



Tesis de Maestría
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
ORIENTACIÓN BIOTECNOLOGÍA

**“RESPUESTA ANTIOXIDANTE
AL ESTRÉS LUMÍNICO Y GOLPE DE SOL
EN FRUTOS DE MANZANA”**

GRACIELA MARÍA COLAVITA

Dr. Gustavo Orioli
Director de Tesis

Dr Andrés Venturino
Codirector de Tesis

Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional del Comahue
2007

RESUMEN

El cultivo de manzanas en el Alto Valle del Río Negro se realiza en un clima caracterizado por alta radiación y elevadas temperaturas. Estos factores ambientales promueven condiciones de estrés oxidativo en el fruto, generando en los mismos Especies Reactivas de Oxígeno (EROs). El aumento de EROs causa pérdida de integridad de las membranas celulares y cambios en la respuesta antioxidante. En frutos de manzana que se desarrollan a plena radiación solar (PRS) se observan daños en los tejidos expuestos denominado “quemado de sol” o "asoleado". Este problema causa importantes pérdidas económicas debido a disminución de la producción de frutos de buena calidad. El propósito de este trabajo ha sido examinar el efecto de PRS en el daño de las membranas celulares, las respuestas antioxidantes durante el crecimiento de los frutos de manzanas “Braeburn” (susceptible al asoleado) y “Red Delicious” (resistente) expuestos al sol vs. sombreados y el uso de caolín como pantalla solar.

La peroxidación de lípidos y pérdida de electrolitos aumentó hacia la madurez, y fue mayor en los frutos que permanecieron expuestos a PRS. En fecha de recolección la variedad Braeburn (BR) presentó 7% más oxidación de lípidos que Red Delicious (RD).

La exposición temprana de los frutos a estrés por elevada radiación solar mostró una respuesta adaptativa induciendo enzimas y compuestos antioxidantes relacionados a los ciclos del glutatión-ascorbato y catalasa, en ambos cultivares. Estos ciclos operaron en rangos diferentes en las distintas variedades de manzanas estudiadas. La mayor susceptibilidad que manifestó BR podría ser explicada por su alta capacidad de eliminar radicales superóxido pero una baja aptitud para degradar el peróxido generado, esto quedó evidenciado a través de una disminución en la actividad de catalasas y baja síntesis de glutatión. A estas características metabólicas se sumó que los frutos de BR están más expuestos al sol debido a las particularidades morfológicas de ésta variedad.

Las pulverizaciones de caolín redujeron la temperatura de la superficie de los frutos debido a que reflejan los rayos del sol y de esta forma se observó que actuó previniendo, hasta un cierto grado, la quemadura del sol en manzanas.

Avanzar en el conocimiento de las respuestas antioxidantes es importante para diseñar variedades transgénicas de manzana menos susceptibles a la quemadura del sol.

Palabras claves: *Malus domestica*, estrés oxidativo, radiación solar, antioxidante, catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato-glutatión, asoleado, caolín.

ABSTRACT

In apple fruits, environmental factors such as intense solar radiation and high temperature lead to oxidative stress conditions, and they generate Reactive Oxygen Species (ROS). The increase in ROS concentration is accompanied by membrane damage and changes in antioxidant response. Fruit development under solar stress is positively correlated to “sunburn” damage. Sunburn causes multi-millions dollar annual losses to the apple growers. In this work we examine the effect of full solar radiation (FSR) on cellular membrane damage, the antioxidant responses during growth of sun-exposed vs. shaded apple fruits from “Braeburn” (susceptible) and “Red-Delicious” (resistant) cultivars, we evaluate the adaptive development of sun-exposed vs. shaded fruit of apple and the use of kaolin like a protection agent.

Membrane damage evolution during apple growth was similar for Red Delicious (RD) and Braeburn (BR), in both varieties the increase in tissue temperature caused by FSR generated an increase in peroxidation of the lipid that was positively correlated to electrolyte leakage.

The early exposure of apple fruits to light stress would cause an adaptive response, inducing antioxidant enzymes and compounds related to the ascorbate-glutathione and catalase cycle, in both cultivars. These cycles operates in different ranges that depends on the apple varieties. The highest susceptibility to sunlight shown by BR could be explained by its higher capacity to eliminate superoxide radicals but a low capacity to degrade the generated peroxide, through a diminished in catalase activity and the lower synthesis of glutathione. In BR, the ascorbate-glutathione cycle would have a lower efficiency to detoxify ROS. Also, fruits of BR are exposed more to the solar radiation due to its particular morphological characteristics.

The agronomic application of kaolin reduced fruit surface temperature by reflecting sun rays and it prevents, to a certain degree of exposure, sunburn damage in some apple cultivars.

The advances in apple antioxidant response knowledge is important to design sunburn resistant transgenic varieties.

Keywords: *Malus domestica*, oxidative stress, solar radiation, antioxidant, catalase, superoxide dismutase, ascorbate-glutathione, sunburn, kaolin.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Asoleado de frutos	2
1.1. Desarrollo de los síntomas en un fruto afectado por asoleado	3
1.2. Incidencia del asoleado en la producción frutícola	4
1.3. Factores climáticos que promueven el asoleado	5
2. Estrés oxidativo en vegetales	7
2.1. Especies reactivas de oxígeno	8
2.2. Acción de las EROs sobre las biomoléculas	11
2.3. Daño por estrés oxidativo en las membranas celulares	14
2.4. Estrés por exposición a altas temperaturas y elevada radiación solar	15
2.4.1. Efecto de las altas temperaturas	15
2.4.2. Efecto de elevada radiación solar	17
3. Sistemas de defensa antioxidante	19
3.1. Mecanismos enzimáticos de eliminación de EROs	21
3.2. Evolución del sistema antioxidante en el desarrollo de órganos, en particular durante la maduración de los frutos	22
3.3. Defensas antioxidantes frente a situaciones de estrés por altas temperaturas y elevada radiación solar	24
4. Tolerancia al estrés oxidativo y manipulación genética del sistema de defensas antioxidante	25
5. Uso del Caolín en la prevención de asoleado	28
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	31
1. Análisis contextual	31
2.	33
<i>Observaciones previas al estudio</i>	
3. Hipótesis	33
4. Objetivos del trabajo	34

MATERIALES Y MÉTODO	35
1. Localización y datos meteorológicos del lugar y período de estudio	35
2. Material vegetal	36
3. Período de estudio y de extracción de muestras	38
4. Determinación de la incidencia de daño por asoleado en frutos	38
5. Influencia de la radiación solar y la temperatura en la peroxidación de lípidos de membrana de frutos	41
6. Curva de crecimiento de los frutos	42
7. Determinaciones fisiológicas, químicas y enzimáticas	42
7. 1. Medición de la pérdida de electrolitos	43
7. 2. Determinación de peróxidos lipídicos	44
7. 3. Determinación de proteínas	44
7. 4. Determinación de compuestos antioxidantes	44
7. 4. 1. Preparación de los extractos celulares	44
7. 4. 2. Glutación Reducido (GSH)	45
7. 4. 3. Ascorbato (AsA)	45
7. 5. Determinaciones enzimáticas	45
7. 5. 1. <i>Preparación del extracto proteico</i>	45
7. 5. 2. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD)	46
7. 5. 3. Actividad de Catalasa (CAT)	47
7. 5. 4. Actividad de Glutación Reductasa (GR)	47
7. 5. 5. Actividad de Ascorbato Peróxidasa (APX)	47
8. Capacidad de adaptación de los frutos a plena radiación solar	48
9. Influencia de la aplicación de pantalla solar en base a caolín en el daño por asoleado de frutos	48
9. 1. Parámetros físicos	48
9. 1. 1. Medición de la radiación fotosintéticamente activa	48
9. 1. 2. Medición de la temperatura	49
9. 1. 3. Comportamiento del caolín en la absorción de diferentes radiaciones	49

