fertilizaciones ( $p = 0,6099$ ). Los tejidos con fertilizaciones de calcio presentaron menor contenido de AU respecto de los tejidos sin calcio, con un 23 % menos en los tejidos S-con calcio respecto a S-sin calcio y 16 % en los tejidos L-con calcio respecto de L-sin calcio. Por otro lado, los tejidos con daño por sol mostraron mayor contenido de AU en comparación a los tejidos sanos, con un 13 % más en los tejidos L respecto a S (Figura 5.6.A).

No hubo efecto de interacción daño por sol y fertilizaciones ( $p = 0,1739$ ), fertilizaciones con calcio ( $p = 0,1739$ ) ni daño por sol ( $p = 0,0924$ ) con relación al contenido de AN en las pectinas totales de la pared celular de la piel de los frutos evaluados (Figura 5.6.B).

En la Figura 5.7 representa el efecto del daño por sol y la fertilización con calcio sobre el contenido de hemicelulosas, celulosa y lignina en la pared de la piel.



**Figura 5.7. Variación del contenido de hemicelulosas (A), celulosa (B) y lignina (C) en la pared celular de piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio al momento de cosecha.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). RIA: residuo insoluble en alcohol; G: glucosa. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (DGC;  $p < 0,05$ ).

Para la variable contenido de hemicelulosas, hubo interacción daño por sol y fertilización (Figura 5.7.A). El contenido de hemicelulosas en los tejidos S-con calcio y L-con calcio presentó valores estadísticamente iguales respecto de los tejidos S-sin calcio. Los tejidos L-sin calcio presentaron un incremento en el contenido de este polisacárido diferenciándose significativamente del resto de los tejidos.

El contenido de celulosa (Figura 5.7.B) en la pared celular de la piel no se vio afectado por el efecto del daño por sol, fertilizaciones realizadas o interacción de ambos factores ( $p = 0,1812, 0,4968$  y  $0,3608$ , respectivamente).

El contenido de lignina en los tejidos fue alterado por el efecto del daño por sol ( $p < 0,0001$ ), no hubo efecto interacción de factores ( $p = 0,0905$ ) ni de fertilización con calcio ( $p = 0,3451$ ). Los tejidos L presentaron un aumento significativo del contenido de lignina en la pared celular respecto de los tejidos S (Figura 5.7.C).

En la Tabla 5.7 se presenta un análisis complementario del contenido de los dominios lineales y ramificados a partir del fraccionamiento de las pectinas en PSA, PSE y PSH. En relación con el contenido de AU, no hubo interacción de los factores daño por sol y fertilización en las fracciones PSA, PSE y PSH ( $p = 0,6771, 0,8363$  y  $0,9287$ , respectivamente).

En la fracción PSE no hubo efecto de las fertilizaciones de calcio respecto al contenido de AU. Mientras en las fracciones PSA y PSH, los tejidos con calcio presentaron una reducción significativa del contenido de AU equivalente a un 29 % y 16 % respecto de los tejidos sin calcio. Los tejidos con daño por sol presentaron un incremento del contenido de AU en las tres fracciones respecto a los tejidos sin daño por sol, con valores de 22 %, 23 % y 17 % en PSA, PSE y PSH.

Hubo interacción entre el efecto por daño por sol y fertilización en las fracciones de pectinas PSA, PSE y PSH con relación a la variable contenido de AN ( $p = 0,0122, 0,0011$  y  $0,0052$ , respectivamente). Los tejidos L-sin calcio presentaron cambios considerables en el contenido de AN respecto del resto de los tratamientos. Se observó una reducción del 25 % de AN en PSH y un aumento del 132 % en PSA en los tejidos L-sin calcio respecto de los tejidos S-sin calcio, diferenciándose significativamente.

En la fracción PSE, el contenido de AN fue similar entre los tejidos S-con calcio y S-sin calcio (1,83 y 2,66 g AN kg<sup>-1</sup> RIA, respectivamente). Los tejidos con daño leve presentaron un incremento marcado del contenido de AN en la fracción PSE respecto de los tejidos sano, y se diferenciaron entre si respecto del tratamiento con fertilización. El tejido L-sin calcio presentó un valor de 10,51 g AN kg<sup>-1</sup> RIA y L-con calcio de 6,03 g AN kg<sup>-1</sup> RIA.

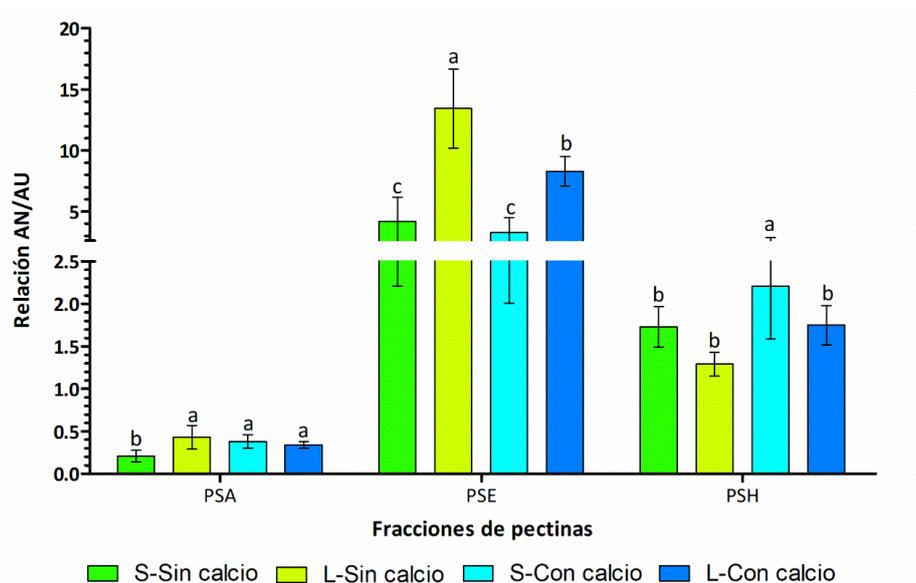
**Tabla 5.7. Variación del contenido dominios lineales y ramificados en las fracciones de pectinas solubles en agua (PSA), solubles en EDTA (PSE) y solubles en ácido (PSH) en la pared celular de piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio al momento de cosecha.**

	Dominios lineales (g AU kg <sup>-1</sup> RIA)			Dominios ramificados (g AN kg <sup>-1</sup> RIA)		
	PSA	PSE	PSH	PSA	PSE	PSH
<b>Niveles de daño por sol</b>						
Sano (S)	13,45	0,64	23,92	3,74	2,25	44,96
Leve (L)	16,43	0,79	28,00	6,40	8,27	39,00
Significancia	*	*	*			
<b>Fertilización</b>						
Sin calcio	17,51	0,79	28,14	5,78	6,58	38,85
Con calcio	12,37	0,65	23,77	4,36	3,58	45,11
Significancia	*	ns	*			
<b>Interacción</b>						
S-Sin calcio	16,20	0,72	26,02	3,48 b	2,66 c	44,47 a
S-Con calcio	10,70	0,56	21,81	4,00 b	1,83 c	45,46 a
L-Sin calcio	18,82	0,86	30,27	8,08 a	10,51 a	33,23 b
L-Con calcio	14,03	0,73	25,74	4,72 b	6,03 b	45,77 a
Significancia	ns	ns	ns	*	*	*

Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. AU: Ácidos urónicos; AN: Azúcares neutros; RIA: Residuo insoluble en alcohol. Los valores son las medias (n = 5) de los tratamientos (niveles de daño y fertilizaciones) e interacción. (DGC; p ≤ 0,05), ns: no significativo; \*: significativo. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre las interacciones.

La relación AN/AU (Figura 5.8) permite analizar la proporcionalidad de cadenas laterales ramificadas por cadenas de pectinas lineales (HG) en las pectinas. En los tejidos con daño por sol se observó cambios significativos en la proporcionalidad de AN/AU en las fracciones PSA y PSE con relación a los tejidos sanos. Los tejidos dañados presentaron valores superiores de AN/AU respecto de sanos. Los tejidos tratados con calcio presentaron comportamientos diferentes en las distintas fracciones pectínicas en comparación con los tejidos S-sin calcio. En la fracción PSA, los tejidos con calcio con o sin daño presentaron mayor proporción AN/AU respecto de S-sin calcio. Mientras en la fracción PSE, los cambios en las proporciones de AN/AU respondieron al efecto del daño de sol. Los tejidos sanos con y sin calcio presentaron valores estadísticamente similares en la relación AN/AU, y significativamente menores a los tejidos L-sin calcio y L-con calcio. Entre los tejidos con daño por sol, L-con calcio presento menor proporción AN/AU respecto de L-sin calcio.

En la fracción PSH, los tejidos S-con calcio presentaron valores superiores de AN/AU respecto al resto de los tejidos, los cuales no se diferenciaron estadísticamente entre si.



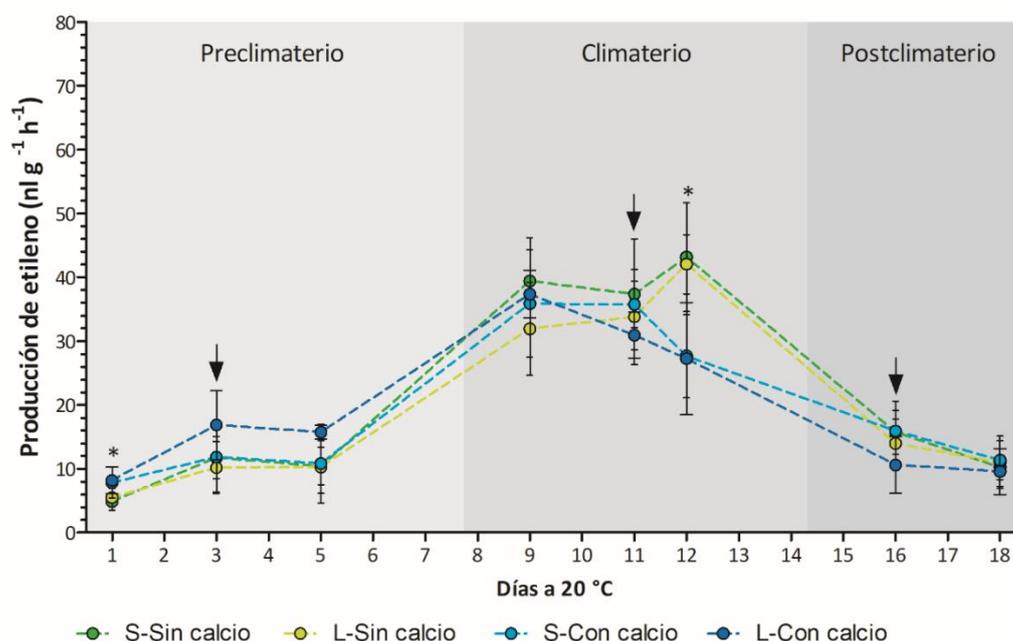
**Figura 5.8. Cambios en la relación de AN/AU en las fracciones de pectinas en la pared celular de piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio al momento de cosecha.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). AN: Azúcares neutros; AU: Ácido galacturónico; PSA: Pectinas solubles en agua; PSE: Pectinas solubles en EDTA; PSH: Pectinas solubles en ácido. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

### 5.3.2. ETAPA 2: POSTCOSECHA

#### 5.3.2.1. Evolución de la calidad y el metabolismo oxidativo de frutos con daño por sol y fertilizados con calcio durante la maduración

En la Figura 5.9 se presentan las curvas de producción de etileno durante la maduración de frutos sin daño por sol y con daño de sol leve y con diferentes fertilizaciones con calcio. En ambos casos, no hubo diferencias en la emisión de etileno en relación con el daño por sol en los tejidos. Los frutos con calcio presentaron mayor tasa de emisión de etileno en el día 1 respecto de los frutos no fertilizados, luego de la conservación en frío. Entre los días 3 y 11 de maduración a 20 °C, no hubo diferencias significativas en la tasa de producción de etileno de los frutos respecto al daño por sol o la fertilización. Sin embargo, a partir del día 11 la tasa de producción de etileno comenzó a descender en los frutos fertilizados con calcio, mientras que en los frutos sin fertilización la emisión de etileno se incrementó hasta el día 12 inclusive, alcanzando el máximo valor registrado. A partir del día 16, la producción de etileno descendió significativamente en todos los tratamientos sin presentar diferencias estadísticas entre éstos.

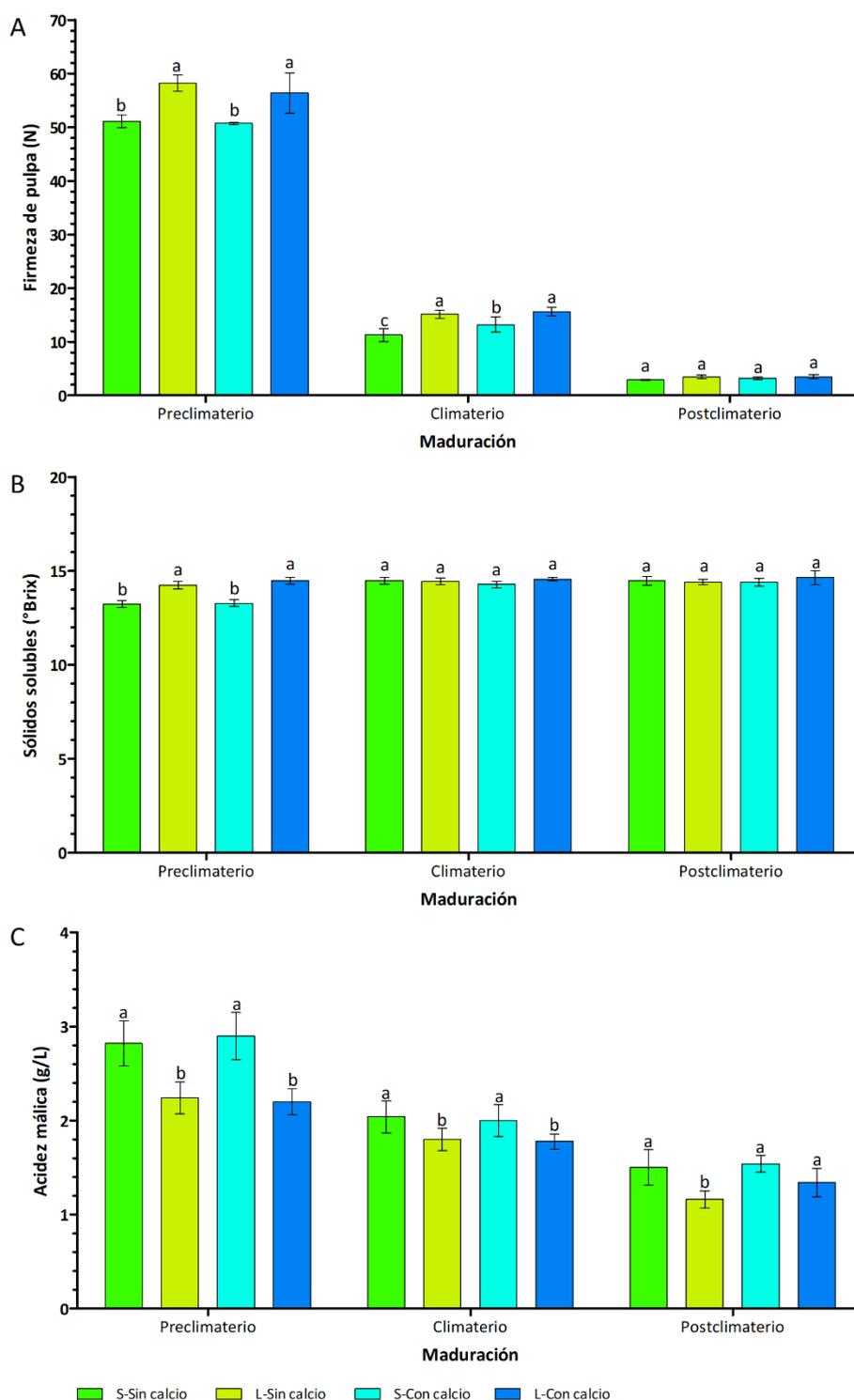
Los períodos de preclimaterio, climaterio y postclimaterio se determinaron entre los intervalos de días 1-7, 8-14 y 15-18, respectivamente. Los muestreos para las determinaciones de índices de madurez, metabolismo oxidativo y componentes de pared celular se realizaron los días 3, 11 y 16, como se indica con flechas en la Figura 5.9.



**Figura 5.9. Producción de etileno en frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño por sol evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). Las flechas ( $\blacktriangleright$ ) indican los momentos de muestreo. Los resultados se expresaron como  $\text{nl g}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). \*: indican diferencias significativas entre tratamientos sin calcio y con calcio. No hubo diferencias significativas entre niveles de daño por sol (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

Durante la maduración de los frutos a 20 °C hubo un descenso progresivo de la firmeza de pulpa y acidez málica junto a un aumento del contenido de los sólidos solubles (Figura 5.10). No hubo interacción entre daño por sol y fertilización durante los tres momentos del climaterio evaluados para estas variables.

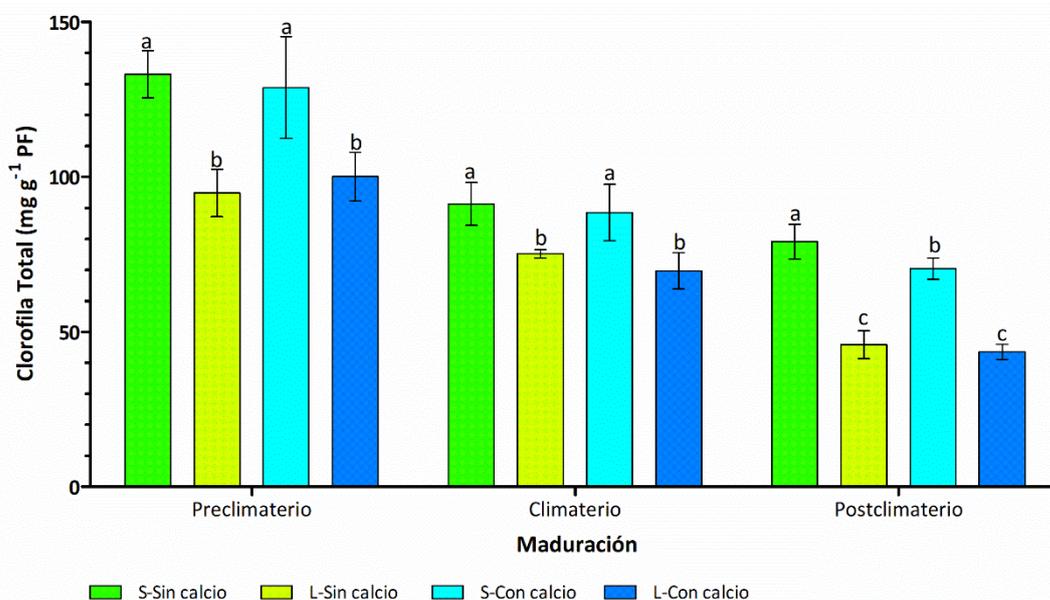
La fertilización con calcio no tuvo efectos significativos en los parámetros de calidad, a excepción de la firmeza de pulpa donde los tejidos S-con calcio presentaron un valor de firmeza superior respecto de los tejidos S-sin calcio en la etapa climatérica ( $p = 0,0187$ ). Contrariamente, el efecto del daño por sol mostró diferencias considerables entre los tejidos con relación a los parámetros de calidad. La firmeza de pulpa en los tejidos L fue significativamente mayor que la de los tejidos S, incluso hasta el postclimaterio (Figura 5.10.A).



**Figura 5.10. Evolución de la calidad de los frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

En el preclimaterio, el contenido de sólidos solubles fue superior en los tejidos L respecto de S, mientras que en el climaterio y postclimaterio los tejidos L presentaron valores estadísticamente iguales a los tejidos S. Inversamente, la acidez titulable de los tejidos S fue sustancialmente superior respecto a los tejidos L durante la maduración de los frutos (Figura 5.10.C).

Luego de la conservación en frío por 145 días y durante la maduración de los frutos, se observó pérdida del contenido de pigmentos fotosintéticos en todos los tratamientos y niveles de daño por sol analizados. No hubo efecto de interacción entre daño por sol y fertilizaciones de calcio ( $p = 0,3288, 0,6456$  y  $0,1067$  para preclimaterio, climaterio y postclimaterio). Los tejidos S presentaron mayor contenido de clorofila total, diferenciándose significativamente de los tejidos L en los tres momentos evaluados. No hubo efecto de los tratamientos con calcio sobre la degradación de clorofilas (Figura 5.11).