9. 2.		50
	<i>Parámetros morfológicos</i>	
9. 2. 1.	Medición del área foliar y medición de clorofila	50
9. 2. 2.	Medición del crecimiento de los frutos	50
9. 3.	Evaluación del uso de caolín en el daño de membranas de frutos expuestos a alta radiación solar	51
10.	Análisis estadísticos	51

RESULTADOS

1.	Evaluación de la incidencia de asoleado en la producción de manzanas en la región del Alto Valle de Río Negro	53
2.	Influencia de la radiación solar y la temperatura en la peroxidación de lípidos de membrana de frutos	55
3.	Cambios bioquímicos durante el desarrollo de los frutos sombreados y expuestos a la radiación solar	56
3.1.	Curva de crecimiento	57
3.2.	Evolución de la peroxidación de lípidos	58
3.3.	Cambios en la pérdida de electrolitos	59
3.4.	Evolución del contenido de proteínas	60
4.	Cambios en la actividad de enzimas y metabolitos antioxidantes durante la evolución de los frutos	62
4.1.	Enzimas antioxidantes	62
4.1.1.	Superoxido Dismutasa	62
4.1.2.	Catalasa	64
4.1.3.	Ascorbato Peroxidasa	66
4.1.4.	Glutación Reductasa	67
4.2.	Metabolitos antioxidantes	69
4.2.1.	Glutación	69
4.2.2.	Acido Ascórbico	70
5.	Capacidad de adaptación de los frutos a plena radiación solar	71
5.1.	Evolución del daño de membrana	71

5.2.	Sintomatología asociada a daño de sol	72
6.	Uso de Caolín como filtro protector	73
6. 1.	Comportamiento espectrofotométrico del caolín utilizado	73
6.2.	Influencia de la aplicación de caolín en la radiación y temperatura que reciben los frutos	73
6.3.	Atenuación del daño por aplicación de caolín	75
6.3.1.	Efecto protector sobre la integridad de las membranas	75
6.3.2.	Influencia de la aplicación del caolín en el control de asoleado de frutos	76
6.3.2.1.	Variedad Braeburn	76
6.3.2.2.	Variedad Red Delicious	78
6.3.3.	Influencia de la aplicación de caolín en el crecimiento de los frutos y en algunas variables vegetativas	78
		80
DISCUSION		
1.	Disminución de la calidad y pérdida de producción de manzanas a causa del daño de sol en Río Negro	80
2.	Factores causantes de asoleado relacionados con exposición a elevada temperatura y alta radiación solar	81
3.	Cambios en las membranas celulares y contenido de proteínas durante el desarrollo de los frutos	83
4.	Efectos de estrés por calor y alta radiación solar en los frutos	84
5.	Cambios en los sistemas antioxidantes durante la evolución de los frutos según variedad y exposición a diferente intensidad de radiación solar	86
6.	Capacidad de adaptación de los frutos a alta radiación solar	92
7.	Eficiencia del uso de caolín en prevención de asoleado	93
	SINTESIS GENERAL	95
	CONCLUSIONES	97
	POSIBLES LINEAS DE AVANCE DE ESTE ESTUDIO	98

BIBLIOGRAFIA	99
GUÍA DE ABREVIATURAS	111
PRESENTACIONES A CONGRESOS	113

INTRODUCCIÓN

Las condiciones ambientales que caracterizan a las regiones con clima árido o semiárido promueven estrés oxidativo en los vegetales. Los órganos afectados varían dependiendo de la especie. En pomáceas y otros vegetales se observa que frutos que se desarrollan expuestos a altas temperaturas y radiación solar, típicas de la estación de crecimiento de las zonas productoras, sufren daño oxidativo asociado al desarrollo del desorden fisiológico denominado “asoleado o golpe de sol” (**Foto 1**) (Curry, 1996; Yuri y col., 2000-a).



Foto 1: Manzana var. Fuji con síntoma de “golpe de sol o asoleado”.

En condiciones normales los organismos aeróbicos están continuamente formando especies reactivas de oxígeno (EROs) tales como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos (Buchanan y col., 2000). Cuando a estos organismos se le imponen condiciones que favorecen el estrés oxidativo, se establece un desbalance que resulta en un exceso de producción de EROs que causan daño oxidativo con destrucción de lípidos, pigmentos, proteínas y ácidos nucleicos (Tausz y col., 1999). Por lo tanto el oxígeno, que es esencial para la existencia de la vida aeróbica, se torna perjudicial bajo condiciones de estrés.

Los organismos vivientes han desarrollado mecanismos protectores que hasta determinado límite son capaces de minimizar los efectos de las EROs. Estos procesos involucran componentes de tipo enzimático y no enzimáticos que regulan la presencia de

EROs en las células. Entre las enzimas las más importantes en los procesos antioxidantes son la Superóxido Dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), Glutatión Reductasa (GR, EC 1.6.4.2), Ascorbato Peróxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) (Bowler y col., 1992). En cuanto a los componentes no enzimáticos se encuentran el glutatión (GSH), ácido ascórbico (AsA), compuestos fenólicos, carotenoides y tocoferol (Foyer y col., 1994). En los últimos años se han realizado investigaciones con el objetivo de relacionar la capacidad antioxidante de numerosos órganos vegetales con la tolerancia a distintos tipos de estrés (Pastori y Foyer, 2002; Hodges y col., 2004).

En horticultura, la obtención de plantas transgénicas que presenten elevada actividad de enzimas antioxidantes ha sido objeto de mucha atención en los últimos años. En cambio en plantas de frutales son escasos los trabajos realizados para lograr mutantes resistentes a estrés por elevada radiación y temperatura. No obstante, recientemente se han desarrollado líneas transgénicas de manzana “Gala” que sobreexpresan el gen de APX citosólica derivado de espinaca, muchas de las cuales presentaron resistencia a estrés por elevada temperatura (Wisniewski y col., 2002).

En los valles del norte de la Patagonia, donde se produce el 80% de la manzana argentina, se estima que una gran cantidad de frutos no se pueden comercializar por golpe de sol, ocasionando una importante pérdida económica. Las nuevas variedades de frutos de manzanas requeridas por el mercado y las prácticas culturales que acompañan a las pautas de reconversión frutícola han contribuido a que este problema se incremente (Yuri y col., 1996). A pesar de la importancia de este problema no existen en la región estudios que aborden esta temática.

1. Asoleado de frutos

En los frutos que se desarrollan en condiciones de estrés por elevada radiación solar y altas temperaturas se observa un desorden fisiológico denominado escaldadura solar (sunscald or sunburn) (Wilton, 1994), daño por sol o simplemente “asoleado”. Este daño se manifiesta porque la producción de defensas antioxidantes es insuficiente en evitar que una proliferación de EROs dañe severa o definitivamente los componentes celulares (Buchanan y col., 2000).