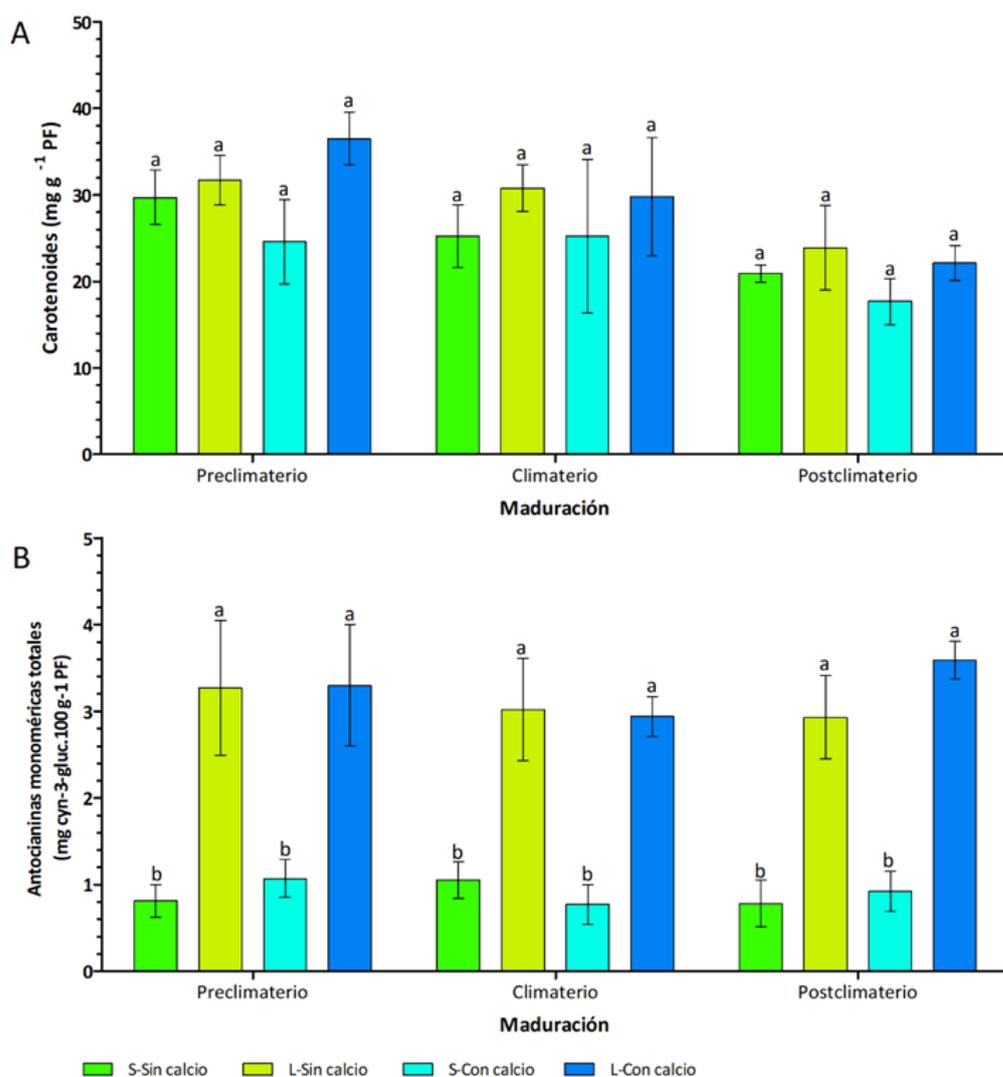


**Figura 5.11. Cambios en el contenido de clorofila total en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . PF: Peso fresco. Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

El contenido de carotenoides no presentó diferencias estadísticas entre los tejidos con y sin daño por sol bajo distintas fertilizaciones con calcio durante la maduración (Figura 5.12.A). Se observó un leve descenso del contenido de

carotenoides en todos los tejidos durante el avance de la maduración, sin ser significativo.

El contenido de antocianinas fue marcadamente superior en los tejidos que presentaron daño por sol. Las fertilizaciones con calcio durante la precosecha no afectaron el contenido de antocianinas en los tejidos analizados. No hubo cambios significativos en la concentración de antocianinas monoméricas totales con relación al avance de la maduración en los tejidos (Figura 5.12.B).



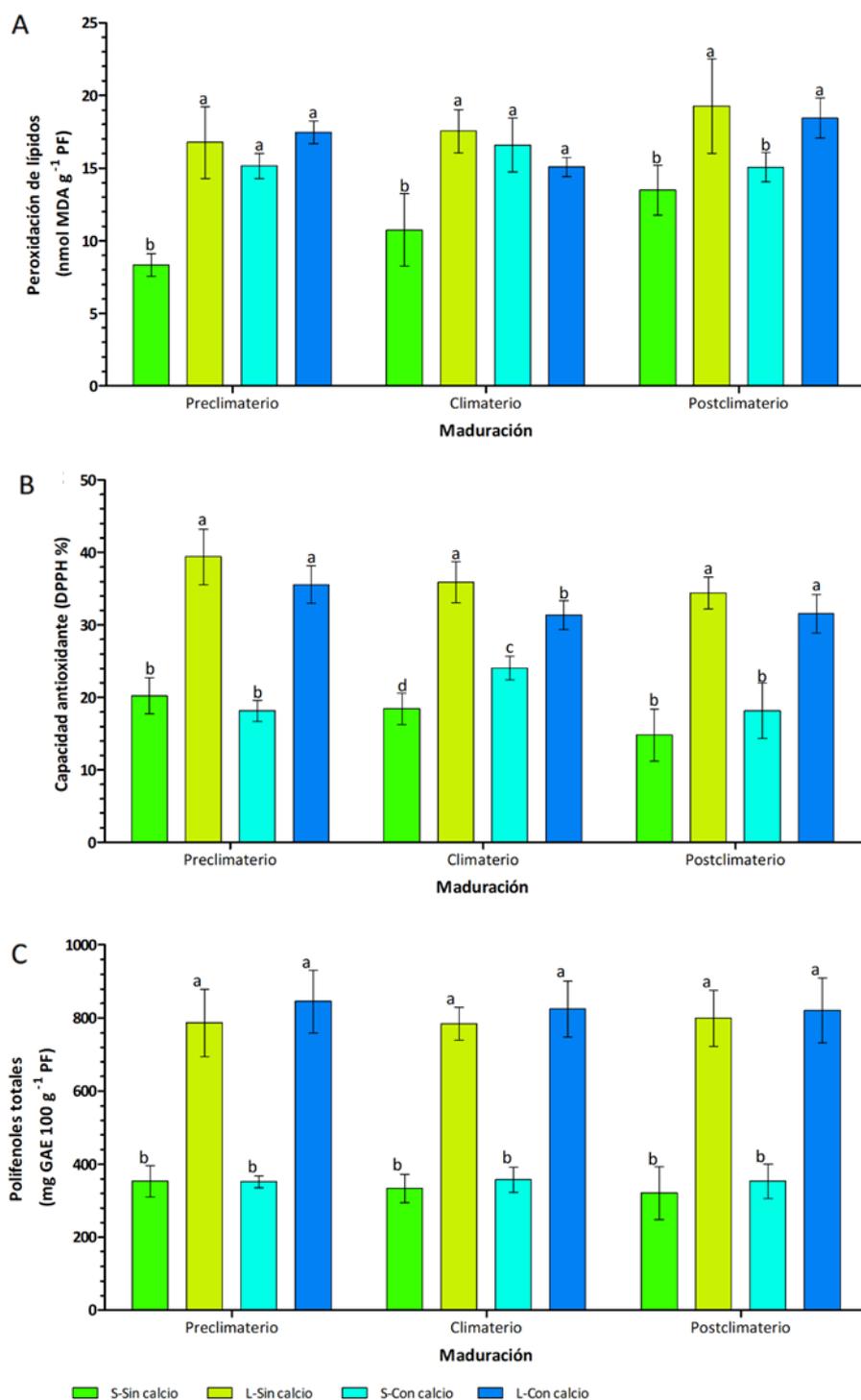
**Figura 5.12.** Cambios en el contenido de carotenoides (A) y antocianinas (B) en piel con distintos niveles de daño por sol en frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional. Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). PF: Peso fresco; Cyn-3-gluc: Cianidina-3-glucósido. Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC; p ≤ 0,05).

En relación con la peroxidación de lípidos (Figura 5.13.A), hubo interacción entre los factores daño por sol y fertilización en las etapas preclimaterio y climaterio ( $p = 0,0002$  y  $0,0001$ , respectivamente). En la evaluación a cosecha, las diferencias en el contenido de MDA correspondieron al efecto del daño por sol únicamente (Tabla 5.4), presentando los tejidos sanos con y sin calcio valores estadísticamente iguales. Sin embargo, luego de la conservación en frío, los tejidos S-con calcio, L-con calcio y L-sin calcio presentaron valores de MDA superiores respecto a S-sin calcio. Este incremento representó aproximadamente un 80 % respecto del valor de peroxidación de lípidos del tejido S-sin calcio. Durante la maduración de los frutos, el tejido S-sin calcio mostró un aumento progresivo y marcado del contenido de MDA, alcanzando un valor final de  $13,48 \text{ nmol MDA kg}^{-1} \text{ PF}$ . Contrariamente, los tejidos S-con calcio, L-sin calcio y L-con calcio no presentaron modificaciones significativas en el contenido de MDA durante el climaterio. En la etapa postclimaterica, los tejidos S-sin calcio y S-con calcio presentaron valores de MDA similares estadísticamente, e inferiores respecto de los tejidos con daño por sol. Los tejidos con daño presentaron un incremento en el estado de peroxidación de sus membranas al final del periodo de maduración.

En la Figura 5.13.B, se exponen los cambios en la capacidad antioxidante de los tejidos bajo los tratamientos daño por sol y fertilización cálcica durante la maduración de los frutos. Luego de la conservación en frío, la capacidad antioxidante de los tejidos S-con calcio se redujo en un 38 % respecto de los valores a cosecha (Tabla 5.5), siendo el único tratamiento que presentó este marcado descenso. Luego de la conservación y durante la maduración de los frutos, las diferencias en los valores de DPPH entre los tejidos se asociaron estadísticamente al efecto del daño por sol. Durante el avance madurativo, los tejidos L presentaron mayor capacidad antioxidante que los tejidos S, con un leve descenso hacia el postclimaterio.

En cosecha, los tejidos con daño por sol y fertilizados con calcio presentaron incrementos en el contenido de polifenoles (Tabla 5.5). Sin embargo, luego de la conservación y durante la maduración, las diferencias en el contenido de polifenoles no se asociaron con el efecto de las fertilizaciones con calcio ( $p = 0,3659$ ,  $0,1852$  y  $0,4210$  en preclimaterio, climaterio y postclimaterio, respectivamente).

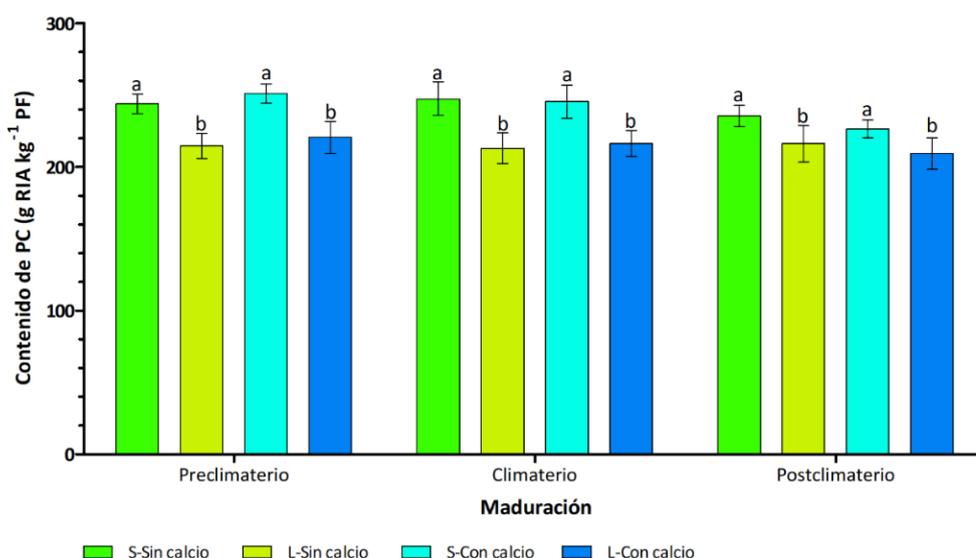
En los tejidos con daño por sol el contenido de polifenoles fue significativamente mayor respecto de tejidos sanos durante la maduración. Asimismo, los valores iniciales de polifenoles totales en la piel de los frutos, con daño y sin daño, se mantuvieron estadísticamente iguales durante los tres momentos de evaluación del climaterio (Figura 5.13.C).



**Figura 5.13. Evolución del metabolismo oxidativo en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional (A) Peroxidación de lípidos, expresado como nmol MDA por g PF; (B) Capacidad antioxidante, expresado como porcentaje de inhibición de DPPH; (C) Contenido de polifenoles totales, expresado como mg GAE por 100 g de PF. Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC;  $p \leq 0,05$ ).**

### 5.3.2.2. Cambios en los componentes de la pared celular de la piel durante la maduración de frutos con daño por sol y fertilizados con calcio

En el análisis del contenido de RIA durante la maduración de los frutos, no hubo interacción entre los factores daño por sol y fertilización con calcio. Tampoco se observaron alteraciones asociadas con las fertilizaciones con calcio sobre esta variable. En coincidencia con los resultados expuestos en la Figura 5.3, las diferencias en el contenido de RIA se asociaron al efecto daño por sol, con valores significativamente menores en los tejidos dañados. Estas diferencias se mantuvieron junto con un leve descenso del contenido de RIA en todos los tejidos durante la maduración de los frutos (Figura 5.14).

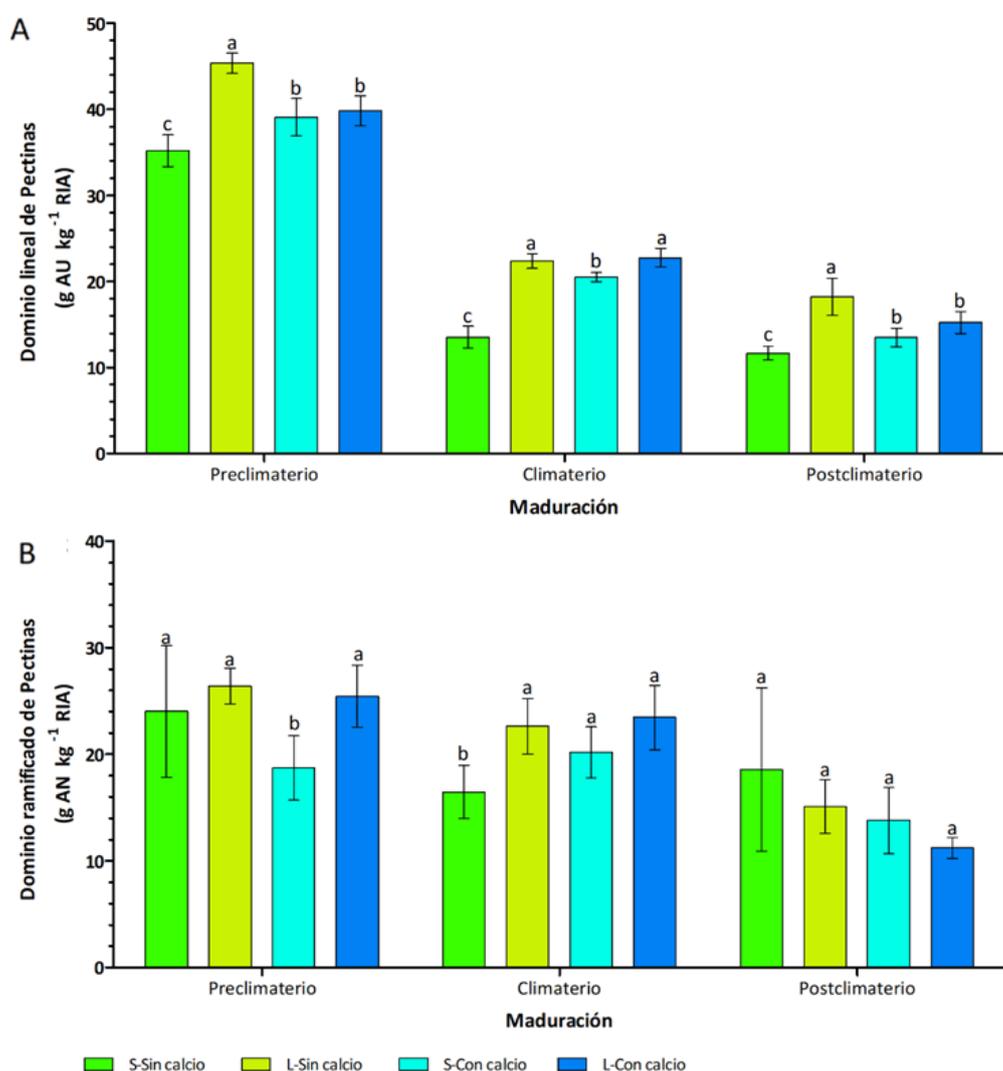


**Figura 5.14.** Cambio en el contenido de RIA en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional. Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). PC: pared celular; RIA: residuo insoluble en alcohol. Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

En la Figura 5.15, se presenta la evolución del contenido de pectinas totales en la piel de frutos de pera Anjou durante la maduración. Como se describió en el Capítulo 3, se observa una reducción del contenido de dominios lineales y ramificados en las pectinas de la pared celular luego de la conservación en frío y maduración a 20 °C.

En el análisis de los dominios lineales de pectinas totales (Figura 5.15.A), hubo interacción entre los factores daño por sol y fertilización ( $p < 0,0001$ ,  $< 0,0001$  y  $0,0016$

en preclimaterio, climaterio y postclimaterio, respectivamente). En cosecha (Figura 5.6.A), los tejidos con calcio presentaron menor contenido de AU en pectinas totales respecto de los tejidos sin calcio, debido a una reducción en la fracción PSA (Tabla 5.7).



**Figura 5.15. Variación en los dominios lineales (A) y ramificados (B) de las pectinas en piel frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional.** Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). AN: Azúcares neutros; AU: Ácidos urónicos; PSA: Pectinas solubles en agua; PSE: Pectinas solubles en EDTA; PSH: Pectinas solubles en ácido. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

Luego de la conservación en frío, se observó una reducción marcada en el contenido de dominios lineales en los tejidos S-sin calcio, con una caída del 17 % respecto del valor a cosecha ( $42,94 \text{ g AU kg}^{-1} \text{RIA}$ ), mientras en los tejidos L-sin calcio

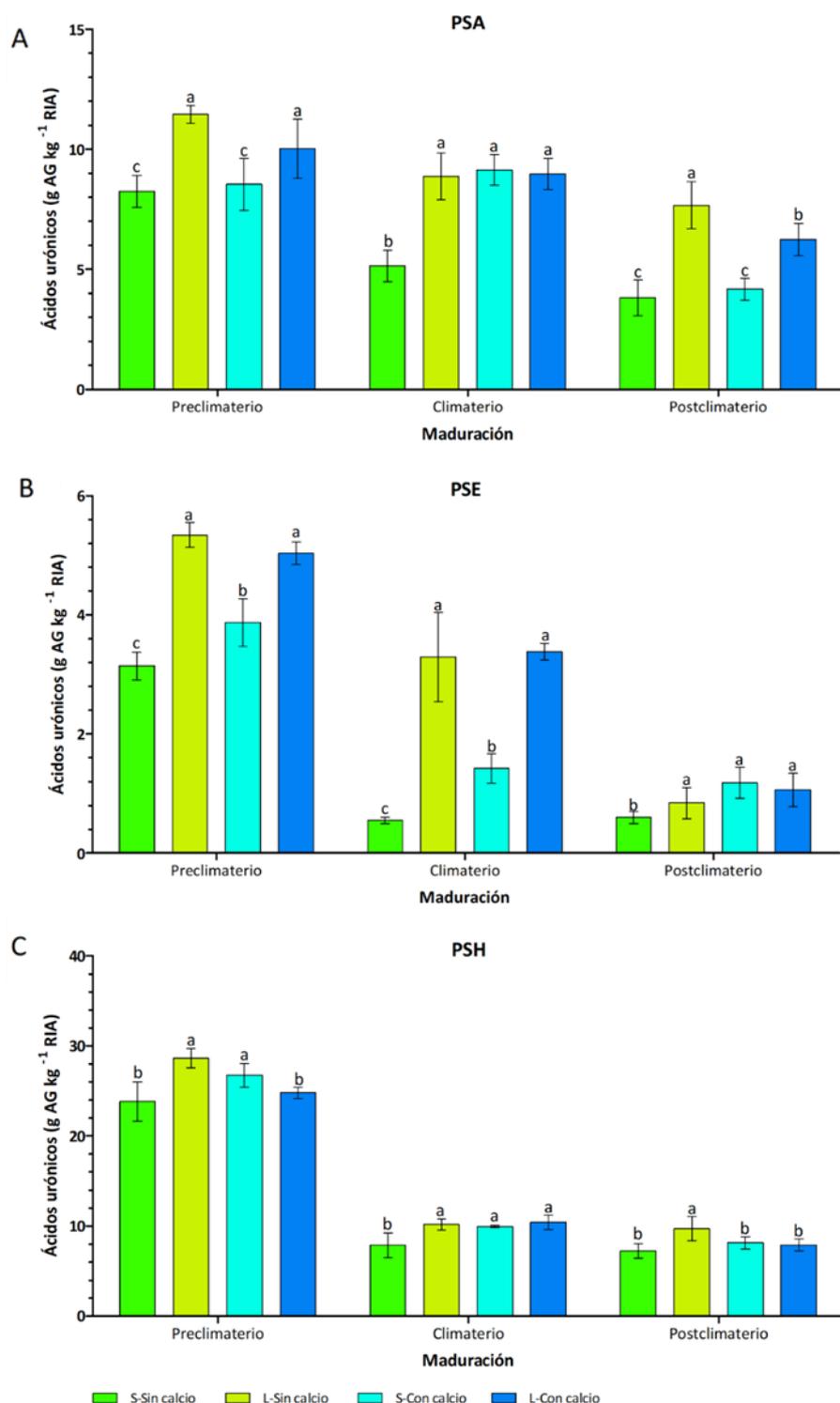
esta reducción fue sólo del 6 % (48,45 g AU kg<sup>-1</sup> RIA). En cambio, entre los tejidos S-con calcio y L-con calcio no hubo diferencias significativas entre los valores de AU en cosecha y preclimaterio. Durante la maduración, el contenido de AU se redujo en todos los tejidos. El contenido de AU en los tejidos S-sin calcio presentó valores estadísticamente inferiores al resto de los tejidos analizados. Los tejidos con calcio mostraron valores similares entre ellos e intermedios entre los tejidos S-sin calcio y L-sin calcio.

Las variaciones en el contenido de AN en las pectinas totales durante la maduración se asociaron al efecto daño por sol ( $p = 0,0169$  y  $0,0011$  en preclimaterio y climaterio, respectivamente). En relación con los valores observados en cosecha (Figura 5.6.B), el contenido de AN se redujo drásticamente en todos los tejidos luego de la conservación en frío, con descensos del 53 % en S-sin calcio, 45 % en L-sin calcio, 61 % en S-con calcio y 52 % en L-con calcio (Figura 5.15.B). Durante la maduración se observó un marcado descenso de los dominios ramificados en los tejidos de todos los tratamientos durante el preclimaterio y climaterio (Figura 5.15.B).

En la Figura 5.16 y 5.17 se presentan los cambios en la concentración de AU y AN en las distintas fracciones de pectinas durante la maduración. El contenido de dominios lineales se reduce con el avance de la madurez en la piel de los frutos de pera. Durante la maduración, los tejidos S-con calcio presentaron mayor contenido de AU respecto de los tejidos S-sin calcio en las tres fracciones de pectinas, con diferencias significativas hasta el climaterio inclusive.

Con relación al daño por sol, los tejidos dañados, con o sin calcio, mostraron valores significativamente superiores de AU en las fracciones de pectinas débil e iónicamente unidas a la pared celular respecto de los tejidos S-sin calcio y con calcio (Figura 5.16.A-B) en preclimaterio y postclimaterio. En el climaterio, los valores de AU en L-sin calcio, L-con calcio y S-con calcio fueron estadísticamente similares entre sí y superiores respecto a S-sin calcio.

En PSH, al inicio de la maduración, los tejidos con mayor contenido de AU fueron S-con calcio y L-sin calcio, mientras S-sin calcio y L-con calcio presentaron valores estadísticamente similares. En el climaterio, los tejidos S-con calcio, L-sin calcio y L-con calcio presentaron mayor contenido de AU respecto de S-sin calcio. Mientras en el postclimaterio, los tejidos L-sin calcio se diferenciaron significativamente del resto, con un incremento del 34 % en el contenido de AU respecto de S-sin calcio (Figura 5.16.C).



**Figura 5.16.** Cambios en el contenido de los dominios lineales en las fracciones de pectinas PSA (A), PSE (B) y PSH (C) en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional. Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). AG: Ácido galacturónico; PSA: Pectinas solubles en agua; PSE: Pectinas solubles en EDTA; PSH: Pectinas solubles en ácido. Los valores son la media  $\pm$  D.E. ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

En la maduración, la fracción PSH presentó una reducción considerable de los dominios ramificados de pectinas, asociado a un incremento en la fracción PSA. Los tejidos S-sin calcio y con calcio no mostraron diferencias en el contenido de AN en los distintos momentos evaluados del climaterio en las pectinas covalentemente unidas a la pared. Durante el preclimaterio hasta el climaterio, los tejidos L-sin calcio y L-con calcio presentaron valores similares entre sí, diferenciándose apreciablemente de los tejidos sin daño por sol al presentar valores superiores del contenido de AN en PSH. En postclimaterio, sólo los tejidos L-sin calcio mantuvieron valores de AN superiores al resto de los tejidos (Figura 5.17.C).

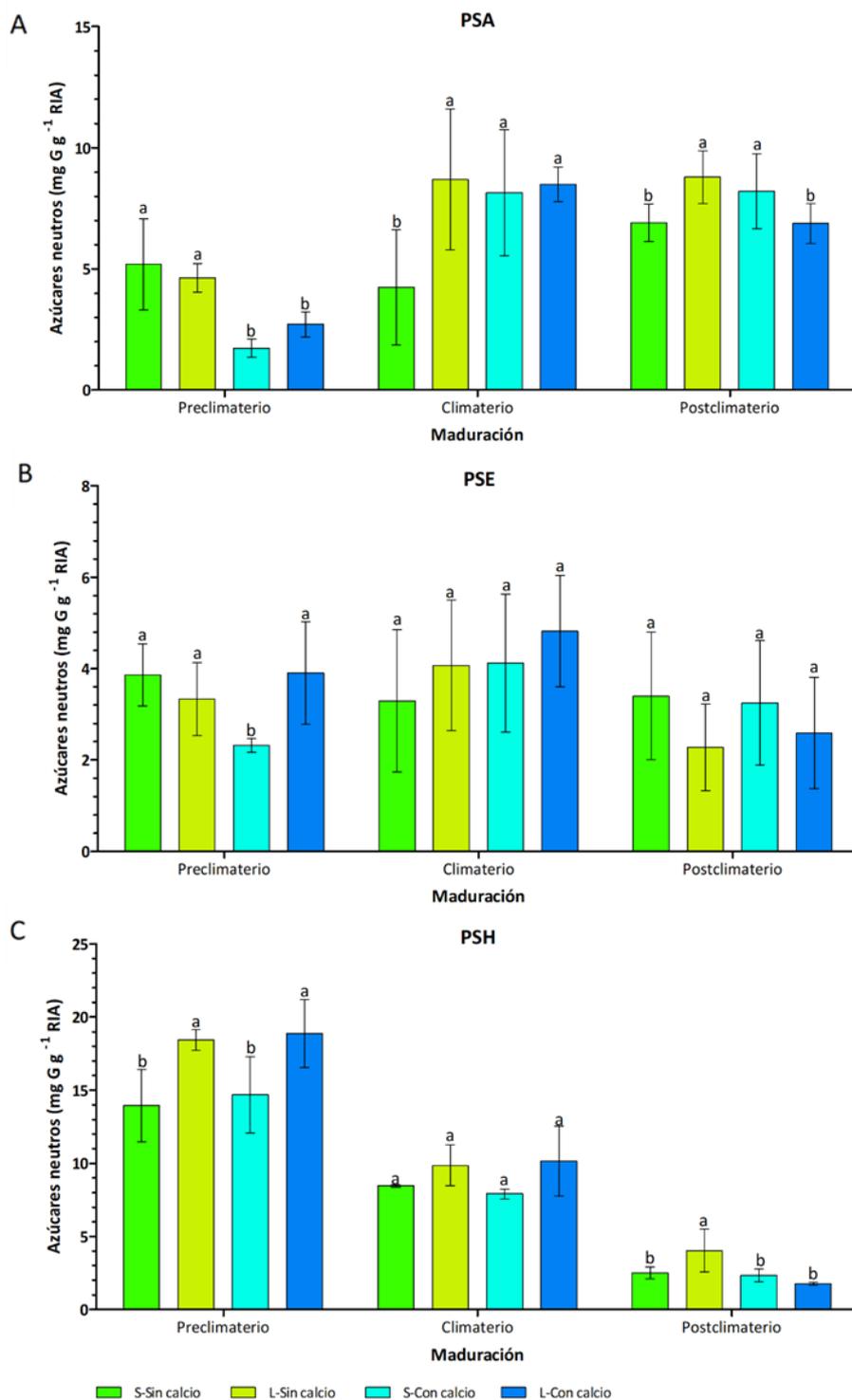
Al inicio de la maduración, en la fracción PSA, los tejidos tratados con calcio presentaron valores sustancialmente menores de AN respecto de los tejidos sin calcio. Sin embargo, durante el avance de la maduración, la concentración de AN fue mayor en los tejidos L-sin calcio, L-con calcio y S-con calcio respecto a los tejidos S-sin calcio. En postclimaterio, los tejidos L-sin calcio y S-con calcio exhibieron similar contenido de AN, y valores superiores a los tejidos S-sin calcio y L-con calcio. Estos últimos no presentaron diferencias entre sí con relación al contenido de AN en la fracción PSA durante el postclimaterio (Figura 5.17.A).

En la fracción PSE, el contenido de AN no mostró un patrón de cambios relacionados al efecto de daño por sol ni fertilización con calcio. En la Figura 5.17.B, se puede observar un leve incremento del contenido de AN desde el preclimaterio al climaterio, con un posterior descenso hacia el postclimaterio. Sin embargo, estas diferencias no son significativas.

En la Figura 5.18 se presenta la relación de AN/AU durante la maduración de los tejidos con distintos niveles de daño por sol y tratamientos de fertilización de calcio. En todos los tratamientos se observa un incremento de la proporción de AN/AU durante el avance de la madurez. En las fracciones PSA y PSE, el aumento se observa hasta el final del climaterio, mientras en PSH entre el climaterio y el postclimaterio se reduce la proporción de AN/AU.

En el inicio del climaterio en la fracción PSA (Figura 5.18.A), los tejidos S-sin calcio presentaron diferencias significativas en AN/AU respecto al resto de los tejidos. Con el avance de la maduración, los valores de AN/AU se incrementaron en todos los tratamientos presentando valores similares en el climaterio, pero diferenciándose marcadamente en el postclimaterio con relación al efecto del daño por sol. Los tejidos con daño por sol mostraron valores un 40 % menores en AN/AU respecto a los tejidos S-con calcio y S-sin calcio.

En la fracción PSE (Figura 5.18.B), los tejidos S-con calcio, L-con calcio y L-sin calcio presentaron un patrón de cambios en la relación AN/AU similar, diferenciándose significativamente de S-sin calcio. La relación de AN/AU fue estadísticamente mayor durante la maduración en los tejidos S-sin calcio respecto al resto de los tratamientos.



**Figura 5.17.** Cambios en el contenido de dominios ramificados en las fracciones de pectinas PSA (A), PSE (B) y PSH (C) en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). G: Glucosa; PSA: Pectinas solubles en agua; PSE: Pectinas solubles en EDTA; PSH: Pectinas solubles en ácido. Los valores son la media  $\pm$  D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC;  $p \leq 0,05$ ).

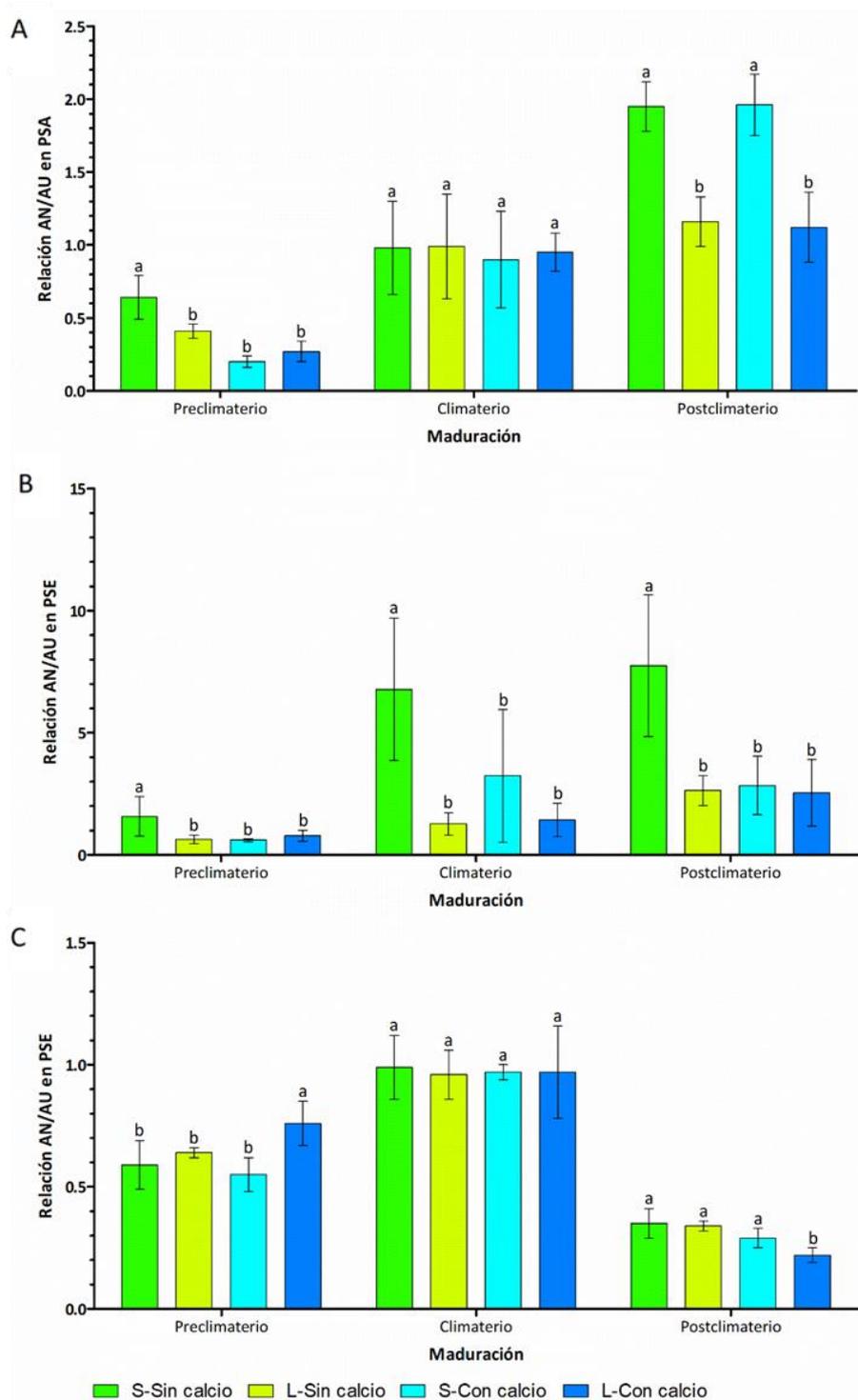


Figura 5.18. Cambios en AN/AU en las fracciones de pectinas PSA (A), PSE (B) y PSH (C) en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio en la cosecha y durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional. Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). AN: Azúcares neutros; AU: Ácidos urónicos; PSA: Pectinas solubles en agua; PSE: Pectinas solubles en EDTA; PSH: Pectinas solubles en ácido. Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC; p ≤ 0,05).

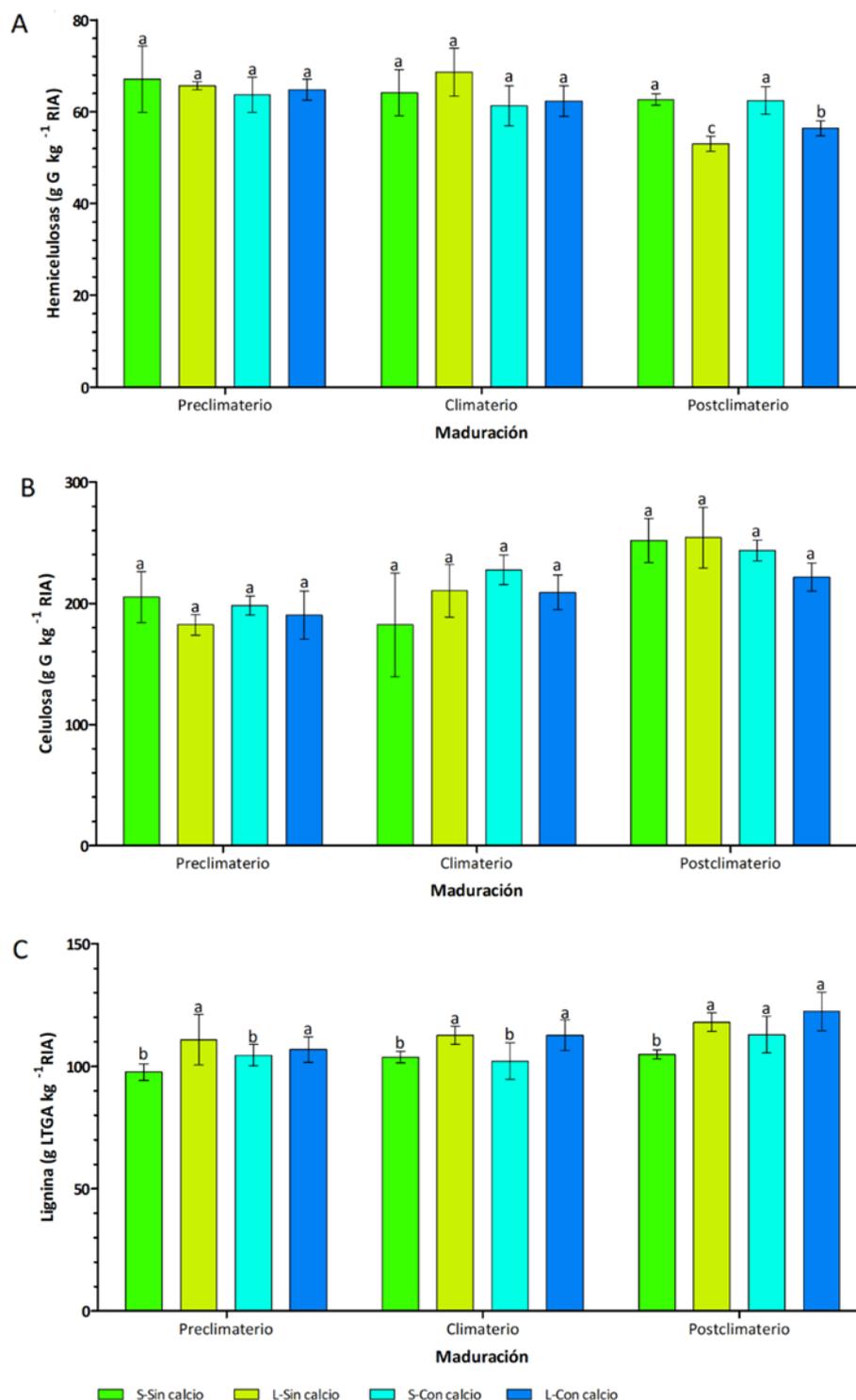
En la Figura 5.18.C, se observa un incremento de la relación de AN/AU durante el pico climaterico y luego un marcado descenso en todos los tratamientos. Los patrones de cambio de la proporcionalidad AN/AU no presentaron diferencias durante la maduración de los tejidos evaluados en la fracción PSH. El tejido L-con calcio presento valores levemente superiores en el preclimaterio e inferiores en el postclimaterio respecto a S-sin calcio.

Durante la conservación y maduración, las variables contenido de hemicelulosas, celulosa y lignina no mostraron cambios asociados al efecto de las fertilizaciones con calcio o por interacción entre los factores daño por sol y fertilización (Figura 5.19).

El contenido de hemicelulosas no varió significativamente durante la maduración (Figura 5.19.A). En el postclimaterio, los tejidos L-sin calcio y L-con calcio se diferenciaron significativamente con una reducción de contenido de hemicelulosas del 15 % y 10 %, respectivamente, comparados a los tejidos S-sin calcio.