El daño en frutos es producido al principio a nivel epidérmico y sub-epidérmico, con desmejoramiento de su apariencia, que luego deriva en cambios en la madurez del sector

afectado con posterior ablandamiento y final putrefacción, disminuyendo la posibilidad de almacenaje de los mismos (Arakawa y col., 1991).

1.1. Desarrollo de los síntomas en un fruto afectado por asoleado

En las zonas productoras del hemisferio Sur, los frutos que más daño reciben dentro de la estructura del árbol son los que se desarrollan en los cuadrantes Norte y Oeste. En la cara expuesta al sol de los frutos que sufren asoleado inicialmente se presenta una mancha blanca como producto de la fotooxidación de los pigmentos. La exposición a temperaturas del orden de los 40 °C genera como primer síntoma decoloración en los tejidos epidérmicos de los frutos con pérdida de pigmentos inclusive clorofila (Song y col., 2001; Hodges y col., 2004). De esta manera la zona afectada queda menos protegida a las altas radiaciones. En manzanas verdes la decoloración puede ocurrir en pocas horas (Barber y col., 1971), y si la exposición continúa, el síntoma progresa en una mancha bronceada de aspecto húmedo en la región dañada hasta llegar a un color marrón oscuro que actúa como cuerpo negro elevando más aún la temperatura de esa zona del fruto (**Foto 2**).

Estudios anatómicos e histoquímicos demuestran que las células epidérmicas comienzan rápidamente a comprimirse, el contenido celular colapsa, la cutícula se muestra partida y discontinua. Si la agresión prosigue se observa material denso en las células subepidérmicas, posiblemente de origen fenólico, adelgazamiento de las paredes celulares y los espacios intercelulares se ven llenos de sustancias pécticas. Los cambios en la coloración denotan severos daños a nivel celular que culminan con la muerte de los tejidos perjudicados (Polito y col., 2002). El estadio final de un fruto asoleado es una gran zona necrótica tanto a nivel epidérmico como en pulpa y generalmente el fruto así dañado termina por abscindir del árbol.

Si se cosechan y llevan a cámaras refrigeradas de conservación, en los frutos que presentan estadios iniciales de síntomas de asoleado (zonas blancas despigmentadas o bronceadas) se observa que luego de varias semanas aparecen manchas marrones debido a la aceleración de la senescencia de la zona lesionada. Estas manchas se parecen al problema de postcosecha denominado escaldadura superficial pero a diferencia de éste no se controla con la aplicación de antioxidantes como difenilamina (Mitcham, 2003).

Por otro lado los frutos que luego de recolectados del árbol son dejados tanto en el suelo como en cajones expuestos al sol pueden desarrollar severos síntomas de asoleado.

La sensibilidad al asoleado de frutos de pepita varía según la variedad tanto en peras como en manzanas. Las nuevas variedades de manzana (Braeburn, Fuji, etc.) introducidas en la fruticultura regional presentan acentuada susceptibilidad al asoleado de frutos (Schupp y col., 2002).

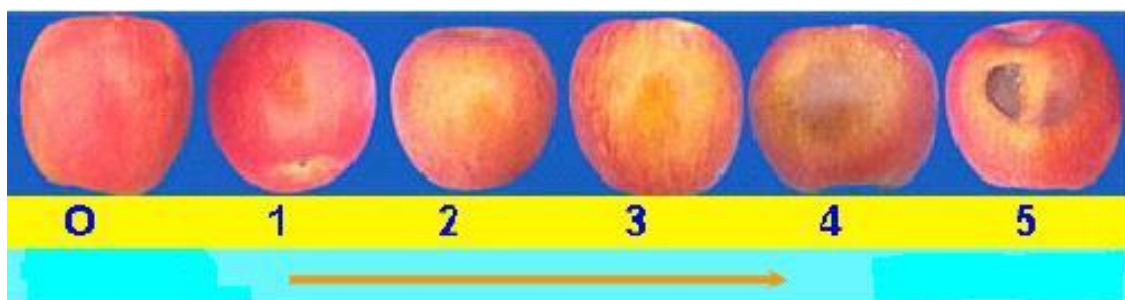


Foto 2: Niveles de daño por asoleado. Fruto sano, grado 0 (izquierda) a daño grave, grado 5 (derecha).

1.2. Incidencia del asoleado en la producción frutícola

Las pérdidas de producción ocasionadas por asoleado de frutos de manzanas y peras son elevadas en la mayoría de las regiones frutícolas del mundo. El golpe de sol ocurre en las áreas de producción de manzanas que presentan intensa radiación solar y altas temperaturas, tales como Este del estado de Washington, California Central, Arizona, Nuevo México y Sur de Oregon en Estados Unidos y en países como Sudáfrica, Australia, Israel, Tasmania, España, Italia, Francia, Chile, Brasil y Argentina. La severidad de daño por asoleado en frutos de manzanas varía según los cultivares, las condiciones de crecimiento y las prácticas de manejo aplicadas a las plantas (Wünsche y col., 2001).

Informes de Nueva Zelanda indican un promedio de 15% de pérdidas en cosecha evaluadas en la sección de empaque, considerando que el porcentaje es mucho mayor si se suma la cantidad de fruta afectada que por tal motivo no se retira del monte frutal. En zonas productoras de EEUU, Sudáfrica, Australia y Chile se cuantifica este problema en valores que llegan al 40 % de la producción, dependiendo de la variedad, edad de la planta y sistema de conducción (Yuri y col., 1996). En el Alto Valle de Río Negro, donde fructifica el 80% de las

manzanas argentinas, hasta la fecha no se cuenta con una ponderación oficial de esta afección. Datos preliminares generados por empresas exportadoras y empacadoras de la región indican que el problema estaría en el orden de las cifras antes citadas. Los valores presentados determinan una sustancial merma en la cantidad y calidad de fruta exportable y comercializables lo que implica una importante pérdida de ingresos para la región.

1.3. Factores climáticos que promueven el asoleado

El asoleado de frutos se observa con distinto grado en todas las regiones frutícolas del mundo. Es un problema severo en las zonas productoras con condiciones ambientales semiáridas, caracterizadas por elevadas temperaturas y alta radiación solar.

Tal como se puede ver en la **Tabla 1** los datos climáticos para los veranos en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén son propios de zonas semiáridas. Entre las zonas agrícolas del mundo, el Alto Valle es una de las regiones en la que se registra mayor radiación y duración del brillo solar (heliofanía) (Damario y Cattáneo, 1982).

Tabla 1: Registros climáticos medios del mes de Enero*

Temperatura (°C)		Radiación máxima (W/m ²)	Heliofanía efectiva (hs)	Precipitación media (mm)	Humedad Relativa (%)
media	Máxima				
22.4	39	1260	10.8	19	45

* Datos de la Estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias, período analizado 1972-2002

Los factores climáticos inductores de asoleado más importantes son temperatura, radiación y heliofanía. La intensidad y el tiempo que los frutos soportan estos factores son los que determinan la situación de estrés que derivará en daño de los tejidos. Evaluaciones realizadas a campo en distintas variedades de manzanas muestran que la temperatura de la piel de los frutos en la cara expuesta al sol supera hasta 15 °C a la temperatura del aire que los rodea (Parchomchuk y Meheriuk, 1996). La circulación del aire que rodea al fruto influye actuando como refrigerante. Se ha observado que una ligera brisa puede disminuir la temperatura del aire que rodea al fruto en aproximadamente 4 °C (Yuri y col., 2000-a).

El daño por sol en manzanas comienza cuando la temperatura ambiente supera los 27-29 °C y la temperatura en la cara expuesta del fruto es de 42-44 °C (Yuri y col., 2000-a). Teniendo en cuenta que la temperatura máxima media de nuestra región es 39 °C (**Tabla 1**), los frutos en su cara expuesta al sol llegan a superar fácilmente los valores de temperatura suficientes para la desnaturalización de proteínas.

Del total de la radiación incidente sobre la superficie terrestre sólo una parte (45%) está en la región visible y puede ser absorbida y utilizada para el proceso fotosintético (radiación fotosintéticamente activa, 400-700 nm). Los frutos tienen sistemas biológicos de adaptación limitados para soportar el exceso de energía que pudieran recibir.

La radiación que llega a los frutos afecta a los tejidos por diferentes causas. Las longitudes de onda corta ultra violeta (UV) UV-C (<280 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-A (320-390 nm) son altamente energéticas y dañinas para los tejidos. Las bandas del UV-C y gran parte del UV-B son filtradas por la atmósfera. El UV-B pasa sólo en un 0.1- 0.2%. No obstante, debido al debilitamiento de la capa de ozono toma importancia la discusión si la radiación UV-B que atraviesa la atmósfera es responsable del asoleado. La radiación UV ha sido estudiada como causa de daño en diferentes cultivo produciendo el bronceado de la piel de los frutos de banana (Wade y col, 1993). Evaluaciones realizadas en Chile han demostrado que este tipo de luz tiene algún grado de participación en el golpe de sol de manzanas (Vasquez, 1998), se ha observado que estas radiaciones producen un descoloramiento y amarillamiento en el fruto que si bien no producen la muerte de tejidos disminuye la calidad y capacidad de almacenamiento de los mismos (Schrader y col., 2002; 2003).

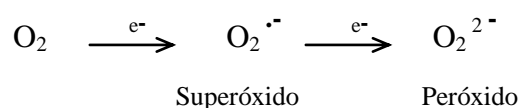
A continuación de las radiaciones fotosintéticamente activas se encuentran las radiaciones infrarrojas (IR, >740 nm) que representan el 53% del total de radiación solar que llega a la superficie terrestre. Estas radiaciones jugarían una función importante en las afecciones por sol dado que elevan la temperatura del fruto. La responsabilidad de un tipo de radiación sobre el otro en la causa de daño por sol no esta todavía claro. Trabajos realizados en Irán irradiando frutos con distintas porciones del espectro indican que el rol de las UV sería más importante que las altas temperaturas generadas por el IR en el desarrollo de síntomas de asoleado (Naseri, 2002). No obstante, la mayoría de los investigadores coinciden en que el aumento de temperatura en la cara expuesta de los frutos no sería el único pero sí uno de los factores más importantes en la causa del estrés oxidativo que deriva en asoleado (Wilton, 1994; Curry, 1996; Yuri y col., 2000-a).

Recientemente se ha propuesto dividir el daño por asoleado en dos categorías en función del síntoma en la cara expuesta de los frutos y las condiciones ambientales que lo promueven: una clase en la que se visualiza una mancha bronceada con daño subletal de tejidos, que aparece a largo plazo (más de 45 días) y se produce con temperaturas de los tejidos entre 45-50°C requiriendo la presencia de rayos UV; Otra clase la constituyen los frutos que presentan como síntoma una zona necrótica que se observa en el corto plazo (menos de 20 días) y esta asociada fundamentalmente a temperaturas del fruto superiores a 50°C (Schrader y col., 2002).

2. Estrés oxidativo en vegetales

Los organismos aeróbicos producen EROs que se originan durante procesos metabólicos que involucran mecanismos de oxido-reducción, tales como la fotosíntesis y la respiración. En condiciones óptimas ambientales las EROs son rápidamente metabolizadas y no causan daño celular (Foyer y col., 1994; Asada, 1999; Buchanan 2000).

Sin embargo, la reducción del oxígeno no está exenta de riesgos. El oxígeno molecular es un aceptor final de electrones idóneo porque su elevada afinidad hacia ellos proporciona una gran fuerza directriz termodinámica (Berg y col., 2003). La transferencia de cuatro electrones a la molécula de oxígeno da lugar a productos inocuos (dos moléculas de agua), pero su reducción parcial origina compuestos peligrosos. Concretamente, la transferencia de un único electrón al O₂ genera el anión superóxido y la transferencia de dos electrones origina peróxido (Buchanan 2000; Mittler, 2002; Hodge y col., 2004).



Estos compuestos y, particularmente sus productos de reacción, son dañinos para una serie de compuestos celulares (Berg y col., 2003). El término "estrés oxidativo" hace referencia a un desequilibrio entre la promoción y la remoción de EROs produciendo como consecuencia daño en la maquinaria bioquímica de la célula.

En efecto, la producción de EROs en situaciones de estrés aumenta notablemente ocasionando que los sistemas bioquímicos que usualmente detoxifican y reparan el deterioro de los componentes celulares resulten a su vez dañados. Surge entonces un desbalance en

favor de la producción de EROs que atacan y destruyen lípidos, pigmentos, proteínas e inclusive ácidos nucleicos (Tausz y col., 1999).

Existe un amplio espectro de factores causantes de estrés oxidativo en vegetales, tanto de origen biótico (patógenos, senescencia, etc.) como abiótico (temperaturas extremas, elevada radiación solar, contaminación, herbicidas, anegamiento, sequía, salinidad, frío) (Noctor y col., 1998; Mazza y col., 2000).

2.1. Especies reactivas de oxígeno

Las EROs son formas parcialmente reducidas de oxígeno diatómico atmosférico (O_2). Estos compuestos son formados normalmente en los organismos aeróbicos durante las reacciones redox, tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos (**Figura 1**) (Buchanan, 2000; Mittler, 2002). Las EROs se caracterizan por ser de corta vida y altamente reactivos (Hodge y col., 2004).