No hubo diferencias en contenido de celulosa entre los tejidos con daño por sol y fertilizados con calcio durante la maduración de los frutos (Figura 5.17.B). En el postclimaterio, el contenido de celulosa por kg de RIA fue superior en todos los tejidos respecto de los valores observados en preclimaterio y climaterio.

En relación con el contenido de lignina, las diferencias observadas en cosecha se mantuvieron durante la maduración de los frutos. Los tejidos con daño por sol presentaron mayor contenido de lignina en la pared celular respecto a los tejidos sin daño por sol durante la maduración (Figura 5.19.C).



**Figura 5.19.** Contenido de hemicelulosas (A), celulosa (B) y lignina (C) en piel de frutos de pera Anjou con distintos niveles de daño por sol y diferentes fertilizaciones con calcio durante la maduración a 20°C luego de 145 días de conservación en cámara de frío convencional. Sin calcio: fertilizaciones sin calcio; Con calcio: 160 kg de calcio por hectárea vía suelo como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Los niveles de daño evaluados fueron sin daño (S) y con daño leve (L). G: Glucosa; RIA: Residuo insoluble en alcohol. Los valores son la media ± D.E. (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas entre nivel de daño por sol y tratamientos con fertilización con calcio (DGC; p ≤ 0,05).

## 5.4. DISCUSIÓN

### 5.4.1. Fertilizaciones con calcio incrementan la capacidad antioxidante de la piel de frutos de pera Anjou aliviando la incidencia de daño por sol leve en campo

El calcio es un nutriente esencial relacionado con el incremento de tolerancia a estrés abióticos y bióticos, debido a su participación en el fortalecimiento de la pared celular, el mantenimiento de la integridad de las membranas y su función como mensajero químico en procesos de crecimiento, desarrollo y respuesta de defensa en las plantas (Hocking y col., 2016; Aghdam y col., 2012).

En producciones frutihortícolas, el calcio ha sido usado como un método simple y seguro para aliviar el efecto de estrés abiótico (Larkindale y Huang, 2004). En frutos de manzanos var. Cripps' Pink y Golden Delicious, algunos investigadores observaron un descenso en la incidencia de daño por sol leve con aplicaciones foliares precosecha de calcio y boro, no así en var. Granny Smith, sugiriendo que el efecto de estos nutrientes depende de las dosis y momentos de la aplicación como de las características intrínsecas de la especie y variedad (Mwije y col., 2020b; Lötze y col., 2018; Mwije, 2018). Coincidente con estos resultados, durante la temporada 2018/2019, se observó una reducción apreciable del daño leve en frutos de pera Anjou bajo fertilizaciones con calcio vía suelo durante 4 años consecutivos.

Ensayos en pera Anjou reportaron incrementos productivos apreciables (15 %) en las plantas tratadas con aplicaciones foliares de cloruro de calcio (Raese y col., 1995). Contrariamente, en este trabajo las aplicaciones de calcio no afectaron la productividad de las plantas, como tampoco incidieron en el peso y diámetro de los frutos. Estos resultados coinciden con reportes en manzanas Cripps Pink, Golden Delicious y Granny Smith (Mwije, 2018) y peras Rocha y Conference (Pessoa y col., 2021; Wójcik y col., 2014), donde los tratamientos con calcio no afectaron los rendimientos productivos como tampoco las dimensiones de los frutos.

Con respecto a los parámetros de madurez, se ha relacionado al calcio con el incremento de firmeza en los tejidos junto a mejoras en la calidad intrínseca del fruto (Gerasopoulos y Drogoudi, 2005; Gerasopoulos y Richardson, 1996). En peras y manzanas se ha reportado que el calcio favorece la acumulación de ácidos orgánicos y azúcares no reductores, mantiene la firmeza de pulpa y favorece la coloración (Benítez y col., 2005). En pera Anjou, los frutos fertilizados con calcio presentaron un leve incremento de la firmeza, que no fue significativo respecto de los frutos no fertilizados. Mientras, los tejidos con daño por sol presentaron un incremento considerable de la firmeza respecto de los tejidos sin daño, resultados que fueron descritos en el Capítulo 1 y reportados en otras especies con daño por sol (Munné-Bosch y Vincent, 2019; Schrader y col., 2003; Woolf y col., 1999). Los parámetros sólidos solubles, acidez y degradación de almidón no fueron afectados por los tratamientos con calcio, lo cual coincide con datos mencionados por Mwije (2018), Raese y col. (1995) y Wójcik

y col. (2014) en manzanas y peras. Contrariamente, peras var. Rocha tratadas con aplicaciones foliares de calcio pre y postcosecha presentaron incrementos en el contenido de azúcares y reducción de la acidez málica (Pessoa y col., 2021). En los frutos de pera Anjou, los índices de madurez fueron notablemente modificados por el efecto del daño por sol, sin embargo, no evidenciaron cambios relacionados a las fertilizaciones de calcio vía suelo con la dosis utilizada.

En relación con los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores se han reportado respuestas diferentes en frutos tratados con calcio. En manzanas, Mwije y col. (2020b) y Xu y col. (2022) observaron que aplicaciones de calcio junto a otros micronutrientes, tuvieron efectos positivos en el contenido de pigmentos fotosintéticos y la eficiencia de los fotosistemas, dependiendo el grado de respuesta de la variedad. En tomate, el efecto de tratamientos con calcio mejoro la eficiencia operativa del fotosistema II, incrementando la tolerancia al estrés térmico debido a una menor producción de EROs (Sakhonwasee y Phingkasan, 2017). Mientras, Klein y col. (1990) evidenciaron que manzanas pretratadas con calcio presentaron menor pérdida de pigmentos verdes luego de recibir tratamientos postcosecha térmicos. Por otro lado, en frutos de manzanas rojas y bicolor, y en cerezas se reportó que tratamientos de calcio mejoraron el color rojo de la piel, asociado a un incremento en el contenido de antocianinas y flavonoides totales (Wang y col., 2014; Farag y Nagy., 2012; Raese y Staiff, 1990). En este trabajo, las aplicaciones de calcio vía suelo no influyeron en el contenido de clorofilas ni pigmentos fotoprotectores en los frutos S de pera Anjou, ni evidenciaron un comportamiento diferente en la concentración de pigmentos en los frutos con daño por sol con y sin fertilización. Estos resultados son similares a los reportados por Mwije y col. (2020a) y Pesseoa y col. (2021) en frutos de manzana var. Granny Smith y pera var. Rocha.

El rol del calcio en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares durante el desarrollo de las plantas, así como frente a condiciones estresantes ha sido ampliamente analizado (Sakhonwasee y Phingkasan, 2017; Hocking y col., 2016; Robertson, 2013). Los cambios de temperaturas por debajo o encima de los umbrales vitales genera, como respuesta en los tejidos, el desplazamiento de calcio de las pectinas otorgándole mayor flexibilidad a la pared celular y evitando el desprendimiento de la membrana celular al aumentar interacciones entre fosfolípidos y proteínas de membrana con este nutriente, junto con un incremento de la micro viscosidad de membrana manteniendo su integridad (Farag y Nagy., 2012; Marschner, 1995). Este proceso incrementa el efecto protector sobre las membranas disminuyendo el daño y la pérdida de electrolitos. Asimismo, la concentración de calcio libre intracelular aumenta, actuando como señal de estrés para iniciar una respuesta de defensa celular asociada al incremento de compuestos antioxidantes (Wang y Li, 2006). Estos cambios en el estado y concentración de calcio participarían tanto en la

protección y prevención del daño como en la adquisición de tolerancia (Wu y col., 2018; Wahid y col., 2007; Palta, 1996).

El mayor contenido de calcio en los tejidos se ha relacionado con una menor permeabilidad a solutos de bajo peso molecular y baja actividad de lipoxigenasas, reduciendo el daño oxidativo de las membranas (Marschner, 1995). En este trabajo, no se observaron diferencias en la conductividad eléctrica entre los tejidos con y sin calcio, contrariamente a reportes realizados en frutos de manzano bajo aplicación de calcio foliar (Faraq y col., 2012). Sin embargo, los tejidos S-con calcio presentaron menor peroxidación de lípidos comparados a los tejidos S-sin calcio, pero estas diferencias no fueron significativas. Resultados similares fueron reportados en cereza (Wang y col., 2014).

La capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles fue considerablemente superior en los tejidos S y L con calcio respecto de los tejidos S y L sin calcio. Resultados similares se reportaron en cereza (Wang y col., 2014), uva (Conde y col., 2016) y manzanas (Mwije, 2018) tratadas con aplicaciones de calcio foliar. Mwije (2018) sugirió que el boro y el calcio se asocian a la producción de compuestos fenólicos aumentando la capacidad antioxidante y de esta forma, se mejora la respuesta defensiva de los tejidos frente a estrés oxidativo, protegiendo los pigmentos fotosintéticos. En frutos de manzana (Awad y de Jager, 2002), cereza (Wang y col. 2014) y maíz (Gong y col. 1998), se correlaciono positivamente el incremento de calcio en los tejidos con el aumento de componentes antioxidantes (antocianinas, flavonoides, ácido ascórbico) y enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX). Por su parte, Ngo y Zhao (2009) corroboraron la importancia de iones metálicos como níquel, magnesio y calcio en la formación de complejos estables de antocianinas y flavonoides. Particularmente, en Anjou los tratamientos con calcio no afectaron la concentración de antocianinas como se describió previamente en manzanas y cerezas.

En general, los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con reportes previos y permiten sugerir que los tratamientos precosecha de calcio vía suelo incrementan la capacidad antioxidante de los tejidos por medio del aumento del contenido de polifenoles. Asimismo, por tratarse de una variedad de piel verde es probable que el efecto del calcio en la vía de síntesis de antocianinas no cumple un rol fundamental como observaron Awad y de Jager (2002) y Mwije (2018) en variedades de manzanas rojas y bicolor. Esto permite suponer que la reducción en la incidencia de daño por sol leve observada en campo en las plantas fertilizadas con calcio se debe, en parte, al aumento de la capacidad antioxidante en frutos, lo cual permitiría aliviar el daño oxidativo promovido por condiciones de elevada radiación solar. Por otro lado, Aghdam y col. (2012) sugirieron que las aplicaciones de calcio podrían mejorar, además del contenido de polifenoles, la actividad de enzimas antioxidantes contribuyendo a la mayor capacidad antioxidante en los tejidos tratados, comportamiento observado en uvas por Wang y Li (2006) y en maíz por Gong y col.

(1998). En este trabajo no se analizó la actividad de enzimas antioxidantes en relación con los tratamientos con calcio.

El ingreso de calcio a los frutos vía xilema se produce durante plena floración hasta 45 DDPF, periodo durante el cual se realizaron las fertilizaciones en este trabajo. La dosis de calcio aplicada corresponde a valores recomendados para esta variedad en la zona, permitiendo evitar un exceso de vigor en el desarrollo de plantas y reducir la incidencia de fisiopatías típica de Anjou como corcho. Los tratamientos no afectaron los parámetros: rendimiento productivo, índices de madurez, contenido de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores. Sin embargo, se observaron efectos positivos en la capacidad antioxidante de los tejidos tratados con calcio, que podrían asociarse a la menor incidencia de niveles de daño por sol leve en los frutos. Por otro lado, el efecto del daño por sol presentó diferencias notorias en los tejidos con relación a los índices de madurez y metabolismo oxidativo, como se describió en el Capítulo 1. Es posible que el efecto de las fertilizaciones con calcio fuera enmascarado por el efecto del daño por sol en los tejidos con daño leve. En base a estos resultados sería conveniente ensayar otras dosis o formas de aplicación del calcio para concluir en forma concreta en relación con este elemento y el daño por sol.

### **5.4.2. Fertilizaciones con calcio promueven modificaciones en la matriz pectínica y hemicelulosas de la pared celular de la piel de frutos de pera Anjou**

En cuanto a la pared celular, el calcio es un componente fundamental en la determinación de las propiedades biofísicas de la matriz pectínica. Participa en el fortalecimiento y cementación de la pared al interactuar químicamente con los grupos carboxilos de los ácidos galacturónico desmetilados formando pectatos de calcio, incrementando la reticulación de las pectinas y reduciendo el acceso de enzimas hidrolíticas a sus sustratos. Asimismo, su concentración en la matriz determina la actividad de ciertas enzimas hidrolíticas de la pared como PG, PL y PME (Marschner, 1995). Sin embargo, es escasa la información bibliográfica que relaciona los efectos de aplicaciones de calcio sobre la dinámica de los componentes y la estructura de la pared celular en los frutos.

En este estudio, no se observaron diferencias en el contenido de RIA en la piel de frutos relacionado al efecto de las fertilizaciones con calcio vía suelo. Con el fin de establecer el contenido de calcio asociado a la pared celular, se determinó este nutriente en el RIA. Particularmente en los frutos, la distribución y concentración de calcio no es homogénea. Durante el crecimiento de frutos de pepita, se producen gradientes del contenido de calcio con valores altos en la piel y el corazón, relativamente bajos en la pulpa en el sentido transversal, y que van disminuyendo desde la zona del pedúnculo al cáliz en sentido longitudinal (Benítez y col., 2005; Monge y col., 1994). En este trabajo, el contenido de calcio en piel de frutos Anjou sanos y sin fertilización diferencial con calcio presentó un valor medio de 2,8 g calcio

kg<sup>-1</sup> RIA. Con relación a las fertilizaciones con calcio, no se observaron diferencias significativas en el contenido de calcio fijado en la pared celular en la piel de los tejidos tratados.

Los tratamientos con calcio afectaron el contenido de pectinas en la pared celular de la piel, comparados con los tejidos sin calcio. En el contenido de pectinas totales, los tejidos con calcio presentaron menor contenido de AU respecto de los tejidos sin calcio, diferencia que se mantuvo incluso entre los niveles de daño por sol analizados (S y L). En el fraccionamiento de las pectinas, los resultados mostraron que el contenido de AU se vio significativamente disminuido en la fracción de pectinas débil y fuertemente unidas a la pared celular. En las pectinas iónicamente unidas a la pared, las concentraciones de AU no presentaron diferencias en los tejidos en relación con las fertilizaciones con calcio, pero sí por el efecto del daño por sol que causó un incremento en la cantidad de dominios lineales. Contrariamente, trabajos realizados en frutilla, durazno y manzana han reportado incrementos de AU principalmente en la fracción PSE como respuesta a la aplicación de calcio postcosecha (Liu y col., 2017; Ortiz col., 2011; Lara y col., 2004).

Bakeer (2016) planteó que los tratamientos con calcio reducen la incidencia de daño por sol al incrementar la reticulación de las pectinas por la formación de pectatos de calcio, favoreciendo la cohesión y fuerza de la pared celular. Si bien este trabajo, no evidenció un incremento de AU en la fracción de pectinas iónicamente unidas, el incremento de calcio en la composición del RIA de los tejidos derivados de las parcelas fertilizadas permitiría suponer que estas pectinas podrían presentar más entrecruzamientos con calcio.

El contenido de AN de las pectinas totales no evidenciaron cambios por efecto de las fertilizaciones cálcicas en los tejidos de pera Anjou, así como tampoco por el daño por sol. Sin embargo, los tejidos L-sin calcio presentaron diferencias significativas en el contenido de ramificaciones en comparación a los tejidos S-sin calcio, S-con calcio y L-con calcio, en las tres fracciones de pectinas. Los tejidos con daño por sol y calcio presentaron una composición similar a los tejidos sanos, lo que permite sugerir que el incremento de calcio alteraría la pérdida de cadenas laterales durante los procesos de remodelación adaptativa, limitando la hidrólisis enzimática de AN de las pectinas covalentemente unidas a la pared celular o reduciendo el daño por EROs.

Los cambios en las cantidades de AU y AN en los tejidos tratados con fertilizaciones con calcio alteran las relaciones de ramificaciones en función de HG en las fracciones pectínicas, pudiendo alterar la estructura de la pared celular. En este estudio, se observó alteraciones en la proporcionalidad de AN/AU en las fracciones PSA y PSH en función de los tratamientos con calcio. En las fracciones PSA y PSH, los tejidos con calcio presentaron mayor proporción de ramificaciones, lo que permite inferir que estos tejidos presentan una matriz más reticulada, que podría limitar el acceso de enzimas hidrolíticas. En los tejidos L-con calcio, las modificaciones de las

relaciones AN/AU presentan comportamientos similares a los tejidos L-sin calcio. Esto sugiere que el efecto de las fertilizaciones de calcio sobre la pared celular podría ser enmascarado por los cambios promovidos por la exposición a elevada radiación y temperatura.

Los tejidos con daño por sol y sin fertilización con calcio presentaron mayor contenido de hemicelulosas respecto de los tejidos sanos. En el Capítulo 2, se asoció la baja expresión de PcCEL2 con el mayor contenido de hemicelulosas en los tejidos con daño por sol. Distintos trabajos han reportado el efecto de aplicaciones de calcio sobre la reducción de la actividad de enzimas hidrolíticas de la pared celular retardando el ablandamiento, como XTHs y EGAsas (Ranjbar y col., 2018; Belge y col., 2017; Figueroa y col., 2012; Ortiz y col., 2011). El mayor contenido de hemicelulosa en los tejidos con calcio podría deberse al efecto de este elemento sobre la actividad de enzimas hidrolíticas.

El contenido de celulosa permaneció estable en la pared celular, y no se vio afectado ni por el daño ni por el tratamiento con fertilizaciones de calcio. Mientras, el contenido de ligninas fue mayor en respuesta al daño por radiación (Capítulo 1) y no fue afectado por las fertilizaciones.

Las modificaciones observadas en los componentes de la pared celular en los tejidos S por efecto de las fertilizaciones no se asociarían directamente con la reducción o adquisición de tolerancia al estrés por elevada radiación solar y temperatura. Sin embargo, los resultados permiten sugerir que el sustancial pero no significativo incremento de calcio en la pared celular promovió cambios en los polímeros de la matriz pectínica y la red de hemicelulosas que podrían afectar su estructura y posiblemente su evolución postcosecha.

### **5.4.3. Fertilizaciones de calcio retrasan la solubilización de pectinas en la pared celular de la piel de pera Anjou durante la maduración**

La calidad y la vida postcosecha de los frutos se ve influenciada positivamente por la nutrición con calcio (Sharma, 2020; Aghdam y col., 2012; Benítez y col., 2005). En frutos tratados con aplicaciones de calcio precosecha, como frutilla (Chéour y col., 2019), kiwi (Gerasopoulos y Drogoudi, 2005), arándano (Olmedo y col., 2021) y pera (Sajid y col., 2019), se reportaron incrementos de firmeza en pulpa, retraso de ablandamiento y menor incidencia de fisiopatías y enfermedades fúngicas durante el almacenamiento y maduración alargando la vida útil.

En los frutos de peras Anjou no se observó un efecto considerable del tratamiento con calcio vía suelo sobre la producción de etileno durante la maduración. En coincidencia, Gerasopoulos y Richardson (1999, 1996) reportaron para esta variedad, que los tratamientos foliares de calcio no modificaron el patrón de emisión de etileno durante la maduración. Sin embargo, observaron que frutos tratados con

calcio aumentaron el requerimiento de frío para iniciar la maduración, presentando un retraso en la producción de etileno en comparación con frutos no tratados y conservados en frío el mismo periodo de tiempo. En este trabajo, la producción de etileno ni el patrón de emisión fueron afectados significativamente por los tratamientos con calcio, resultados coincidentes con reportes de Manganaris y col. (2005) en duraznos.

Los parámetros de calidad no fueron influenciados significativamente por la fertilización con calcio, hecho que coincide con datos observados en Anjou bajo tratamientos con diferentes formulaciones de calcio y momentos de aplicación (Raese y col., 1995). Por otro lado, se ha reportado en distintos frutos que la firmeza de pulpa se correlaciona positivamente con los tratamientos foliares de calcio (Olmedo y col., 2021; Gerasopoulos y Drogoudi, 2005; Gerasopoulos y Richardson, 1996). Sin embargo, en cosecha los tratamientos con calcio no provocaron un incremento relevante en la firmeza de pulpa, situación que continuó luego de la conservación hasta la etapa climatérica donde los tejidos S-con calcio presentaron mayor firmeza respecto de los tejidos S-sin calcio. Estos resultados coinciden con los reportados en manzana por Siddiq y col. (2020). Dichos autores indicaron que los tratamientos precosecha con calcio no necesariamente conducen a frutos más firmes en el momento de la cosecha, pero puede resultar en una mejor retención de la firmeza durante el almacenamiento. En los tejidos con daño por sol, los valores de firmeza fueron considerablemente mayores en cosecha y durante la maduración, sin evidenciarse diferencias entre los tejidos L-sin calcio y L-con calcio.

El ablandamiento de los frutos durante la maduración es resultado del desmontaje de los componentes de la pared celular por procesos enzimáticos y oxidativos. El incremento de firmeza y el retraso del ablandamiento en frutos tratados con calcio se han asociado con su participación como componente de la pared celular al fortalecer y aumentar las interacciones entre las cadenas pectínicas, limitando el acceso de enzimas hidrolíticas de la pared a su sustrato e inhibiendo drásticamente la actividad de enzimas como PG (Vincente y col., 2014; Marschner, 1995). Durante la maduración de los frutos de pera Anjou no se observaron cambios en el contenido de RIA en la piel relacionados con el efecto de las fertilizaciones con calcio ni durante la maduración. Por otro lado, el efecto del daño por sol en el contenido de RIA en los tejidos se mantuvo durante la maduración, presentando valores inferiores respecto de los tejidos sin daño.

No se observaron cambios en el contenido de hemicelulosas, celulosa y ligninas durante la maduración asociados con la fertilización con calcio precosecha. En coincidencia con estos resultados, tratamientos de calcio en arándanos no promovieron cambios en el contenido de hemicelulosas (Angeletti y col., 2010), y el contenido de celulosa fue constante en frutos de durazno tratados con calcio durante el almacenamiento (Manganaris y col., 2006). Los cambios producidos en estos tres

componentes durante la maduración son semejantes a los descritos en el Capítulo 3. El incremento de celulosa observado en todos los tejidos durante la etapa final de maduración de los frutos se asocia con un aumento del rendimiento de este compuesto en el RIA, resultado de la pérdida de otros compuestos como las pectinas. Las diferencias en el contenido de lignina son producto del estrés por elevada radiación solar y temperatura con apreciable incremento en los tejidos con daño por sol.

En la pared celular, los grupos carboxilos de los ácidos galacturónicos de las cadenas pectínicas se asocian con el calcio formando enlaces iónicos. Este tipo de interacción incrementa la reticulación de las pectinas mejorando la integridad de la matriz y modificando sus propiedades biofísicas. La mayor concentración de calcio se encuentra en la laminilla media, región con mayor proporción de HG y representada por la fracción PSE. Los tratamientos con calcio se han utilizado para retrasar el ablandamiento de frutos durante su maduración. En general, frutos tratados con calcio presentan una considerable reducción de la solubilización y depolimerización de pectinas en la pared celular (Ranjbar y col., 2018; Zhang y col., 2018; Ortiz y col., 2011; Liu y col., 2009; Manganaris y col., 2006; Glenn y Poovaiah, 1990). Durante la maduración, los tejidos de piel de pera Anjou analizados evidenciaron procesos de solubilización de pectinas y pérdida de cadenas laterales. Sin embargo, y coincidente a los reportes anteriormente mencionados, los tejidos S-con calcio mostraron menor solubilización de pectinas totales, manteniendo valores de AU significativamente superiores respecto de S-sin calcio durante la maduración.

En el caso de duraznos y frutillas, tratamientos postcosecha con calcio redujeron la depolimerización de pectinas, específicamente en la fracción iónicamente unida a la pared celular (Zhang y col., 2018; Liu y col., 2009). En la piel de pera Anjou, los tejidos con calcio presentaron mayor contenido de AU en las tres fracciones de pectinas; sin embargo, la fracción PSE mantuvo diferencias significativas en el contenido de AU, incluso en el postclimaterio. Estos resultados sugieren que el tratamiento con calcio pudo promover un aumento de la reticulación de las pectinas iónicamente unidas limitando el acceso de enzimas hidrolíticas como PG, o que hubo menor solubilización y depolimerización de pectinas debido a una reducción de la actividad de enzimas hidrolíticas de la pared, como PG, PME, GAL, ARF, por efecto del mayor contenido de calcio en los frutos tratados como se ha reportado previamente en frutos de manzana y pera (Ranjbar y col., 2018; Kumar y Thakur, 2017; Ortiz y col., 2011).

El efecto del tratamiento con calcio descrito en los tejidos sanos no se observó en los tejidos con daño por sol. En este caso, los tejidos L-sin calcio y L-con calcio presentaron un comportamiento similar respecto a la solubilización de las pectinas en las tres fracciones analizadas, conducta relacionada con la remodelación adaptativa de la pared inducida por el estrés por alta radiación y temperatura. Estos tejidos

presentaron un efecto más notorio del retraso de la solubilización de las pectinas comparado al efecto de los tratamientos con calcio. Esto sugiere que las modificaciones promovidas sobre la pared celular por la exposición a elevada radiación y temperatura enmascaran los efectos del calcio.

No se evidenciaron cambios considerables en las ramificaciones de las pectinas totales respecto del daño por sol y las fertilizaciones con calcio. Comportamiento análogo se describió en frutos de duraznos tratados con calcio, con valores de azúcares neutros totales similares a los frutos no tratados durante el almacenamiento (Manganaris y col., 2006, 2005). En el análisis de las fracciones pectínicas se observaron modificaciones de AN en PSA y PSH como consecuencia del daño por sol, relacionados con un retraso en la pérdida de cadenas laterales durante la maduración de los frutos (Capítulo 3).

Respecto de los tratamientos con calcio en los tejidos sanos, no se evidenciaron diferencias con relación a la firmeza y calidad de los frutos durante la maduración. Sin embargo, en los frutos tratados hubo un retraso del ablandamiento de los tejidos y menor solubilización de las pectinas en la piel. Esto puede deberse a que la eficiencia de los tratamientos de calcio precosecha dependen de las dosis del producto, el momento de aplicación como también de la especie y variedad (Mwije y col., 2020b; Mwije, 2018; Wang y col. 2014; Raese y col., 1995).

Por otro lado, el daño por sol tuvo un efecto marcado en la calidad y en la composición de la pared celular en los tejidos. Los tejidos con daño por sol leve presentaron modificaciones metabólicas y estructurales asociadas a la adquisición de tolerancia a estrés. El calcio es un elemento que participa en la respuesta de defensa a estrés y estructuralmente modifica las propiedades mecánicas de la pared celular. Es posible que los efectos de las fertilizaciones con calcio en los tejidos con daño por sol hayan sido enmascarados por la respuesta adaptativa frente al estrés por elevada radiación y temperatura.

#### **5.4.4. Fertilizaciones de calcio no afectan el metabolismo oxidativo en la piel de frutos de pera Anjou durante maduración**

El calcio es un elemento que participa en diversos procesos fisiológicos relacionados a la maduración. Algunas de sus funciones incluyen su participación como componente estructural favoreciendo la funcionalidad y estabilidad de paredes y membranas celulares, como activador o inhibidor de la actividad de enzimas particulares o como mensajero secundario participando en la regulación de procesos metabólicos (Belde y col., 2017; Aghdam y col., 2012). Distintos trabajos han expuesto el efecto benéfico de los tratamientos con calcio pre y postcosecha sobre el retraso de la senescencia de frutos. Los incrementos de calcio se han asociado con la reducción de la tasa de respiración y emisión de etileno, aumentos del contenido de

antioxidantes y disminución de la peroxidación de lípidos de membrana entre otros (Wang y col., 2014; Wójcik y col., 2014; Gong y col. 1998).

El efecto de aplicaciones de calcio vía suelo no tuvo efecto sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores. Así como tampoco se observaron diferencias en las variaciones de estos durante la maduración respecto al tratamiento sin calcio. Los cambios observados en los perfiles de clorofila, carotenoides y antocianinas responden principalmente a procesos asociados al avance de la maduración de peras verdes (Rudell y col., 2017). Estos resultados son coincidentes con reporte en peras Roche y Conference, reportando que aplicaciones foliares de calcio pre y postcosecha no afectaron parámetros de color en los frutos (Pessoa et al., 2021; Wójcik et al., 2014). En relación con el daño por sol, frutos tratados y no tratados con calcio presentaron comportamientos similares en relación con el contenido de pigmentos y su evolución durante la maduración (Capítulo 1 y 3).

En cosecha, los valores de peroxidación lipídica no presentaron diferencia en los frutos tratados con calcio, sin embargo, luego de la conservación en frío hubo un marcado incremento de MDA en los tejidos S-con calcio, alcanzando valores similares a los tejidos con daño por sol. Por otro lado, el mayor contenido de capacidad antioxidante que presentaron los tejidos sanos tratados a cosecha se vio reducido sustancialmente luego de la conservación. Estos resultados son inconsistentes, ya que se ha reportado que los tratamientos con calcio incrementan la tolerancia a distintos tipos de estrés, incluido el estrés por frío (Yadav, 2010; Yuan y col., 2018), así como al inhibir la peroxidación de lípidos de membrana y mejorar la capacidad antioxidante (Gong y col., 1998; Poovaiah y col., 1988).

Durante la maduración, no hubo cambios en la peroxidación de lípidos, la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles en los tejidos S-con calcio, L-sin calcio y L-con calcio. En los tejidos S-sin calcio, hubo un incremento sustancial y progresivo del contenido de MDA durante la maduración acompañado de un leve descenso en la capacidad antioxidante. Estos cambios se asocian con el daño oxidativo promovido por el proceso de maduración en los frutos (Dong y col., 2018). En cereza, se reportó que tratamientos con calcio no afectaron sustancialmente el contenido de MDA durante la maduración de los frutos. Sin embargo, los tratamientos con calcio promovieron la reducción de la tasa de respiración e incrementaron la capacidad de antioxidantes, así como el contenido de antocianinas y polifenoles, dependiendo la magnitud del efecto de la dosis aplicada (Wang y col. 2014). Esto sugiere que la dosis empleada y el modo de aplicación en este trabajo, pudieron no ser efectivas para promover un efecto notorio con relación al metabolismo oxidativo de los tejidos durante la madurez de los frutos.

Contrariamente, los frutos con daño por sol no presentaron un patrón de cambios en la peroxidación de lípidos y la capacidad antioxidante como los tejidos sin daño. Estos resultados permiten sugerir que el incremento en el sistema antioxidante

promovido como respuesta adaptativa al estrés por alta radiación y temperatura sufrido en campo, alivió el daño oxidativo que se produce durante la maduración, como se describió en el Capítulo 3.

### 5.5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que aplicaciones de calcio vía suelo reducen la incidencia del daño por sol leve en plantaciones de pera Anjou.

Las evaluaciones a cosecha permitieron determinar que los tratamientos con calcio vía suelo no afectaron parámetros de rendimiento, peso, color ni madurez (firmeza de pulpa, sólidos solubles, acidez titulable, degradación de almidón). Por otro lado, hubo una reducción en la incidencia del porcentaje de daño por sol leve en las parcelas tratadas. Esta mejora se asoció con un marcado incremento en la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles en los tejidos tratados con calcio. Asimismo, las fertilizaciones promovieron cambios en la composición y estructura de la matriz pectínica y hemicelulosas de la pared celular en los tejidos tratados sanos.

Durante la maduración de los frutos luego de conservación frigorífica, no hubo modificaciones en la tasa de emisión de etileno ni en la evolución de los parámetros de madurez relacionados a color, sólidos solubles y acidez titulable asociadas a los tratamientos con calcio. Sin embargo, las aplicaciones con calcio promovieron una menor caída de la firmeza de pulpa en los frutos durante la maduración. Asimismo, el calcio retrasó el ablandamiento de la piel, asociado principalmente a una menor solubilización de pectinas.

En el caso de los tejidos que presentaron daño por sol, no se observaron diferencias en los parámetros evaluados debido al tratamiento con calcio. El efecto de exposiciones a elevada radiación y temperatura sobre los frutos que promueven daño por sol desencadena respuestas metabólicas que no pudieron ser aliviadas por medio de las aplicaciones de calcio vía suelo.

### CONCLUSIONES Y FUTUROS CAMPOS DE INVESTIGACION

En la presente tesis se propuso estudiar el comportamiento metabólico de la piel de frutos de pera Anjou con daño por sol en cosecha y durante la maduración postcosecha. Este tejido constituye la primera barrera de protección en los frutos y sus propiedades y estado participan en la determinación de la calidad de éstos. Por otro lado, el daño por sol genera pérdidas económicas importantes en la producción frutícola mundial, especialmente en zonas de climas áridos a semiáridos, siendo una problemática creciente asociada al incremento de temperaturas como resultado del cambio climático.

Durante esta investigación, se realizó una exhaustiva caracterización con respecto a los cambios en los parámetros de madurez y metabolismo oxidativo y en la composición de la pared de células de la piel de los tejidos con daño por sol en frutos de pera Anjou. Se realizó una primera descripción de los tejidos con distintos niveles de daño por sol en relación con los cambios en los índices de calidad y el metabolismo oxidativo, resultados que fueron similares a los publicados en frutos de manzanas.

El principal aporte al conocimiento de este trabajo se centró en los cambios producidos en la composición y distribución de los componentes de la pared celular en tejidos afectados por el daño por sol. Además, se avanzó sobre el estudio del comportamiento de estos frutos durante la maduración, luego de la conservación frigorífica, determinando similitudes y diferencias en el comportamiento postcosecha.

Por otro lado, se evaluó el efecto de fertilizaciones cálcicas vía suelo sobre la mitigación del daño por sol en los frutos, profundizando en las posibles vías de acción del calcio como factor atenuador de estrés abiótico.

El daño por sol generó cambios a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y transcripcional en los frutos afectados. Estas modificaciones son efecto principalmente de respuestas adaptativas para sobrevivir y tolerar las condiciones desfavorables del entorno. La alteración en la distribución de microgrietas en la cutícula junto al engrosamiento de la pared celular y la reducción del tamaño celular, se asocian con cambios que limitan las pérdidas de agua en los tejidos, colaborando en la regulación del estado hídrico.

La exposición de los tejidos al estrés causado por alta irradiación y temperatura aumentó el contenido de metabolitos y enzimas antioxidantes, provocando un incremento de la capacidad antioxidante total. Sin embargo, cuando la intensidad del estrés es excesiva, estas defensas no son suficientes y por lo tanto se desencadena el daño oxidativo en el tejido que conduce al daño por sol en el fruto.

En relación con la pared celular, los tejidos afectados presentaron cambios significativos en el contenido de almidón, en la distribución de ramificaciones de las pectinas que alteran las relaciones NS/UA y en el contenido de hemicelulosas y de

lignina. Las modificaciones en la composición y distribución de los componentes de la pared celular junto al incremento de la expresión de genes de enzimas modeladoras de la pared como GAL, ARF, XET y EXP, indicaría que en los tejidos afectados por daño por sol se produce una compleja respuesta adaptativa de defensa. La determinación experimental de los cambios de expresión génica de enzimas de la pared celular bajo condiciones de elevada radiación y temperatura, similares a las producidas en campo, indica que estas modificaciones adaptativas en la pared celular se producen finalizado el evento estresante.

Asimismo, el aumento de la firmeza de pulpa, el mayor contenido de sólidos solubles y la disminución de la acidez en los tejidos afectados, podrían también formar parte de los cambios metabólicos inducidos para hacer frente a las condiciones estresantes, y no estar asociados con un avance madurativo del fruto. El comportamiento de los frutos durante la maduración contribuye a esta idea al no presentar diferencias en las tasas de emisión de etileno entre tejidos con y sin daño por sol leve, como así también valores similares de firmeza de pulpa, sólidos solubles y acidez en el climaterio, período asociado a la madurez de consumo. En la misma línea, los tejidos con daño por sol presentaron un notorio retraso en la solubilización y pérdida de cadenas laterales en las pectinas durante la maduración, ralentizando el desmontaje de la pared celular de la piel. Dicha respuesta es similar a la reportada en tratamientos postcosecha térmicos y de irradiación, que promueven la calidad y vida postcosecha de frutas y hortalizas.

Se comprobó que los tejidos con daño por sol blush y leve presentan diferencias únicamente con la coloración externa. La coloración rojiza característica del blush en pera Anjou enmascara síntomas de daño por sol. Las características y el comportamiento de los tejidos con daño blush y leve son similares en relación con parámetros de calidad, oxidativos y composición de la pared, pero notoriamente diferentes de los tejidos sin daño por sol en cosecha y postcosecha. Estos resultados sugieren que frutos con daño leve y blush deberían ser tratados de modo similar en función de su calidad y evolución postcosecha.

Finalmente, se comprobó que las fertilizaciones con calcio vía suelo reducen la incidencia del daño por sol leve en pera Anjou, asociado al incremento de la capacidad antioxidante en los frutos tratados. Durante la maduración, las fertilizaciones pre-cosecha provocan una atenuación de la caída de la firmeza de pulpa y limitan sustancialmente la solubilización de las pectinas en la piel de los frutos, sin alterar el contenido de sólidos solubles ni acidez. En los frutos afectados por daño por sol, los posibles efectos relacionados al calcio no pudieron distinguirse respecto a las modificaciones promovidas por el daño por sol en el metabolismo oxidativo y la reestructuración de la pared celular para los momentos de aplicación y dosis evaluados.

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis se considera importante profundizar en el estudio de los siguientes aspectos:

- Los cambios en la composición de la pared celular de la pulpa de frutos afectados por daño de sol durante el periodo de conservación frigorífica y maduración a temperatura ambiente.
- El valor nutricional y la calidad sensorial de frutos de pera afectados por daño de sol.
- La respuesta de daño por sol en otras variedades de pera.
- El uso del calcio para la mitigación de estrés ambiental evaluando diferentes dosis, formulaciones y momentos de aplicación.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit Jr, M.E., 1992. Fruit ripening, abscission and postharvest disorders, in: Ethylene in Plant Biology. Academic Press, pp. 182–221.
- Aghdam, M.S., Hassanpouraghdam, M.B., Paliyath, G., Farmani, B., 2012. The language of calcium in postharvest life of fruits, vegetables and flowers. *Sci Hortic* 144, 102–115. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2012.07.007>
- Airianah, O.B., Vreeburg, R.A.M., Fry, S.C., 2016. Pectic polysaccharides are attacked by hydroxyl radicals in ripening fruit: Evidence from a fluorescent fingerprinting method. *Ann Bot* 117(3), 441–455. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv192>
- Ait Barka, E., Kalantari, S., Makhlof, J., Arul, J., 2000. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Fruit. *JAgric Food Chem* 48(3), 667–671. <https://doi.org/10.1021/JF9906174>
- Allan, A.C., Fluhr, R., 2001. Ozone and reactive oxygen species. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–4. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001299>
- Andersen, Ø.M., Jordheim, M., 2010. Anthocyanins, in: *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons LTD, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001909.pub2>
- Angeletti, P., Castagnasso, H., Miceli, E., Terminiello, L., Concellón, A., Chaves, A., Vicente, A.R., 2010. Effect of preharvest calcium applications on postharvest quality, softening y cell wall degradation of two blueberry (*Vaccinium corymbosum*) varieties. *Postharvest Biol Technol* 58, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.05.015>
- Argenta, L.C., Fan, X., Mattheis, J.P., 2003. Influence of 1-methylcyclopropene on ripening, storage life, and volatile production by d' Anjou cv. pear fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3858–3864. <https://doi.org/10.1021/JF034028G>
- Awad, M.A., de Jager, A., 2002. Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. *Sci Hortic* 92, 265–276. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00290-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00290-4)
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., Molina, A., 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* 93, 614–636. <https://doi.org/10.1111/tpj.13807>

- Bakeer, S.M., 2016. Effect of ammonium nitrate fertilizer and calcium chloride foliar spray on fruit cracking and sunburn of Manfalouty pomegranate trees. *Sci Hort* 209, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.043>
- Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A., Robledo, C.W., 2008. *InfoStat Manual del Usuario*. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., Pesquet, E., 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, 115(7), 1053–1074. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv046>
- Basanta, M.F., 2013. Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Disponible en: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis\\_n5261\\_Basanta](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n5261_Basanta)
- Belge, B., Goulao, L.F., Comabella, E., Graell, J., Lara, I., 2017. Refrigerated storage and calcium dips of ripe ‘Celeste’ sweet cherry fruit: Combined effects on cell wall metabolism. *Scientia Horticulturae*, 219, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.039>
- Benítez, C.E., 2001. Cosecha y postcosecha de peras y manzanas en los valles irrigados de la Patagonia. INTA Ediciones, Buenos Aires, Argentina.
- Benítez, C.E., Castro, H.R., Ricca, A.P., Vaudagna, S.R., 2005. Peras y manzanas: Factores que afectan la calidad de los frutos. INTA Ediciones, Río Negro, Argentina.
- Billy, L., Mehinagic, E., Royer, G., Renard, C.M.G.C., Arvisenet, G., Prost, C., Jourjon, F., 2008. Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biol Technol* 47, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.07.011>
- Bizjak, J., Weber, N., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Alam, Z., Stich, K., Halbwirth, H., Veberic, R., 2013. Influence of phostrade Ca on color development y anthocyanin content of “Braeburn” apple (*Malus domestica* Borkh.). *HortSci* 48, 193–199. <https://doi.org/10.21273/hortsci.48.2.193>
- Blackhall, V., 2019. Estrés por alta radiación solar en plantas de manzano (*Malus domestica* Borkh.): Estudio del proceso de fotoquímica, estrés fotooxidativa y la influencia del estatus nutricional. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Agronómicas, Universidad Nacional del Sur, Bueno Aires, Argentina. Disponible en: <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/hyle/123456789/4567>.
- Blanch, M., Rosales, R., Goya, L., Sanchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I., Merodio, C., 2013. NADP-malic enzyme and glutathione reductase contribute to glutathione regeneration in *Fragaria vesca* fruit treated with protective high CO<sub>2</sub>