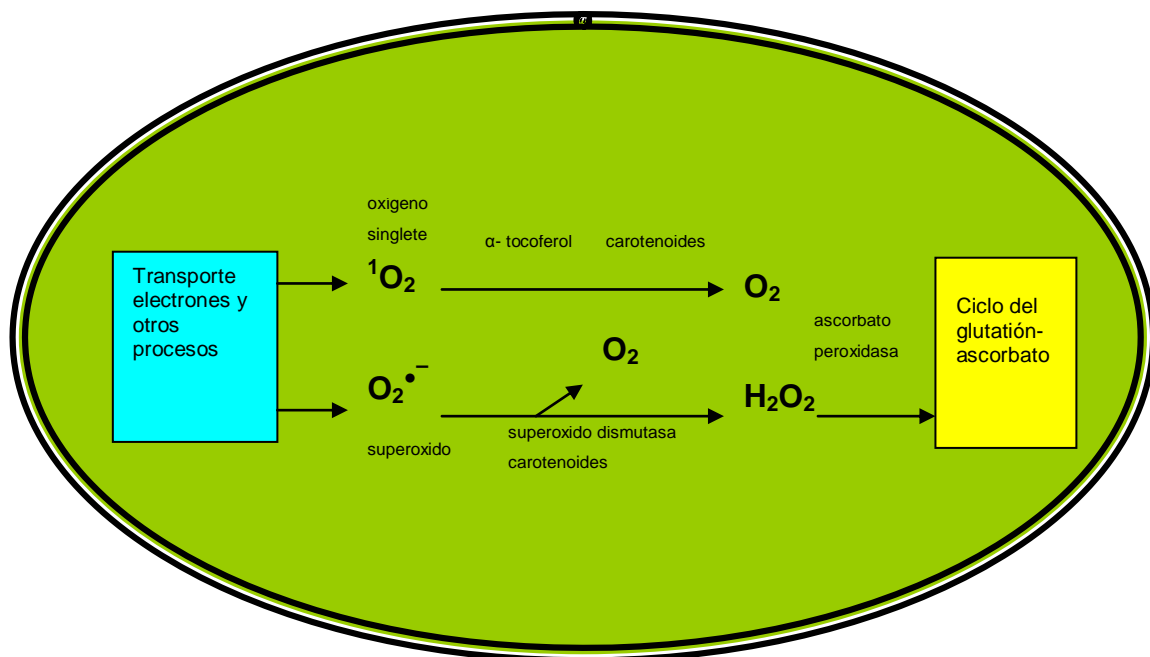
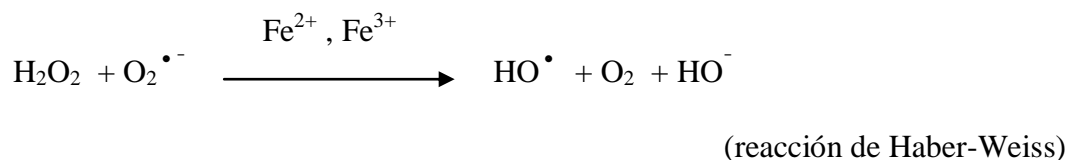


Figura 1: Representación esquemática de la generación de especies activas de oxígeno en el cloroplasto y de los mecanismos de detoxificación asociados. Foyer y col, 1994. Plant Phys 92: 696-717.

Estas formas de EROs resultan de la excitación del oxígeno formando oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar, respectivamente, anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radical hidroxilo (HO^\bullet), radical perhidroxilo ($\text{O}_2\text{H}^\bullet$) y ozono (O_3) (Buchanan y col., 2000) (**Tabla 2**).

El $\text{O}_2^{\bullet-}$ se forma cuando el O_2 atrapa un electrón adicional; éste es un intermediario de un gran número de reacciones bioquímicas donde participan enzimas del tipo oxidasas, tales como xantina oxidasa y aquellas que utilizan la citocromo P450 oxidasa. Normalmente el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es de corta vida y se convierte en H_2O_2 por la enzima SOD (**Figura 1**) (Bowler y col., 1992), lo que mantiene los niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en menos de 10^{-10} M (Curry, 1996).

El H_2O_2 que se forma puede atravesar la membrana plasmática y tomar parte junto con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en la formación de $\text{O}_2\text{H}^\bullet$ y de HO^\bullet (Bowler y col., 1992; Mittler, 2002). Ambas reacciones requieren de un metal transicional, tal como hierro o cobre en la reacción de Haber-Weiss. Los $\text{O}_2\text{H}^\bullet$ y HO^\bullet son compuestos muy energéticos de corta vida y los más tóxicos entre los compuestos de oxígeno (Bowler y col., 1992).



Como ya se dijo anteriormente, aún en condiciones óptimas para el desarrollo de la planta se generan EROs como consecuencia de algunas reacciones del metabolismo celular relacionadas con el transporte de electrones (fotosíntesis, respiración, fotorespiración, β -oxidación de ácidos grasos). En la fotosíntesis por ejemplo, la reducción del oxígeno por el PS I (reacción de Mehler) da como resultado la formación de radicales superóxido (Toivonen, 2004). Recientemente se han informado nuevas fuentes de EROs en plantas incluyendo a NADPH oxidasas, amino oxidasas, y peroxidasas unidas a pared celular, estas últimas estrechamente asociadas con el proceso de muerte celular programada (Jones y col., 2000). Conocer las fuentes de EROs es importante ya que el estrés oxidativo frecuentemente proviene del efecto sinérgico de diferentes EROs, como lo indican datos recientes que

demuestran que en vegetales se produce una reacción en cadena cuando el radical libre gaseoso óxido nítrico (NO^\bullet) se asocia con $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 . (Hérouart y col., 2002).

Compuesto	Notación Shorthand	Fuente
Oxígeno molecular (estado basal triplete)	$\text{O}_2 ; {}^3\Sigma$	Manera más común de oxígeno gaseoso
Oxígeno singulete (primer estado de excitación)	${}^1\text{O}_2 ; {}^1\Delta$	Radiación UV, fotoinhibición, reacción de transferencia de e^- en el fotosistema II (cloroplastos)
Anión superóxido	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Reacción de transferencia de e^- en mitocondrias, reacción de Mehler en cloroplastos (reducción de O_2 por el centro hierro-sulfuroso F_x del fotosistema I), fotorespiración glioxisomal, actividad peroxisomal, membrana plasmática, oxidación de paraquat, fijación de nitrógeno, defensa contra patógenos, reacción del O_3 y OH^- en el apoplasto.
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Fotorespiración, β -oxidación, descomposición de $\text{O}_2^{\bullet-}$ inducida por protones, defensa contra patógenos.
Radical hidroxilo	HO^\bullet	Descomposición de O_3 en presencia de protones en el apoplasto, defensa contra patógenos.
Radical perhidroxilo	$\text{O}_2\text{H}^\bullet$	Reacción del O_3 y OH^- en el apoplasto
Ozono	O_3	Descargas eléctricas y radiación UV en la estratosfera, reacciones que involucran combustión de productos fósiles y radiación UV en la troposfera.

Tabla 2: Estructura molecular y fuente de producción de las especies reactivas de oxígeno (Buchanan y col., 2000).

Bajo condiciones normales el ritmo de producción de EROs en las células es baja ($240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^{\bullet-}$) y una concentración de $0.5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 en el cloroplasto es considerada como un nivel estable y no tóxico. En situaciones de estrés que rompen la homeostasis celular, el ritmo de formación de EROs en la célula aumenta hasta $720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^{\bullet-}$ y la concentración

de H₂O₂ en el cloroplasto aumenta hasta 15 μM (Polle, 2001; Mittler, 2002). En estudios realizados en células de tabaco Bright-yellow 2 se ha determinado que un aumento importante de EROs se produce previo al desencadenamiento del proceso de muerte celular programada en células expuestas a temperaturas de 55 °C durante 30 minutos (Vacca y col., 2004). Estos ejemplos están en un todo de acuerdo con la concepción tradicional que considera que si bien las EROs son productos inevitables del metabolismo aeróbico un aumento en su producción puede resultar dañino para el vegetal.