- concentrations. *Postharvest Biol Technol* 86, 431–436. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.07.033>
- Blanckenberg, A., Muller, M., Theron, K.I., Crouch, E.M., Steyn, W.J., 2016. Harvest maturity and ripeness differentially affects consumer preference of ‘Forelle’, ‘Packham’s Triumph’ and ‘Abate Fetel’ pears (*Pyrus communis* L.). *Sci Hortic* 207, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.012>
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54, 484–489.
- Bonilla, I., 2013. Capítulo 6: Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales, en: Azcón-Bieto, J., Talón, M. (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, 2da Ed., Mc Graw Hill Education. Interamericana, Madrid, España. pp. 103–122. ISBN: 978-84-481-9293-8.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brahem, M., Renard, C.M.G.C., Gouble, B., Bureau, S., Le Bourvellec, C., 2017. Characterization of tissue specific differences in cell wall polysaccharides of ripe and overripe pear fruit. *Carbohydr Polym* 156, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.019>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brardwaj, R., Handa, N., Sharma, R., Kaur, H., Kohli, S., Kumar, V., Kaur, P., 2014. Lignins and abiotic stress: An overview. En P. Ahmad, M.R. Wani (Eds.), *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment: Volume 1* (Springer, pp. 267–296). Springer New York.
- Brummell, D.A., 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33, 103–119. <https://doi.org/10.1071/FP05234>
- Brummell, D.A., Dal Cin, V., Crisosto, C.H., Labavitch, J.M., 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J Exp Bot* 55, 2029–2039. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh227>
- Brummell, D.A., Harpster, M.H., 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 47, 311–339. <https://doi.org/10.1023/A:1010656104304>
- Bu, J., Yu, Y., Aisikaer, G., Ying, T., 2013. Postharvest UV-C irradiation inhibits the production of ethylene and the activity of cell wall-degrading enzymes during

- softening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit. *Postharvest Biol Technol* 86, 337–345. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2013.07.026>
- Burton, R.A., Gidley, M.J., Fincher, G.B., 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat Chem Biol* 6, 724–732. <https://doi.org/10.1038/nchembio.439>
- Cabanne, C., Donéche, B., 2002. Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. Effect of calcium ions on polygalacturonase activity. *Microbiol Res* 157, 183–189. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00147>
- Calvo, G., 2016. El escaldado superficial en pera “Beurré d’Anjou”: etiología y desarrollo de sistemas de control. Tesis doctoral. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/144235349.pdf>
- Calvo, G., Colodner, A., 2022. Madurez a cosecha y su efecto sobre la calidad de los frutos de pepita. INTA ALTO VALLE, N°90. 5-10.
- Calvo, G., Colodner, A., Candan, A.P., 2012. Cosecha y postcosecha de frutos de pepita. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Calvo, G., Colodner, A., Rodriguez, A., Aragon, J., 2019. Cosecha de peras y manzanas. Temporada 2018-2019. Características y pautas de manejo postcosecha. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <https://www.cafi.org.ar/wp-content/uploads/2019/04/cosecha-de-peras-y-manzanas-temporada-2018-2019.pdf>
- Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J., Nunes, M.A., 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*, 160(3), 283–292. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833>
- Candan, A. P., Calvo, G. 2015. Test de degradación de almidón. EEA Alto Valle, INTA. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/test-de-degradacion-de-almidon>
- Carmona Córdova, S. J., 2016. Control de calidad de maíz morado (*Zea Mays* L.-Poaceae, raza Culli): estudio farmacobotánico, análisis de antocianos y actividad antioxidante. Tesis de maestría. Universidad de Buenos Aires, Argentina. Disponible en: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n6177\\_CarmonaCordova.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n6177_CarmonaCordova.pdf)
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>

- Carpita, N.C., Kanabus, J., 1987. Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay. *Anal Biochem* 161(1), 132–139. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90662-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90662-2)
- Carpita, N.C., Ralph, J., McCann, M.C. 2000. Chapter 2: The cell wall. In B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*, John Wiley, pp. 45–110.
- Chai, Y., Li, A., Chit Wai, S., Song, C., Zhao, Y., Duan, Y., Zhang, B., Lin, Q. 2020. Cuticular wax composition changes of 10 apple cultivars during postharvest storage. *Food Chem* 324, 126903. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126903>
- Charoenchongsuk, N., Matsumoto, D., Itai, A., Murayama, H., 2018. Ripening characteristics and pigment changes in russeted pear fruit in response to ethylene and 1-MCP. *Horticult* 4, 22. <https://doi.org/10.3390/horticulturae4030022>
- Chaudhry, S., Sidhu, G.P.S., 2022. Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: a comprehensive review, *Plant Cell Reports*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02759-5>
- Chelli-Chaabouni, A., 2014. Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment, in: Ahmad, P., Wani, M.R. (Eds.), *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment: Volume 1*. Springer New York, New York, USA. pp. 1–24. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8591-9>
- Chen, L.S.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. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0776-3>
- Chen, P.M., Mellenthin, W.M., Borgic, D.M., 1983. Changes in ripening behavior of D’Anjou pears after cold storage. *Sci Hortic* 21, 137–146. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2\\_61](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2_61)
- Chen, P.M., Spotts, R.A., 2005. Changes in ripening behaviors of 1-MCP treated D’Anjou pears after storage. *International J Fruit Sci* 5, 3–18. <https://doi.org/10.1300/J492v05n03>
- Chen, P.M., Varga, D.M., Seavert, C.F., 2003. Developing a value-added fresh-cut ‘D’Anjou’ pear product. *HortTechnol* 13, 314–320. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.13.2.0314>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ijms20236060>

- Chen, Z., Hong, X., Zhang, H., Wang, Y., Li, X., Zhu, J.K., Gong, Z., 2005. Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 43, 273–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02452.x>
- Chéour, F., Willemot, C., Arul, J., Desjardins, Y., Makhlof, J., Charest, P.M., Gosselin, A., 2019. Foliar application of calcium chloride delays postharvest ripening of strawberry. *JAmE Soci Hort Sci* 115, 789–792. <https://doi.org/10.21273/jashs.115.5.789>
- Colavita, G. M., 2022. Respuesta antioxidante y hormonal al estrés por alta radiación solar en frutos de manzana. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. <https://doi.org/10.35537/10915/133599>
- Colavita, G.M., 2008. Evaluación de la incidencia de asoleado en la producción de manzanas en la región del Alto Valle del río Negro. *Fruticultura y Diversificación* 58, 16–23.
- Colavita, G.M., Blackhall, V., Valdez, S., 2011. Effect of Kaolin particle films on the temperature and solar injury of pear fruits. *Acta Hort* 909, 609–616. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2011.909.73>
- Colavita, G.M., Curetti, M., Sosa, M.C., Vita, L.I., 2021. Chapter 2. Pear, en: Mandal, D., Wermund, U., Phavaphutanon, L., Cronje, R. (Eds.), *Temperate fruits: Production, processing and marketing*. Apple Academic Press, Series statement: Innovations in horticultural science, pp. 107–182. <https://doi.org/10.1201/9781003045861>
- Conde, A., Pimentel, D., Neves, A., Dinis, L.-T., Bernardo, S., Correia, C.M., Gerós, H., Moutinho-Pereira, J., 2016. Kaolin foliar application has a stimulatory effect on phenylpropanoid y flavonoid pathways in grape berries. *Front Plant Sci* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01150>
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cosgrove, D.J., Jarvis, M.C., 2012. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front Plant Sci* 3, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00204>
- Crisosto, C.H., Mitchell, F.G., Johnson, S., 1995. Factors in flesh market stone fruit quality. *Postharvest News y Information* 6, 17–21. Disponible en: [https://ucanr.edu/sites/Postharvest Technology Center\\_/files/231221.pdf](https://ucanr.edu/sites/Postharvest_Technology_Center_/files/231221.pdf) (17/07/2023)

- Curtis, D., Righetti, T.L., Mielke, E., Facticeau, T., 2019. Mineral analysis from corkspotted and normal 'Anjou' pear fruit. *J Amer Soc HortSci* 115, 969–974. <https://doi.org/10.21273/jashs.115.6.969>
- D'Amour, J., Gosselin, C., Arul, J., Castaigne, F., Willemot, C., 1993. Gamma-Radiation Affects Cell Wall Composition of Strawberries. *J Food Sci* 58, 182–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03239.x>
- Daiber, S.H., 2017. Quantifying changes in tree physiology after amelioration to reduce sunburn on apples. Tesis de Maestria. Faculty of Agriculture, Stellenbosch University, South African. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10019.1/100871>
- Dansa, A.M., 2018. Perfil de mercados de manzana y pera. Ministerio de Agroindustria. Área de Frutas. [https://magyp.gob.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil\\_manzanas\\_peras](https://magyp.gob.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil_manzanas_peras)
- De Vasconcelos Facundo, H.V., Gurak, P.D., Mercadante, A.Z., Lajolo, F.M., Cordenunsi, B.R., 2015. Storage at low temperature differentially affects the colour and carotenoid composition of two cultivars of banana. *Food Chem* 170, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.069>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2018. InfoStat, versión 2018. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar> (15/07/2023).
- Dias, C., Ribeiro, T., Rodríguez, A.C., Ferrante, A., Vasconcelos, M.W., Pintado, M., 2022. Cold storage demand for "Rocha" pear ripening: A comparison between a shorter and longer cold period. *Sci Hortic* 299, 111033. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111033>
- Dong, S., Beckles, D.M., 2019. Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. *J Plant Physiol* 234–235, 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.jiplph.2019.01.007>
- Dong, Y., Zhang, S., Wang, Y., 2018. Compositional changes in cell wall polyuronides y enzyme activities associated with melting/mealy textural property during ripening following long-term storage of 'Comice' and 'd'Anjou' pears. *Postharvest Biol Technol* 135, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.09.010>
- Eccher Zerbini, P., 2002. The quality of pear fruit. *Acta Hort* 805–810. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2002.596.139>
- Eklöf, J.M., Brumer, H., 2010. The XTH gene family: An update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. *Plant Physiol* 153, 456–466. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156844>

- 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. <https://doi.org/10.1021/jf990530i>
- Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T.D., Stănilă, A., Diaconeasa, Z., 2021. Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants* 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10121967>
- FAOSTAT, 2024. FAO Statistics divisions. Disponibile en: <http://faostat.fao.org> (03/06/2024)
- Farag, K.M., Nagy, N.M.N., 2012. Effect of pre-and post-harvest calcium and magnesium compounds and their combination treatments on “Anna” apple fruit quality and shelf life. *JHort Sci Ornament Plants*, 4(2), 155–168.
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E., 2008a. Changes in pigment concentrations associated with the degree of sunburn browning of “Fuji” Apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133, 27–34. <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.1.27>
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E., 2008b. Photooxidative sunburn of apples: Characterization of a third type of apple sunburn. *International Journal of Fruit Science* 8, 160–172. <https://doi.org/10.1080/15538360802526472>
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E., 2009a. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. I. Chlorophylls y carotenoids. *Plant Sci* 176, 78–83. <https://doi.org/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(1), 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.010>
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E., 2010. Postharvest changes in pigment concentrations in “Fuji” apples with “Fuji” stain. *Sci Hortic* 125, 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.004>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.04.020>
- Figueroa, C.R., Opazo, M.C., Vera, P., Arriagada, O., Díaz, M., Moya-León, M.A., 2012. Effect of postharvest treatment of calcium and auxin on cell wall composition and expression of cell wall-modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit. *Food Chem* 132(4), 2014–2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.041>

- Fonseca, S., Hackler, L., Zvara, Á., Ferreira, S., Baldé, A., Dudits, D., Pais, M.S., Puskás, L.G., 2004. Monitoring gene expression along pear fruit development, ripening and senescence using cDNA microarrays. *Plant Sci* 167, 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.033>
- Fonseca, S., Monteiro, L., Barreiro, M.G., Pais, M.S., 2005. Expression of genes encoding cell wall modifying enzymes is induced by cold storage and reflects changes in pear fruit texture. *J Exp Bot* 56, 2029–2036. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri201>
- Fry, S.C., 2010. Cell Wall Polysaccharide Composition and Covalent Crosslinking, in: *Annual Plant Reviews*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 1–42. <https://doi.org/10.1002/9781444391015.ch1>
- Fry, S.C., 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem J* 332, 507–515. <https://doi.org/10.1042/bj3320507>
- Galetto, C.D., 2006. Efecto del tratamiento previo con pectinmetilesterasa sobre la calidad de frutillas congeladas por inmersión en solución de cloruro de calcio. Tesina de Licenciatura en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Galvis Sánchez, A.C., Gil-Izquierdo, A., Gil, M.I., 2003. Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *J Sci Food Agric* 83, 995–1003. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1436>
- Gambetta, J.M., Holzapfel, B.P., Stoll, M., Friedel, M., 2021. Sunburn in grapes: A review. *Front Plant Sci* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.604691>
- Gapper, N.E., McQuinn, R.P., Giovannoni, J.J., 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Mol Biol* 82, 575–591. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0050-3>
- Gerasopoulos, D., Drogoudi, P.D., 2005. Summer-pruning and preharvest calcium chloride sprays affect storability and low temperature breakdown incidence in kiwifruit. *Postharvest Biol Technol* 36, 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.01.005>
- Gerasopoulos, D., Richardson, D.G., 1999. Storage temperature and fruit calcium alter the sequence of ripening events of “d’ Anjou” pears. *HortSci* 34, 316–318. <https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.34.2.316>
- Gerasopoulos, D., Richardson, D.G., 1996. Effects of exogenous propylene and fruit calcium on ripening of non-chilled and chilled Anjou pears. *Postharvest Biol Technol* 8, 111–120. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00067-4](https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00067-4)

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Giovannoni, J., 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu Rev Plant Physiol* 52, 725–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.725>
- Glenn, G.M., Poovaiah, B.W., 1990. Calcium mediated postharvest changes in texture and cell wall structure and composition in “Golden Delicious” apples. *Journal of the Amer Soc Hort Sci* 115, 962–968. <https://doi.org/10.21273/JASHS.115.6.962>
- Gong, M., Li, Y.J., Chen, S.Z., 1998. Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *J Plant Physiol* 153(3–4), 488–496. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80179-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80179-X)
- Gorriti, A.G., Quispe, F.J., Arroyo, A.J.L., Córdova, A.R., Jurado, B.T., Santiago, I.A., Taype, E.E., 2009. Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays* L. Maíz morado. *Cienc Invest* 12, 64–74. <https://doi.org/10.15381/ci.v12i2.3395>
- Gulen, H., Eris, A., 2004. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Sci* 166, 739–744. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2003.11.014>
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Han, Y., Han, S., Ban, Q., He, Y., Jin, M., Rao, J., 2017. Overexpression of persimmon DkXTH1 enhanced tolerance to abiotic stress and delayed fruit softening in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 36, 583–596. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2105-4>
- Hansen, M., 2005. Most skin disorders are linked to sunburn. *Good Fruit Grower* 1–2.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Al Mahmud, J., Fujita, M., Fotopoulos, V., 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9, 1–52. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Teixeira da Silva, J.A., Fujita, M., 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense, in: Venkateswarlu, B., Shanker, A.K., Shanker, C., Maheswari, M. (Eds.), *Crop Stress and its management: Perspectives and strategies*. Springer Netherlys, Dordrecht, pp. 261–316. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0>

- Hellebrand, H.J., Beuche, H., Linke, M., Herold, B., Geyer, M., 2001. Chances and shortcomings of thermal imaging in the evaluation of horticultural products. International Conference Physical Methods in Agriculture-Approach to Precision and Quality, Prague 95, 27–30.
- 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 87, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.08.003>
- Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y., 2003a. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. J Exp Bot 54, 771–779. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg073>
- Hiwasa, K., Rose, J.K.C.C., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y., 2003b. Differential expression of seven  $\alpha$ -expansin genes during growth and ripening of pear fruit. Plant 117, 564–572. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00064.x>
- Hiwasa, K., Nakano, R., Hashimoto, A., Matsuzaki, M., Murayama, H., Inaba, A., Kubo, Y., 2004. European, Chinese and Japanese pear fruits exhibit differential softening characteristics during ripening. J Exp Bot 55, 2281–2290. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh250>
- Hocking, B., Tyerman, S.D., Burton, R.A., Gilliham, M., 2016. Fruit calcium: Transport and physiology. Front Plant Sci 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00569>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Honaas, L., Kahn, E., 2017. A practical examination of RNA isolation methods for European pear (*Pyrus communis*). BMC Res Notes 10, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2564-2>
- Huang, J., Zhao, X., Chory, J., 2019. The arabidopsis transcriptome responds specifically and dynamically to high light stress. Cell Rep 29, 4186–4199.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.051>
- Iamsub, K., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H., Kamuro, Y., 2009. Alleviating sunburn injury in apple fruit using natural and fertilizer forms of S-abcisic acid and its underlying mechanism. J Food Agric Environ 7, 446–452.
- INDEC, 2021. Comercio exterior. Complejos exportadores. Buenos Aires, Argentina.