Actualmente hay otra concepción que considera que ante un estrés las EROs pueden actuar como una señal para la activación de respuestas de detoxificación (Desikin, 2001; Torres y col., 2003) o dicho de otra manera que la modulación fina de bajos niveles de EROs puede ser usada por la célula para monitorear el estado interno de estrés (Karpinski y col., 1999). Ahora bien, las cantidades de EROs en el organismo deben mantenerse en estricto control ya que por un lado a bajos niveles participarían en la señalización de eventos pero por el otro una sobreacumulación puede resultar en la destrucción celular (Langebartels y col., 2002). Ese control en la célula requeriría al menos dos mecanismos diferentes para regular la concentración interna de EROs: uno que permita la regulación fina de niveles bajos con el propósito de señalización y otro que procure la detoxificación de EROs, especialmente durante las situaciones de estrés.

2.2. Acción de las EROs sobre las biomoléculas

El balance de EROs en una célula estará determinado por la producción de EROs y los mecanismos de remoción de estas especies, y puede cambiar drásticamente dependiendo de las condiciones fisiológicas de la planta y de la integración de diferentes estímulos ambientales, metabólicos y bioquímicos (Mittler, 2002). Las EROs pueden producir la muerte celular por procesos oxidativo tales como: oxidación de proteínas, inhibición de enzimas, daño en el ADN y peroxidación de lípidos de membranas.

Las proteínas juegan roles cruciales en casi todos los procesos biológicos incluyendo catálisis, transporte y reconocimiento (receptores). Si no se eliminan eficientemente, las EROs producen modificaciones estructurales de proteínas, activando y acelerando la degradación proteolítica, con lo que se altera el metabolismo celular (Rao y col., 1995).

Pueden ocurrir varias formas de oxidación de proteínas que incluyen la formación de carbonilos proteicos, el ataque de ciertos aminoácidos (por ejemplo la formación de 2-oxohistidina a partir de histidina; sulfóxido de metionina a partir de metionina) y la oxidación de los grupos sulfidrilos.

La base química de los efectos de los radicales sobre el ADN, probablemente se deba a la oxidación y modificación química de las bases nitrogenadas. Tales mutaciones puntuales, si no se corrigen y corresponden a regiones codificantes en el ADN, pueden conducir a estructuras modificadas de proteínas las cuales podrían ocasionar disfunción enzimática.

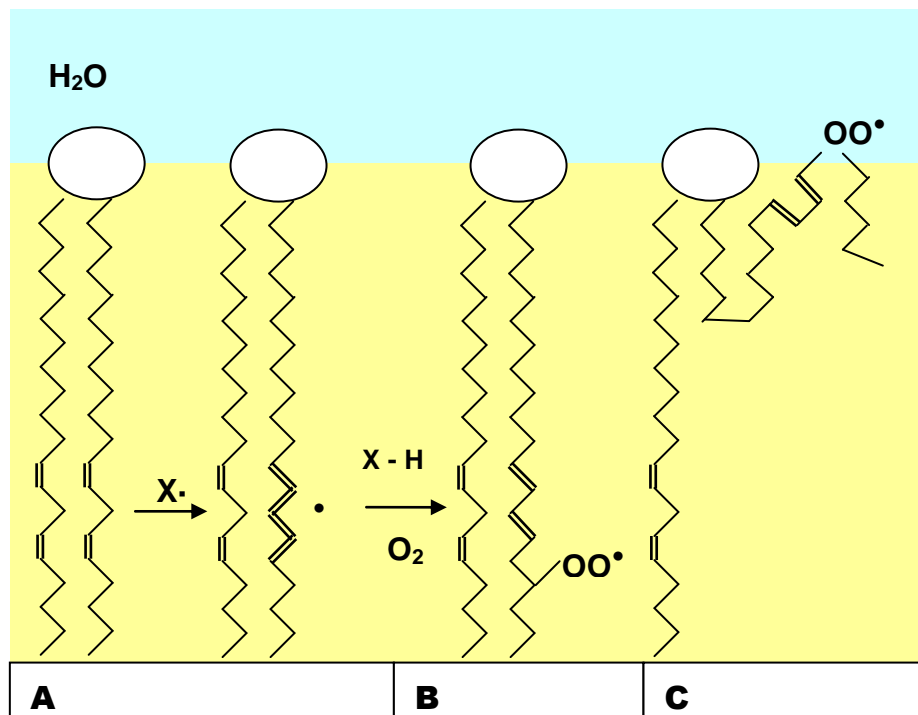


Figura 2. Peroxidación de lípidos de membrana. Se representa una sola fase de la bicapa lipídica. A) Iniciación del proceso de peroxidación por un radical oxidativo, $X\cdot$, a través de una sustracción de un hidrógeno bis-alílico, por eso forma un radical pentadienyl. B) Oxigenación para formar un radical peroxilo y un dieno conjugado. C) Movilización del radical peroxilo hacia a la interfase acuosa de la membrana. Extraído de Shewfelt y Purvis, (1995) HortScience 30:213-218

Los lípidos vegetales incluyen una amplia gama de compuestos, tales como ácidos grasos, fosfolípidos, ceras y fitoesteroles en base a terpenos. De todos ellos los fosfolípidos son los componentes mayoritarios de las membranas biológicas y los que regulan la fluidez de las membranas. Por su parte los ácidos grasos insaturados que forman parte de la composición de los fosfolípidos son susceptibles a los ataques de radicales libres hidroxilos, generando peróxidos de lípidos (**Figura 2**). La peroxidación de los ácidos grasos insaturados altera su estructura y función haciéndolos más hidrofílicos, dañando así el comportamiento normal de la membrana, por ejemplo aumentando su permeabilidad. Los peróxidos de ácidos grasos y sus metabolitos son poderosos inhibidores de algunas enzimas, por lo cual los procesos dentro del plasmalema y dentro de la célula pueden ser modificados (Shewfelt y Purvis, 1995).

La oxidación de biomoléculas puede llevar a la generación de nuevas especies de radicales libres. La interacción de superóxidos o H_2O_2 con sales ferrosas (Fe^{+2}) en membranas lleva a la formación de radicales libres lipídicos que son altamente reactivos con los fosfolípidos vecinos produciendo una reacción en cadena.

Cuando uno de los ácidos grasos insaturados de un fosfolípido de la membrana reacciona con un radical libre (X) se forma, por extracción de un átomo de hidrógeno (XH), un radical lipídico que tiene un electrón no apareado en un átomo de carbono (reacción A de la **Figura 2**). Este radical lipídico reacciona rápidamente con el oxígeno formando un radical lipídico hidroperóxido (reacción B) que a su vez puede extraer un átomo de hidrógeno de ácido grasos insaturados vecinos, iniciando así una reacción en cadena o incrementar el carácter hidrofílico (reacción C) en el interior de la bicapa lipídica (Frenkel, 1991). En condiciones de estrés oxidativo, cuando el sistema de defensas y reparación resulta insuficiente, se produce dentro de la membrana celular una propagación en cadena de radicales libres causada por la peroxidación de lípidos. Los radicales libres de origen lipídico entran en contacto con otras moléculas de ácidos grasos poliinsaturados generando tanto como 10 a 100 nuevos hidroperóxidos de lípidos por cada reacción (Shewfelt y Purvis, 1995). Durante la reacción en cadena cuando el radical lipídico hidroperóxido extrae un átomo de hidrógeno se convierte en un peróxido lipídico que, como producto de su catabolismo, produce una molécula de malondealdehído (Hodges y col., 1999).

No esta claro cuándo la peroxidación representa una causa primaria o es un efecto secundario de un desorden oxidativo. En muchos casos el proceso de peroxidación es

desencadenado por una situación de estrés y luego se establece una retroalimentación que lleva a que el daño celular se acelere (Shewfelt y Purvis, 1995).

2.3. Daño por estrés oxidativo a membranas celulares

Los síntomas de daño inducido por estrés se presentan generalmente bajo la forma de tejidos con apariencia húmeda que finalizan en necrosis, pérdida de electrolitos e impedimentos en recobrar la turgencia celular luego de eliminado el factor de estrés. Estos síntomas indican que las membranas celulares son el sitio de mayor daño (Palta, 1990), y precisamente la peroxidación de lípidos inducida por producción de EROs es considerada un mecanismo principal en el deterioro de la membrana durante la senescencia natural o impuesta por estrés (Dhindsa y col., 1981). En ese sentido midiendo los niveles de malondialdehído (MDA) como producto secundario de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Hodges y col., 1999), se ha determinado que la peroxidación de fosfolípidos es el primer desorden observado en plantas que sufren estrés oxidativo. Así se produce en hojas una primera respuesta generando aumento en la permeabilidad de electrolitos, seguido por una caída en la fotosíntesis por destrucción de la estructura tilacoidal de los cloroplastos (Hodges y Forney, 2000). El aumento de pérdida de electrolitos, que proporciona una estimación del grado de permeabilidad de la membrana, implica disminución en las propiedades de transporte del plasmalema que afecta la composición del protoplasma como asimismo la del entorno celular. Estos cambios perjudican a los componentes celulares, principalmente a las proteínas, con la disminución de la actividad de enzimas como la H⁺-ATPasa y la calmodulina (Shewfelt y Purvis, 1995). La disrupción de la integridad de la membrana celular es seguida por la disrupción de organelas tales como mitocondrias y cloroplastos.

2.4. Estrés por exposición a altas temperaturas y elevada radiación solar

En regiones áridas o semiáridas los organismos que se desarrollan durante la estación estival expuestos al sol suelen soportar situaciones climáticas extremas. Durante el verano y en las horas de mayor intensidad solar la temperatura de los tejidos expuestos puede superar fácilmente los máximos tolerables. Sumado al efecto del calor existe la incidencia de las radiaciones solares, las que en exceso aportan más energía que la que la planta puede metabolizar.

Estas condiciones ambientales generalmente se presentan en forma conjunta, pero ya sea por separado o en combinación favorecen rutas metabólicas que usan el oxígeno como un aceptor de electrones asociados a la formación de radicales libres y procesos oxidativos (Foyer y col., 1994).

2.4.1. Efecto de las altas temperaturas

Las plantas poseen una maquinaria química que les es propia y por tanto presentan sensibilidad a las temperaturas. La temperatura junto con el agua y la luz constituye un de los factores ambientales críticos para el desarrollo de los vegetales. Cada reacción enzimática, función metabólica y proceso fisiológico presenta temperaturas óptimas y límites por encima y por debajo de las cuales no se producen. Las temperaturas en las cuales los procesos biológicos pueden llevarse adelante están generalmente limitadas por el punto de congelamiento del agua en el extremo inferior y la desnaturalización de las proteínas en el extremo superior (Hopkins y Hüner, 2004)

Las plantas casi siempre mueren cuando se exponen a temperaturas superiores de 44-50 °C (Salisbury y Ross, 2000). Actualmente está bien documentado que las altas temperaturas producen estrés oxidativo tanto en animales como en los diferentes órganos de una planta (Hodges y col., 2001; Panchuk y col., 2002; Tang y col., 2006). Frente a un estrés por altas temperaturas y como consecuencia de un aumento en la necesidad de eliminar EROs en los vegetales frecuentemente se observa que se incrementa la actividad de SOD, APX y CAT tanto en hojas como en frutos (Ma y Cheng, 2004; Almeselmani y col., 2006; Vicentea y col., 2006). Por lo tanto el ciclo del glutathion–ascorbato juega un papel importante en el

metabolismo de eliminación de EROs limitando el daño producido por altas temperaturas (Ali y col., 2005; Guoa y col., 2006).

El aumento de EROs por efecto de temperatura sobre los valores límites de tolerancia para cada especie, aumenta la oxidación de lípidos (Xiaozhong y Bingru 2000; Hui y col., 2007), desnaturalización de proteínas (Ali y col., 2005) y alteración en el patrón de expresión génica (Tang y col., 2006). Estas perturbaciones conducen a daños en la estructura celular, incluyendo a organelas y citoesqueleto, que impiden las funciones de membrana y producen pérdida de actividad de las enzimas debido al debilitamiento de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que estabilizan su configuración nativa (Azcon-Bieto y Talon, 1993; Buchanan y col., 2000).

Liu y col. (2003) han comprobado que con temperaturas superiores a 40 °C la permeabilidad de la membrana se incrementa según una función logística. Este aumento se debe fundamentalmente a que como consecuencia de las altas temperaturas en las membranas celulares se producen cambios en la síntesis de ácidos grasos insaturados (Guerzoni y col., 2001) y aumento en la peroxidación de los lípidos (Shewfelt y Purvis, 1995; Xiaozhong y Bingru, 2000). Estos cambios en la composición química de las membranas por efecto de altas temperaturas resultan en perturbación de la integridad y fluidez de las mismas, reflejado en un aumento en la pérdida de electrolitos (Xiaozhong y Bingru, 2000; Xu y Huang, 2004; Zhao y col., 2007).

El aumento progresivo de la temperatura induce mayor síntesis de proteínas hasta cierto límite que se encuentra aproximadamente a los 40 °C (Ali y col., 2005). Si los tejidos de frutos y hojas son tratados con temperaturas superiores a los límites de tolerancia el contenido de proteínas presenta disminución. Con altas temperaturas no sólo se ve afectada la desnaturalización de proteínas, sino que además se ve disminuida la síntesis de proteínas del metabolismo normal y aumentada la transcripción y traducción de un nuevo grupo de proteínas denominadas de choque térmico (heat shock proteins) (Bowen y col., 2002). Esta respuesta es observada cuando las plantas son sometidas a temperaturas superiores en 5 °C a las condiciones óptimas de crecimiento (Buchanan y col., 2000).

El aumento de la temperatura provoca interrupción en las rutas metabólicas asociadas a la generación de energía y respiración. Se ha comprobado que en los frutos, inclusive en los que presentan escaso contenido de clorofila, el ciclo de Calvin es activo fijando el CO₂ interno de los tejidos. Por lo tanto los frutos son susceptibles a los daños causado por altas

temperaturas al mecanismo fotosintético (Smillie, 1992). La parte más sensible al calor son los complejos del fotosistema II, aunque también se ven afectadas de manera adversa la Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa y otras enzimas del metabolismo del carbono (Salisbury y Ross, 2000). Se ha observado que el estrés por altas temperaturas produce disminución del contenido de clorofila y reducción en la tasa fotosintética (Guoa y col., 2006).