- Itai, A., Yoshida, K., Tanabe, K., Tamura, F., 1999. A  $\beta$ -D-xylosidase-like gene is expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). J Exp Bot 50, 877–878. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.335.877>
- Jaime de Pablo, V., Giacinti Battistuzzi, M.A., 2014. Complejidad en el comercio mundial de peras. Rev Fac Cienc Agrar 46, 125–141. ISSN 1853-8665. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1853-86652014000100010&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1853-86652014000100010&script=sci_arttext&tlng=en)
- Javelle, M., Vernoud, V., Rogowsky, P.M., Ingram, G.C., 2011. Epidermis: The formation and functions of a fundamental plant tissue. New Phytol 189, 17–39. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03514.x>
- Kazem, A., Hassan, K., Mohamad-Jafar, M., Mohsen, B., 2008. Postharvest physicochemical changes and properties of Asian (*Pyrus serotina* Rehd.) and European (*Pyrus communis* L.) pear cultivars. Hort. Environ. Biotechnol. 49(4), 244–252. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Kazem-Arzani/publication/236975345\\_Postharvest\\_physicochemical\\_changes\\_y\\_properties\\_of\\_Asian\\_Pyrus\\_serotina\\_Rehd\\_European\\_Pyrus\\_communis\\_L\\_pear\\_cultivars/links/0deec51a962dbc9ec9000000/Postharvest-physicochemical-changes-y-properties-of-Asian-Pyrus-serotina-Rehd-European-Pyrus-communis-L-pear-cultivars.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Kazem-Arzani/publication/236975345_Postharvest_physicochemical_changes_y_properties_of_Asian_Pyrus_serotina_Rehd_European_Pyrus_communis_L_pear_cultivars/links/0deec51a962dbc9ec9000000/Postharvest-physicochemical-changes-y-properties-of-Asian-Pyrus-serotina-Rehd-European-Pyrus-communis-L-pear-cultivars.pdf)
- Ketsa, S., Atantee, S., 1998. Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. Postharvest Biol Technol 14, 117–124. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00026-X)
- Klein, J.D., Lurie, S., Ben-Arie, R., 1990. Quality and Cell Wall Components of ‘Anna’ and ‘Granny Smith’ Apples Treated with Heat, Calcium, and Ethylene. Journal of the American Society for Horticultural Science 115, 954–958. <https://doi.org/10.21273/JASHS.115.6.954>
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.J., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 23, 185–202. <https://doi.org/10.1002/YEA.1349>
- Konarska, A., 2014. Morphological, histological and ultrastructural changes in fruit epidermis of apple *Malus domestica* cv. Ligol (*Rosaceae*) at fruit set, maturity and storage. Acta Biol Crac Ser Bot 56, 35–48. <https://doi.org/10.2478/abcsb-2014-0019>
- Konarska, A., 2013. The relationship between the morphology and structure and the quality of fruits of two pear cultivars (*Pyrus communis* L.) during their development and maturation. Sci World J 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/846796>
- Kumar, S., Thakur, K.S., 2017. Influence of post-harvest calcium chloride treatments on physico-chemical and sensory attributes of pear cv. ‘Bartlett’ under ambient

- storage conditions. *Appl Biol Res* 19, 270. <https://doi.org/10.5958/0974-4517.2017.00040.4>
- Lagunes, E., Zavaleta, E., 2015. Función de la lignina en la interacción planta-nematodos endoparásitos sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathol* 43–63. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1506-7>
- Lal, N., Sahu, N., 2017. Management strategies of sun burn in fruit crops-A Review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 6, 1126–1138. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.131>
- Langer, S.E., Oviedo, N.C., Marina, M., Burgos, J.L., Martínez, G.A., Civello, P.M., Villarreal, N.M., 2018. Effects of heat treatment on enzyme activity and expression of key genes controlling cell wall remodeling in strawberry fruit. *Plant Physiol Biochem* 130, 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.015>
- Lara, I., García, P., Vendrell, M., 2006. Post-harvest heat treatments modify cell wall composition of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit. *Sci Hortic* 109, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.03.001>
- Larkindale, J., Huang, B., 2004. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: Involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J Plant Physiol* 161, 405–413. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01239>
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.M., Gillet, F., Pelloux, J., Rayon, C., 2015. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* 4, 112–166. <https://doi.org/10.3390/plants4010112>
- Li, M., Zhi, H., Dong, Y., 2019. Textural property and cell wall metabolism of ‘Golden Bosc’ and ‘d’Anjou’ pears as influenced by oxygen regimes after long-term controlled atmosphere storage. *Postharvest Biol Technol* 151, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.01.010>
- Li, P., Castagnoli, S., Cheng, L., 2008. Red “Anjou” pear has a higher photoprotective capacity than green “Anjou.” *Physiol Plant* 134, 486–498. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01155.x>
- Li, P., Zhang, Y., Einhorn, T.C., Cheng, L., 2014. Comparison of phenolic metabolism and primary metabolism between green “Anjou” pear and its bud mutation, red “Anjou.” *Physiol Plant* 150, 339–354. <https://doi.org/10.1111/ppl.12105>
- Li, S., Liu, S., Lin, X., Grierson, D., Yin, X., Chen, K., 2022. Citrus heat shock transcription factor CitHsfA7-mediated citric acid degradation in response to heat stress. *Plant Cell Environ* 45, 95–104. <https://doi.org/10.1111/pce.14207>

- Li, Xia, Li, Xuejiao, Wang, T., Gao, W., 2016. Nutritional composition of pear cultivars (*Pyrus* spp.), en: Nutritional composition of fruit cultivars. Elsevier, pp. 573–608. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00024-6>
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Curr Prot Food Anal Chem* 1, F4.3.1-F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Liepmann, A.H., Wightman, R., Geshi, N., Turner, S.R., Scheller, H.V., 2010. Arabidopsis - A powerful model system for plant cell wall research. *Plant J* 61, 1107–1121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04161.x>
- Lima, R.B., Dos Santos, T.B., Vieira, L.G.E., Ferrarese, M.D.L.L., Ferrarese-Filho, O., Donatti, L., Boeger, M.R.T., Petkowicz, C.L.D.O., 2013. Heat stress causes alterations in the cell-wall polymers and anatomy of coffee leaves (*Coffea arabica* L.). *Carbohydr Polym* 93, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.015>
- Lindo-García, V., Larrigaudière, C., Echeverría, G., Murayama, H., Soria, Y., Giné-Bordonaba, J., 2019. New insights on the ripening pattern of ‘Blanquilla’ pears: A comparison between on- and off-tree ripened fruit. *Postharvest Biol Technol* 150, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.12.013>
- Lindo-García, V., Giné-Bordonaba, J., Leclerc, C., Ubach, D., Larrigaudière, C., 2020a. The relationship between ethylene- and oxidative-related markers at harvest with the susceptibility of pears to develop superficial scald. *Postharvest Biol Technol* 163, 111135. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111135>
- Lindo-García, V., Muñoz, P., Larrigaudière, C., Munné-Bosch, S., Giné-Bordonaba, J., 2020b. Interplay between hormones and assimilates during pear development and ripening and its relationship with the fruit postharvest behaviour. *Plant Science* 291, 110339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110339>
- Liu, H., Chen, F., Yang, H., Tao, Y., Gong, X., Xin, Y., Ding, C., 2009. Effect of calcium treatment on nanostructure of chelate-soluble pectin and physicochemical and textural properties of apricot fruits. *Food Res Int* 42, 1131–1140. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2009.05.014>
- Liu, H., Chen, F., Lai, S., Tao, J., Yang, H., Jiao, Z. 2017. Effects of calcium treatment and low temperature storage on cell wall polysaccharide nanostructures and quality of postharvest apricot (*Prunus armeniaca*). *Food Chem* 225, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.008>
- Liu, Y., Chen, N., Zuo, C., Wu, Y., Che, F., Chen, B., 2019. The mechanism of color fading in sunburned apple peel. *Acta Physiol Plant* 41, 0. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2792-7>

- Lolicato, S., 2011. Sun Protection for Fruit. A practical manual for preventing sunburn on fruit. Department of Primary Industries, Farm Services Victoria Division. Disponible en: <http://mvcitrus.org.au/mvcb/wp-content/uploads/2012/09/Sun-Protection-Manual-for-Fruit.pdf> (17/07/2023)
- López Barrios, J.C., 2020. Sector frutales de pepita. Dirección Nacional de Agricultura, Subsecretaría de Agricultura, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sector-frutales-de-pepita-oct-2020.pdf> (17/07/2023)
- Lötze, E., Daiber, S., Midgley, S.J.E., 2018. Evaluating the efficacy of a preharvest combination of calcium and boron as foliar application to reduce sunburn on 'Cripps Pink' apples. *Acta Hort* 61–68. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1217.7>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00277-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00277-2)
- MacLean, D.D., Murr, D.P., DeEll, J.R., Mackay, A.B., Kupferman, E.M., 2007. Inhibition of PAL, CHS, and ERS1 in "Red d'Anjou" Pear (*Pyrus communis* L.) by 1-MCP. *Postharvest Biol Technol* 45, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.007>
- Makredza, B., Marais, H., Schmeisser, M., Lötze, E., Steyn, W.J., 2015. Ripening associated red color development masks sunburn browning in apple peel. *HortSci* 50, 814–818. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.6.814>
- Malaspina, M.L., Podgornik, G., Ponce, V., Cabrapan, V., Malaspina, M.M., 2015. El rol de Argentina en el mercado mundial de la pera desecada. Asociación Argentina de Economía Agraria. Río Negro, Argentina. 1-18.
- Manganaris, G.A., Vasilakakis, M., Diamantidis, G., Mignani, I., 2006. Effect of in-season calcium applications on cell wall physicochemical properties of nectarine fruit (*Prunus persica* var. nectarina Ait. Maxim) after harvest or cold storage. *J Sci Food Agric* 86, 2597–2602. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2654>
- Manganaris, G.A., Vasilakakis, M., Mignani, I., Diamantidis, G., Tzavella-Klonari, K., 2005. The effect of preharvest calcium sprays on quality attributes, physicochemical aspects of cell wall components and susceptibility to brown rot of peach fruits (*Prunus persica* L. cv. Andross). *Sci Hortic* 107, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.06.005>

- Marschner, H., 1995. 8. Functions of mineral nutrients: Macronutrients, en: Marschner, H. (Ed.), Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press Limited, San Diego, U.S., pp. 229–312. ISBN 0-12-473542-8.
- Martin-Cabrejas, M., Waldron, K.W., Selvendran, R.R., 1994. Cell wall changes in spanish pear during ripening. *J Plant Physiol* 144, 541–548. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82135-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82135-8)
- McClymont, L., Goodwin, I., Turpin, S., Darbyshire, R., 2016. Fruit surface temperature of red-blushed pear: threshold for sunburn damage. *New Zeal J Crop Hortic Sci* 44, 262–273. <https://doi.org/10.1080/01140671.2016.1216867>
- McTavish, C.K., Poirier, B.C., Torres, C.A., Mattheis, J.P., Rudell, D.R., 2020. A convergence of sunlight and cold chain: The influence of sun exposure on postharvest apple peel metabolism. *Postharvest Biol Technol* 164. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111164>
- Mengel, K., Kirkby, E.A., 2000. Capítulo 11: Calcio, en: Mengel, K., Kirkby, E.A. (Eds.), Principios de nutrición vegetal. Instituto Internacional del Potasio, Basilea, Suiza, pp. 415–423.
- Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., 2000. Light-stress-induced pigment changes y evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *J Photochem Photobiol B* 55, 155–163. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00042-7)
- Merzlyak, M.N., Gitelson, A.A., Pogosyan, S.I., Lekhimena, L., Chivkunova, O.B., 1998. Light-induced pigment degradation in leaves and ripening fruits studied in situ with reflectance spectroscopy. *Physiol Plant* 104, 661–667. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040420.x>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01408-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01408-0)
- Mesa Juliani, K.F., 2015. Starch distribution in pear tree organs in relation to training systems, rootstocks y fruit quality (Doctoral). Tesis Doctoral. Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari, Università di Bologna, Italy. <https://doi.org/10.6092/unibo/amsdottorato/7158>
- Ministerio de Agricultura, 2018. Protocolo de calidad para peras frescas, Código SAA 047, Versión 05. Argentina.
- Mishra, N.P., Mishra, R.K., Singhal, 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. <https://doi.org/10.1104/pp.102.3.903>

- Mitcham, B., Cantwell, M., Kader, A., 1996. Methods for determining quality of fresh commodities. *Perishables Hand News* 1–5.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7, 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mittler, R., Vyperauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vyperoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F., 2011. ROS signaling: The new wave?. *Trends Plant Sci* 16, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Monge, E., Val, J., Sanz, M., Blanco, A., Montañes, L., 1994. El calcio nutriente para las plantas. Bitter pit en manzano. *An. Estac. Exp. Aula Dei* 21, 189–201. Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/4021/1/analesv.21n.3-1995-Especial50.pdf#page=80>
- 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* 260, 108866. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108866>
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125, 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Munné-Bosch, S., Vincent, C., 2019. Physiological mechanisms underlying fruit sunburn. *Crit Rev Plant Sci* 38, 140–157. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1613320>
- Mupambi, G., Anthony, B.M., Layne, D.R., Musacchi, S., Serra, S., Schmidt, T., Kalcsits, L.A., 2018. The influence of protective netting on tree physiology and fruit quality of apple: A review. *Sci Hortic* 236, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.014>
- Murayama, H., Katsumata, T., Endou, H., Fukushima, T., Sakurai, N., 2006. Effect of storage period on the molecular-mass distribution profile of pectic and hemicellulosic polysaccharides in pears. *Postharvest Biol Technol* 40, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.01.001>
- Murayama, H., Katsumata, T., Horiuchi, O., Fukushima, T., 2002. Relationship between fruit softening and cell wall polysaccharides in pears after different storage periods. *Postharvest Biol Technol* 26, 15–21. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00200-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00200-9)
- Murcia, G., Fontana, A., Pontin, M., Baraldi, R., Bertazza, G., Piccoli, P.N., 2017. ABA y GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. *Phytochem* 135, 34–52. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.007>

- Murray, X.J., Holcroft, D.M., Cook, N.C., Wand, S.J.E., 2005. Postharvest quality of “Laetitia” and “Songold” (*Prunus salicina* Lindell) plums as affected by preharvest shading treatments. *Postharvest Biol Technol* 37, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.02.014>
- Musacchi, S., Serra, S., 2018. Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Sci Hort* 234, 409–430. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.057>
- Mwaniki, M.W., Mathooko, F.M., Hiwasa, K., Tateishi, A., Yokotani, N., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y., 2007.  $\beta$ -Galactosidase and  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase activities and gene expression in European and Chinese pear fruit during ripening. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 76, 85–90. <https://doi.org/10.2503/jjshs.76.85>
- Mwije, A., 2018. A study on the dynamics of sunburn reduction in apple (*Malus domestica*) using foliar applications of a combination of boron y calcium. Tesis Doctoral. Department of Horticulture, Stellenbosch University. Stellenbosch, Sudáfrica. Disponible en: <http://hdl.hyle.net/10019.1/107846>
- Mwije, A., Hoffman, E.W., Lötze, E., 2020a. Apple peel biochemical changes after foliar application of combined boron and calcium I. Phenolics and physico-chemical attributes. *Amer J Plant Sci* 11, 965–986. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.116069>
- Mwije, A., Hoffman, E.W., Lötze, E., 2020b. Apple peel biochemical changes after foliar application of combined boron and calcium II. Photosynthetic pigments, total peroxides and photochemical efficiency. *Amer J Plant Sci* 11, 939–964. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.116068>
- Nara, K., Kato, Y., Motomura, Y., 2001. Involvement of terminal-arabinose and -galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage. *Postharvest Biol Technol* 22, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00193-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00193-9)
- Nashima, K., Shimizu, T., Nishitani, C., Yamamoto, T., Takahashi, H., Nakazono, M., Itai, A., Isuzugawa, K., Hanada, T., Takashina, T., Matsumoto, S., Otagaki, S., Oikawa, A., Shiratake, K., 2013. Microarray analysis of gene expression patterns during fruit development in European pear (*Pyrus communis*). *Sci Hort* 164, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.054>
- Neutelings, G., 2011. Lignin variability in plant cell walls: Contribution of new models. *Plant Sci* 181, 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.06.012>
- Ngo, T.X., 2007. Understanding the principles and procedures to retain green and red pigments in thermally processed peels-on pears (*Pyrus communis* L.). Tesis Doctoral. Oregon State University, Estados Unidos. Disponible en:

- [https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate\\_thesis\\_or\\_dissertations/xs55mg053](https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/xs55mg053)
- Ngo, T.X., Zhao, Y., 2009. Stabilization of anthocyanins on thermally processed red D’Anjou pears through complexation and polymerization. *LWT - Food Science and Technology* 42, 1144–1152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.013>
- Novaković, L., Guo, T., Bacic, A., Sampathkumar, A., Johnson, K.L., 2018. Hitting the wall—sensing  $\gamma$  signaling pathways involved in plant cell wall remodeling in response to abiotic stress. *Plants* 7, 1–25. <https://doi.org/10.3390/plants7040089>
- Olmedo, P., Zepeda, B., Rojas, B., Silva-Sanzana, C., Delgado-Rioseco, J., Fernández, K., Balic, I., Arriagada, C., Moreno, A.A., Defilippi, B.G., Campos-Vargas, R., 2021. Cell wall calcium and hemicellulose have a role in the fruit firmness during storage of blueberry (*Vaccinium spp.*). *Plants* 10, 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10030553>
- Ortiz, A., Graell, J., Lara, I., 2011. Preharvest calcium applications inhibit some cell wall-modifying enzyme activities and delay cell wall disassembly at commercial harvest of ‘Fuji Kiku-8’ apples. *Postharvest Biol Technol* 62, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.04.014>
- Orús, A., 2023. Volumen de fruta fresca consumida a nivel mundial en 2022, por tipo. Statista Search Department. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/1309004/consumo-mundial-de-fruta-frescas-a-nivel-mundial-por-tipo/> (03/06/2024)
- Palta, J.P., 1996. Role of calcium in plant responses to stresses: Linking basic research to the solution of practical problems. *HortSci* 31, 51–57. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.1.51>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
- Parajuli, R., Thoma, G., Matlock, M.D., 2019. Environmental sustainability of fruit and vegetable production supply chains in the face of climate change: A review. *Science of the Total Environment* 650, 2863–2879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.019>
- Paull, R.E., Jung Chen, N., 2000. Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biol Technol* 21, 21–37. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00162-9)
- Peavey, M., McClymont, L., Scalisi, A., Goodwin, I., 2022. Netting of different shade factors affect light penetration, fruit  $\gamma$  vegetative growth, yield  $\gamma$  fruit quality in

- an Australian blush pear. *Sci Hort* 299, 111001.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2022.111001>
- Pessoa, C.C., Coelho, A.R.F., Marques, A.C., Luís, I.C., Daccak, D., Silva, M.M., Ramalho, J.C., Simões, M., Reboredo, F.H., Pessoa, M.F., Legoinha, P., Scotti Campos, P., Pais, I.P., Lidon, F.C., 2021. Increase of calcium in 'Rocha' pear (*Pyrus communis* L.) for development of functional Foods. *Biol Life Sci Forum* 4, 1-6.  
<https://doi.org/10.3390/iecps2020-08668>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002–2007.  
<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Piskolczi, M., Varga, C., Racsko, J., 2004. A review of the meteorological causes of sunburn injury on the surface of apple fruit (*Malus domestica* BORKH). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 12, 245–252. Disponible en:  
[http://www.inhort.pl/files/journal\\_pdf/journal\\_2004spec/full2004-28spec.pdf](http://www.inhort.pl/files/journal_pdf/journal_2004spec/full2004-28spec.pdf)
- Polito, V.S., Larson, K.D., Pinney, K., 2002. Anatomical and histochemical factors associated with bronzing development in strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127, 355–357.  
<https://doi.org/10.21273/JASHS.127.3.355>
- Pombo, M.A., Dotto, M.C., Martínez, G.A., Civello, P.M., 2009. UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation. *Postharvest Biol Technol* 51, 141–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.07.007>
- Poovaliah, B.W., 1986. Role of calcium in prolonging storage life of fruits y vegetables. *Food Technol*.
- Poovaliah, B.W., Glenn, G.M., Reddy, A.S.N., 1988. Calcium and fruit softening: Physiology and biochemistry. In *Hort Rev Nor* 107–152  
<https://doi.org/10.1002/9781118060834.ch4>
- Portalfruticola.com, 2011. Argentina: Este año el asoleado causó más daños a la fruta. *PortalFruticola.com* 29–30.
- Predieri, S., Gatti, E., 2009. Effects of cold storage and shelf-life on sensory quality and consumer acceptance of "Abate Fetel" pears. *Postharvest Biol Technol* 51, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.006>
- Quinet, M., Wesel, J.P., 2019. Botany y taxonomy of pear. In: Korban, S. (eds) *The Pear Genome. Compendium of plant genomes*. Springer, Cham.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-11048-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11048-2_1)

- Racskó, J., Schrader, L.E., 2012. Sunburn of apple fruit: historical background, recent advances y future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 31, 455–504. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.696453>
- Racskó, J., Szabó, Z., Nyéki, J., 2005. Importance of the supraoptimal radiance supply and sunburn effects on apple fruit quality. *Acta Biol Szeged* 49, 111–114.
- Raese, J.T., Drake, S.R., Staiff, D.C., 1995. Influence of different calcium materials and spray timing on mineral composition, yield, fruit quality, and control of fruit disorders of ‘anjou’ pears. *J Plant Nutr* 18, 823–838. <https://doi.org/10.1080/01904169509364941>
- Raese, J.T., Drake, S.R., 2006. Calcium foliar sprays for control of alfalfa greening, cork spot, and hard end in “Anjou” pears. *J Plant Nutr* 29(3), 543–552. <https://doi.org/10.1080/01904160500526683>
- Raese, J.T., Staiff, D.C., 1990. Fruit calcium, quality and disorders of apples (*Malus domestica*) and pears (*Pyrus communis*) influenced by fertilizers. In *Plant Nutrition - Physiology and Applications* (pp. 619–623). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0585-6\\_104](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0585-6_104)
- Raffo, M.D., 2013. La constitución de la pared celular durante la madurez en planta de pera Bartlett y sus modificaciones por la incidencia de luz. Consecuencias sobre la eficacia de los tratamientos con 1-metilciclopropeno. Tesis doctoral. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/doctorado/2013raffobenegasdolores.pdf>
- Raffo, M.D., Iglesias, N., 2004. Efecto de la intercepción y distribución de la radiación fotosintéticamente activa en manzanos cv. Fuji, bajo cuatro sistemas de conducción en alta densidad. *RIA* 33, 29–42.
- Raffo, M.D., Ponce, N.M.A., Sozzi, G.O., Stortz, C.A., Vicente, A.R., 2012. Changes on the cell wall composition of tree-ripened “Bartlett” pears (*Pyrus communis* L.). *Postharvest Biol Technol* 73, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.06.002>
- Raffo, M.D., Ponce, N.M.A., Sozzi, G.O., Vicente, A.R., Stortz, C.A., 2011. Compositional changes in Bartlett pear (*Pyrus communis* L.) cell wall polysaccharides as affected by sunlight conditions. *J Agric Food Chem* 59, 12155–12162. <https://doi.org/10.1021/jf203950d>
- Ranjbar, S., Rahemi, M., Ramezani, A., 2018. Comparison of nano-calcium and calcium chloride spray on postharvest quality and cell wall enzymes activity in apple cv. Red Delicious. *Sci Hortic* 240, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.035>

- Renard, C.M.G.C., Ginies, C., 2009. Comparison of the cell wall composition for flesh y skin from five different plums. *Food Chem* 114, 1042–1049. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.073>
- Robertson, D., 2013. Modulating plant calcium for better nutrition and stress tolerance. *ISRN Botany* 2013, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2013/952043>
- Rodríguez, A., Muñoz, A., 2006. Síntesis Agrometeorológica para el período 1990 - 2004 EEA INTA Alto Valle. *Boletín de Divulgaciones Técnicas* N°53. Río Negro, Argentina.
- Rodríguez, A., Muñoz, A., 2022. Variabilidad agroclimática en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. *Análisis de los últimos 50 años*, Ediciones INTA. Río Negro, Argentina.
- Roeber, V.M., Bajaj, I., Rohde, M., Schmülling, T., Cortleven, A., 2021. Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants. *Plant Cell Environ* 44, 645–664. <https://doi.org/10.1111/pce.13948>
- Rosli, H.G., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiol Biochem* 42, 823–831. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.10.002>
- Roy, S., Conway, W.S., Watada, A.E., Sams, C.E., Erbe, E.F., Wergin, W.P., 1994. Heat treatment affects epicuticular wax structure and postharvest calcium uptake in “Golden Delicious” apples. *HortSci* 29, 1056–1058. <https://doi.org/10.21273/hortsci.29.9.1056>
- Rudell, D.R., Serra, S., Sullivan, N., Mattheis, J.P., Musacchi, S., 2017. Survey of ‘d’Anjou’ pear metabolic profile following harvest from different canopy positions and fruit tissues. *HortSci* 52, 1501–1510. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12375-17>
- Sajid, M., Basit, A., Ullah, I., Tareen, J., Asif, M., Khan, S., Ali, Q.S., Gilani, S.A.Q., Zeb, S., Nawaz, M.K., 2019. Efficiency of calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) treatment on post-harvest performance of pear (*Pyrus communis* L.). *Pesqui Agropecu Bras* 8, 1111–1125. <https://doi.org/10.19045/bspab.2019.80053>
- Sakhonwasee, S., Phingkasan, W., 2017. Effects of the foliar application of calcium on photosynthesis, reactive oxygen species production, y changes in water relations in tomato seedlings under heat stress. *Hortic Environ Biotechnol* 58, 119–126. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0194-1>
- Saladin, G., Magné, C., Clément, C., 2003. Effects of flumioxazin herbicide on carbon nutrition of *Vitis vinifera* L. *J Agric Food Chem* 51, 4017–4022. <https://doi.org/10.1021/jf034336e>

- Sampedro, J., Cosgrove, D.J., 2005. Protein family review: The expansin superfamily 1–11. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-12-242>
- Santin, M., Giordani, T., Cavallini, A., Bernardi, R., Castagna, A., Hauser, M.T., Ranieri, A., 2019. UV-B exposure reduces the activity of several cell wall-dismantling enzymes and affects the expression of their biosynthetic genes in peach fruit (*Prunus persica* L., cv. Fairtime, melting phenotype). *Photochem Photobiol Sci* 18, 1280–1289. <https://doi.org/10.1039/C8PP00505B>
- Saquet, A.A., 2019. Storage of pears. *Sci Hortic* 246, 1009–1016. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.091>
- Sasidharan, R., Voesenek, L.A.C.J., Pierik, R., 2011. Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. *Crit Rev Plant Sci* 30, 548–562. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615706>
- Schrader, L.E., Sun, J., Felicetti, D.A., Seo, J.-H., Jedlow, L., Zhang, J., 2003. Stress-induced disorders: Effects on apple fruit quality. In *Proceedings of the Washington Tree Fruit Postharvest Conference*, Wenatchee, Washington, USA. 1-7.
- Schrader, L.E., Sun, J., Zhang, J., Felicetti, D.A., Tianz, J., 2008. Heat y light-induced apple skin disorders: Causes y prevention. *Acta Hort* 772, 51–58. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.772.5>
- Schrader, L.E., Zhang, J., Duplaga, W.K., 2001. Two types of sunburn in apple caused by high fruit surface (peel) temperature. *Plant Health Prog* 2. <https://doi.org/10.1094/php-2001-1004-01-rs>
- Schrader, L.E., Zhang, J., Sun, J., Xu, J., Elfving, D.C., Kahn, C., 2009. Postharvest changes in internal fruit quality in apples with sunburn browning. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134, 148–155. <https://doi.org/10.21273/JASHS.134.1.148>
- Segado, P., Domínguez, E., Heredia, A., 2016. Ultrastructure of the epidermal cell wall and cuticle of tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.) during development. *Plant Physiol* 170, 935–946. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01725>
- Seifert, G.J., Blaukopf, C., 2010. Irritable walls: The plant extracellular matrix y signaling. *Plant Physiol* 153, 467–478. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153940>
- SENASA, 2021. Anuario Estadístico 2021, Centro Regional Patagonia Norte. General Roca, Río Negro, Argentina.
- Serra, S., Goke, A., Diako, C., Vixie, B., Ross, C., Musacchi, S., 2019. Consumer perception of d’Anjou pear classified by dry matter at harvest using near-infrared spectroscopy. *International J Food Sci Technol* 54 (6), 2256-2265. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14140>

- Serra, S., Sullivan, N., Mattheis, J.P., Musacchi, S., Rudell, D.R., 2018. Canopy attachment position influences metabolism and peel constituency of European pear fruit. *BMC Plant Biol* 18, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1544-6>
- Shalom, N. Ben, Hanzon, J., Klein, J.D., Lurie, S., 1993. A postharvest heat treatment inhibits cell wall degradation in apples during storage. *Phytochem* 34, 955–958. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90693-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90693-9)
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Lyi, M., Zheng, B., 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molec* 24, 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Sharma, I., Ahmad, P., 2014. Chapter 4: Catalase: A versatile antioxidant in plants, en: Ahmad, P. (Ed.), *Oxidative damage to plants*. Elsevier, pp. 131–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>
- Sharma, K., 2020. Impact of different chemicals on the post harvest quality of pear (*Pyrus spp* L.) Fruit: a review. *International Journal on Agricultural Sciences* 11, 74–80. <https://doi.org/10.53390/ijas.v11i2.4>
- 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. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sharma, R.R., Pal, R.K., Singh, D., Singh, J., Dhiman, M.R., Rana, M.R., 2012. Relationships between storage disorders and fruit calcium contents, lipoxygenase activity, and rates of ethylene evolution and respiration in ‘Royal Delicious’ apple (*Malus × domestica* Borkh.). *J Hortic Sci Biotechnol* 87, 367–373. <https://doi.org/10.1080/14620316.2012.11512878>
- Siddiq, R., Auras, R., Siddiq, M., Dolan, K.D., Harte, B., 2020. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) and NatureSeal® treatment on the physico-chemical, microbiological, and sensory quality of fresh-cut d’Anjou pears. *Food Packag Shelf Life* 23, 100454. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2019.100454>
- Singh, A., Kumar, A., Yadav, S., Singh, I.K., 2019. Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress. *Plant Gene* 18, 100173. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100173>
- Solovchenko, A., Merzlyak, M., 2003. Optical properties and contribution of cuticle to UV protection in plants: Experiments with apple fruit. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2, 861–866. <https://doi.org/10.1039/b302478d>
- Somerville, C., 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 53–78. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.022206.160206>

- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H., 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- Song, L., Wang, Zhigang, Wang, Zhimin, Meng, G., Zhai, R., Cai, M., Ma, F., Xu, L., 2016. Screening of cell wall-related genes that are expressed differentially during ripening of pears with different softening characteristics. *Postharvest Biol Technol* 115, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.012>
- Sosa, M.C., Lutz, M.C., 2020. Enfermedades del peral (*Pyrus communis*) en montes comerciales de la Norpatagonia Argentina. *Boletín de la Asociación Argentina de Fitopatólogos* N° 6, 1-9. ISSN 2618-1932. Disponible en: <http://aafitopatologos.com.ar/wp/wp-content/uploads/2014/11/Boletin-N6-Agosto-2020.pdf>
- Spinardi, A., 2005. Effect of harvest date y storage on antioxidant systems in pears. *Acta Hort* 682, 135–140. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.682.11>
- Steimbregger, N.G., 2008. Geografía y sociología de la movilidad del capital global en procesos de reestructuración de las cadenas de valor agrícola. Una investigación sobre el norte de la Patagonia. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=165613>
- Steyn, W.J., Holcroft, D.M., Wy, S.J.E., Jacobs, G., 2004a. Anthocyanin degradation in detached pome fruit with reference to preharvest red color loss and pigmentation patterns of blushed and fully red pears. *J Amer Soc Hort Sci* 129, 13–19. <https://doi.org/10.21273/JASHS.129.1.0013>
- Steyn, Willem J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M., Jacobs, G., 2004b. Red colour development and loss in pears. *Acta Hort* 671, 79–85. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.671.9>
- Sun, X., Han, G., Meng, Z., Lin, L., Sui, N., 2019. Roles of malic enzymes in plant development and stress responses. *Plant Signal Behav* 14. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1644596>
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G., 2012. ROS y redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 35, 259–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>
- Taiz, L., Zeiger, E., 2006a. Capítulo 25. Fisiología del estrés, en: *Fisiología Vegetal* 3er.Ed. Vol. II. Universitate Jaume I. Ed. III, pp. 1129–1188.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2006b. Capítulo 15: Paredes celulares: estructura, biogénesis y expansión, en: *Fisiología Vegetal* 3er.Ed. Vol. II. Universitate Jaume I. Ed. III, pp. 588–635.

- Tang, Y., Li, Y., Bi, Y., Wang, Y., 2017. Role of pear fruit cuticular wax and surface hydrophobicity in regulating the prepenetration phase of *alternaria alternata* infection. *J Phytopathol* 165, 313–322. <https://doi.org/10.1111/jph.12564>
- Tartachnyk, I., Kuckenbergh, J., Yuri, J.A., Noga, G., 2012. Identifying fruit characteristics for non-invasive detection of sunburn in apple. *Sci Hortic* 134, 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.009>
- Techakanon, C., Barrett, D.M., 2017. The effect of calcium chloride and calcium lactate pretreatment concentration on peach cell integrity after high-pressure processing. *Int J Food Sci Technol* 52, 635–643. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13316>
- Tenhaken, R., 2015. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front Plant Sci* 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00771>
- Thalman, M., Santelia, D., 2017. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist* 214, 943–951. <https://doi.org/10.1111/NPH.14491>
- Thomson, G.E., Turpin, S., Goodwin, I., 2018. A review of preharvest anthocyanin development in full red and blush cultivars of European pear. *N Z J Crop Hortic Sci* 46, 81–100. <https://doi.org/10.1080/01140671.2017.1351378>
- Torres, C.A., Yrews, P.K., Davies, N.M., 2006. Physiological y biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *Journal of Ex* 57, 1933–1947. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj136>
- Torres, C.A., Azocar, C., Ramos, P., Pérez-Díaz, R., Sepulveda, G., Moya-León, M.A., 2020. Photooxidative stress activates a complex multigenic response integrating the phenylpropanoid pathway and ethylene, leading to lignin accumulation in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit. *Hortic Res* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0244-1>
- Torres, C.A., Mogollon, R., 2022. Characterization of sun-injury and prediction of sunscald on ‘Packham’s Triumph’ pears using Vis-NIR spectroscopy. *Postharvest Biol Technol* 184, 111776. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111776>
- 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* 161, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.035>
- Trincherro, G.D., Sozzi, G.O., Covatta, F., Fraschina, A.A., 2004. Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene extends postharvest life of “Bartlett” pears. *Postharvest Biol Technol* 32, 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.11.009>

- Tsantili, E., Gapper, N.E., Apollo Arquiza, J.M.R., Whitaker, B.D., Watkins, C.B., 2007. Ethylene and  $\alpha$ -farnesene metabolism in green and red skin of three apple cultivars in response to 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment. *J Agric Food Chem* 55, 5267–5276. <https://doi.org/10.1021/jf063775l>
- Urzúa Barahona, F.N., 2001. Evolución de ablandamiento durante el almacenamiento y su relación con enzimas de pared celular en manzanas y peras. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Chile.
- Van Wyk, A.A., Huysamer, M., Barry, G.H., 2009. Extended low-temperature shipping adversely affects rind colour of 'Palmer Navel' sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] due to carotenoid degradation but can partially be mitigated by optimising post-shipping holding temperature. *Postharvest Biol Technol* 53, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.04.004>
- Veraverbeke, E.A., Verboven, P., Van Oostveldt, P., Nicolaï, B.M., 2003a. Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestris* subsp. *mitis* (Wallr.)) during storage Part 1. Model development and determination of diffusion coefficients. *Postharvest Biol Technol* 30, 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00083-8)
- Veraverbeke, E.A., Verboven, P., Van Oostveldt, P., Nicolaï, B.M., 2003b. Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestris* subsp. *mitis* (Wallr.)) during storage. Part 2. *Postharvest Biol Technol* 30, 75–88. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00082-6)
- Vieira, F.G.K., Campelo Borges, G. da S., Copetti, C., Gonzaga, L.V., Nunes, E. da C., Fett, R., 2009. Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. *Arc Latinoam Nutr.* 59, 101–106.
- Villalobos-Acuña, M., Mitcham, E.J., 2008. Ripening of European pears: The chilling dilemma. *Postharvest Biol Technol* 49, 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.003>
- Vincente, A.R., Manganaris, G.A., Ortiz, C.M., Sozzi, G.O., Crisosto, C.H., 2014. Nutritional quality of fruits and vegetables, en: *Postharvest handling: A systems approach*. Academic Press, pp. 69–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408137-6.00005-3>
- Vita, L.I., 2018. Evolución de poliaminas y capacidad antioxidante en frutos de manzana sometidos a estrés por elevada radiación solar. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Argentina.
- Vita, L.I., Colavita, G.M., 2018. Evolución de la fisiopatía daño por sol a escaldado por sol durante la conservación refrigerada de manzanas. *Fruticultura y Diversificación* 24, 10–12.

- Vita, L.I., Maiale, S.J., Spera, N., Colavita, G.M., 2019. Changes in polyamine levels on sunburn apple skin. *Acta Hort* 273–280. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- Waldron, K.W., Parker, M.L., Smith, A.C., 2003. Plant cell walls and food quality. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2, 128–146. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00019.x>
- Wand, S.J.E., Steyn, W.J., Theron, K.I., 2008. Vulnerability and impact of climate change on pear production in South Africa. *Acta Hort* 800 Part 1, 263–271. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2008.800.31>
- Wang, D., Yeats, T.H., Uluisik, S., Rose, J.K.C., Seymour, G.B., 2018. Fruit Softening: Revisiting the Role of Pectin. *Trends Plant Sci* 23, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.006>
- Wang, L.J., Li, S.H., 2006. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca<sup>2+</sup> homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Sci* 170, 685–694. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.005>
- Wang, T., McFarlane, H.E., Persson, S., 2015. The impact of abiotic factors on cellulose synthesis. *J Exp Bot* 67, 543–552. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv488>
- Wei, J., Qi, X., Cheng, Y., Guan, J., 2015. Difference in activity and gene expression of pectin-degrading enzymes during softening process in two cultivars of Chinese pear fruit. *Sci Hortic* 197, 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.002>
- Wang, Y., Xie, X., Long, L.E., 2014. The effect of postharvest calcium application in hydro-cooling water on tissue calcium content, biochemical changes, and quality attributes of sweet cherry fruit. *Food Chem* 160, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.073>
- Wei, J., Ma, F., Shi, S., Qi, X., Zhu, X., Yuan, J., 2010. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biol Technol* 56, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.12.003>
- Wei, J., Qi, X., Cheng, Y., Guan, J., 2015. Difference in activity and gene expression of pectin-degrading enzymes during softening process in two cultivars of Chinese pear fruit. *Sci Hortic* 197, 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.002>
- Whetten, R., Sederoff, R., 2007. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* 7, 1001. <https://doi.org/10.2307/3870053>

- Wójcik, P., Skorupińska, A., Filipczak, J., 2014. Impacts of preharvest fall sprays of calcium chloride at high rates on quality and “Conference” pear storability. *Sci Hort* 168, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.017>
- Woodrow, P., Pontocorvo, G., Ciarmiello, L.F., Annunziata, M.G., Fuggi, A., Carillo, P., 2012. Transcription factors and genes in abiotic stress, en: Venkateswarlu, B., Shanker, A.K., Shanker, C., Maheswari, M. (Eds.), *Crop stress and its management: Perspectives and strategies*. Springer Netherlys, Dordrecht, pp. 317–358. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0>
- Woolf, A.B., Bowen, J.H., Ferguson, I.B., 1999. Preharvest exposure to the sun influences postharvest responses of “Hass” avocado fruit. *Postharvest Biol Technol* 15, 143–153. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00077-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00077-5)
- Woolf, A.B., Ferguson, I.B., 2000. Postharvest responses to high fruit temperatures in the field. *Postharvest Biol Technol* 21, 7–20. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00161-7)
- Wu, H.C., Bulgakov, V.P., Jinn, T.L., 2018. Pectin methylesterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Front Plant Sci* 871, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01612>
- Wünsche, J.N., Greer, D.H., Palmer, J.W., Lang, A., McGhie, T., 2001. Sunburn - The cost of a high light environment. *Acta Hort* 557, 349–356. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.557.46>
- Xu, Y., Liu, J., Zang, N., Yin, Z., Wang, A., 2022. Effects of calcium application on apple fruit softening during storage revealed by proteomics and phosphoproteomics. *Horticultural Plant J* 8(4), 408–422. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.03.002>
- Yadav, S.K., 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron Sustain Dev* 30, 515–527. <https://doi.org/10.1051/AGRO/2009050>
- Yang, K.A., Lim, C.J., Hong, J.K., Park, C.Y., Cheong, Y.H., Chung, W.S., Lee, K.O., Lee, S.Y., Cho, M.J., Lim, C.O., 2006. Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in Chinese cabbage. *Plant Sci* 171, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.03.013>
- Yang, S., Zhang, Xiaofei, Zhang, Xinfu, Dang, R., Zhang, Xianan, Wang, R., 2016. Expression of two endo-1,4-β-glucanase genes during fruit ripening and softening of two pear varieties. *Food Sci Technol Res* 22, 91–99. <https://doi.org/10.3136/fstr.22.91>
- Yoshioka, H., Aoba, K., Kashimura, Y., 2019. Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *J Amer Soc Hort Sci* 117, 600–606. <https://doi.org/10.21273/jashs.117.4.600>

- Yuan, P., Yang, T., Poovaiah, B.W., 2018. Calcium signaling-mediated plant response to cold stress. *Int J Mol Sci* 19, 3896. <https://doi.org/10.3390/ijms19123896>
- Yuri, J.A., 1998. Technical aspects of pear growing in Chile. *Acta Hort* 195–200. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.475.24>
- Yuri, J.A., Neira, A., Quilodran, A., Razmilic, I., Motomura, Y., Torres, C., Palomo, I., 2010. Sunburn on apples is associated with increases in phenolic compounds and antioxidant activity as a function of the cultivar and areas of the fruit. *J Food Agric Environ* 8, 920–925.
- Zhang, J., Serra, S., S. Leisso, R., Musacchi, S., 2016. Effect of light microclimate on the quality of “d’Anjou” pears in mature open-centre tree architecture. *Biosyst Eng* 141, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.11.002>
- Zhang, L., Zhao, S., Lai, S., Chen, F., Yang, H., 2018. Combined effects of ultrasound and calcium on the chelate-soluble pectin and quality of strawberries during storage. *Carbohydr Polym* 200, 427–435. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.08.013>
- Zhang, X., Allan, A.C., Yi, Q., Chen, L., Li, K., Shu, Q., Su, J., 2011. Differential gene expression analysis of yunnan red pear, *Pyrus pyrifolia*, during fruit skin coloration. *Plant Mol Biol Report* 29, 305–314. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0231-z>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.045>
- Zhang, X., Cui, Z., 2023. Review of fruit cork spot disorder of Asian pear (*Pyrus spp.*). *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1211451>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.045>
- Zhao, L., Gong, X., Gao, J., Dong, H., Zhang, S., Tao, S., Huang, X., 2019. Transcriptomic and evolutionary analyses of white pear (*Pyrus bretschneideri*)  $\beta$ -amylase genes reveals their importance for cold and drought stress responses. *Gene* 689, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.092>
- Zheng, X.T., Yu, Z.C., Tang, J.W., Cai, M.L., Chen, Y.L., Yang, C.W., Chow, W.S., Peng, C.L., 2021. The major photoprotective role of anthocyanins in leaves of *Arabidopsis thaliana* under long-term high light treatment: antioxidant or light attenuator? *Photosynth Res* 149, 25–40. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00761-8>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.010>