Los frutos de manzana presentan baja transpiración lo que incide en una baja capacidad para disipar el calor. Esto hace que en condiciones de altas temperaturas la cara expuesta de los frutos sufra mayor estrés oxidativo y al prolongarse esta situación aparezcan afecciones fisiológicas como el asoleado (Schrader, 1997; Yuri y col., 2000-a).

2.4.2. Efecto de elevada radiación solar

La radiación solar en los vegetales es beneficiosa dado que dirige y está asociada a procesos metabólicos fundamentales para la vida. La mayor parte de la radiación que incide un órgano vegetal es reemitida en forma de radiación infrarroja, otra parte es disipada por conducción, convección y por la evaporación de agua que acompaña a la transpiración. Una pequeña parte es acumulada como cambios en la temperatura del órgano, fundamentalmente en el agua que contiene. Por otro lado una porción del espectro de la radiación electromagnética es absorbida por moléculas de pigmentos que quedan así activados y parte de la energía de activación es acumulada como energía química (fotosíntesis) o disipada como fluorescencia, fosforescencia, calor o transferencia a otros pigmentos (Azcon-Bieto y Talon, 1993).

Cuando la energía radiante incidente es muy grande y los mecanismos de disipación y control no son suficientemente efectivos se produce un exceso de energía de excitación y calentamiento del órgano. El exceso de energía de excitación lleva a una máxima excitación de las moléculas de clorofila y a la superproducción de electrones por la oxidación del agua aumentando los niveles de H₂O₂ (Foyer y col., 1994). La cantidad de exceso de energía de excitación que la planta experimenta está dictada también por otros factores de desarrollo y ambientales que determinan que la energía que la planta requiere para los procesos celulares

varíe. Enfermedades, estatus hídrico y nutricional limitado y rápidos cambios en la temperatura pueden promover exceso de energía de excitación inclusive en situaciones de iluminación que en condiciones adecuadas no provocarían problema (Demmig-Adams y Adams, 1992).

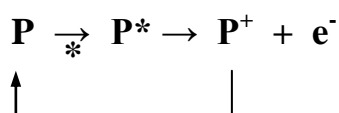
Como resultado de los efectos directos que se suceden cuando la radiación que llega del sol excede el nivel máximo característico para cada vegetal, se puede generar una situación desfavorable conocida como "estrés fotooxidativo" (Foyer y Harbinson, 1994; Slesak y col., 2002). Esta denominación general comprende los daños que sufren los componentes celulares debido a un exceso de radiaciones UV, IR e inclusive de luz visible, que causan aumento de energía de excitación afectando el equilibrio electrónico de las moléculas y elevación de la temperatura de los órganos expuestos.

La porción del espectro de alta energía UV origina cambios químicos por transferencia de electrones de una molécula a otra, provocando fundamentalmente mutaciones irreversibles en el material genético (Azcon-Bieto y Talon, 1993; Krause y col., 1999). La luz UV causa dimerización de las bases de timina, lesiones en el ADN y destrucción de la proteína D1 del fotosistema II, y además se ha observado aumento en la pérdida de electrolitos debido a peroxidación de lípidos (Foyer y col., 1994). Se ha determinado que una exposición a radiaciones UV también puede acarrear destrucción de las defensas antioxidantes del organismo (Strid, 1993), por lo que parte de la acción destructiva de la radiación UV resulta de mecanismos que involucran directa o indirectamente la generación de EROs.

Los mecanismos más sensibles a fotooxidación en las plantas son los que están asociados y dirigidos por eventos que dependen de la luz. Uno de los problemas más serios que acarrea la utilización de la radiación fotosintéticamente activa como fuente de energía para realizar reacciones químicas, es que la alta reactividad de los estados excitados y radicales libres participantes en cualquier proceso fotoquímico hace probable que se produzcan transformaciones no deseadas. En efecto el sistema de transporte de electrones de la fotosíntesis es la mayor fuente de EROs (Asada y col., 1999).

A pesar de que la especial constitución y precisa organización estructural del aparato fotosintético reduce considerablemente la frecuencia con que se producen procesos distintos de los que conducen a la disipación inocua de energía, dichos procesos alternativos que son fuente de EROs ocurren en cierto grado (Azcon-Bieto y Talon, 1993). El origen de los procesos secundarios deletéreos reside esencialmente en desajustes entre las etapas

individuales de la fotosíntesis. En primer lugar, debemos tener en cuenta que cualquiera de los constituyentes intrínsecos (no sustratos) que intervienen en la fotosíntesis experimenta un ciclo de cambios durante su intervención y que la capacidad para participar en un nuevo ciclo depende de que el constituyente haya terminado el anterior y vuelto al estado inicial. Así por ejemplo, el ciclo del donador primario del centro de reacción en cualquiera de los dos fotosistemas es:



La única forma del donador primario que puede aceptar un excitón (fotón) que produzca su oxidación es **P**, de manera que si el excitón lo encuentra como **P*** o **P⁺** debe seguir en la antena hasta encontrar otro **P** disponible o relajarse mediante una ruta alternativa. De forma paralela, si el aceptor primario está reducido, no puede aceptar el electrón de **P*** en la reacción fotoquímica primaria y **P*** debe relajarse también por una ruta alternativa (Azcon-Bieto y Talon, 1993). En condiciones ambientales normales los procesos alternativos a la transformación de la energía solar en química se producen siempre aunque en baja frecuencia permitiendo que funcionen los procesos de protección de la planta.

3. Sistemas de defensa antioxidante

Tal como se adelantó al comienzo de esta introducción, vivir en un medio oxigenado ha requerido la evolución de estrategias celulares efectivas para detectar y detoxificar las EROs (Bowler y col., 1992). El sistema de defensa antioxidante celular es amplio y provee protección a las moléculas biológicas contra el daño oxidativo.

Las enzimas antioxidantes, tales como SOD, CAT, APX, dehidroascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato peroxidasa, dehidroascorbato reductasa, GR, etc, no están distribuidas uniformemente dentro de la célula y varía entre los distintos compartimentos celulares. (Tabla 3).

Enzima antioxidante	Abreviatura	Localización subcelular
Acorbato peroxidasa	APX	Citosol, estroma de plastídios, membrana de plastídios, nódulos de raíces
Catalasas	CAT	Citosol, peroxisomas, glioxisomas
dehidroascorbato reductasa	DAR	Citosol, estroma de plastídios, nódulos de raíces
Glutación reductasa	GR	Citosol, mitocondrias, estroma de plastídios, nódulos de raíces
monodehidroascorbato reductasa	MDAR	estroma de plastídios, nódulos de raíces
superóxido dismutasa	Cu/Zn SOD	Citosol, peroxisomas, plastídios, nódulos de raíces
	Mn SOD	Mitocondrias
	Fe SOD	Plastídios

Tabla 3.: localización subcelular de las enzimas antioxidantes.

Además de estas enzimas existe una variedad de antioxidantes cuyas estructuras y potencial de óxido-reducción son marcadamente diferentes. El AsA es un buen agente reductor y puede proteger otros antioxidantes como la vitamina A, vitamina E y ácidos grasos esenciales. El GSH detoxifica el H₂O₂, en una reacción catalizada por la GR. Algunos terpenoides o isoprenoides (un grupo de compuestos químicos en su mayoría producto del metabolismo secundario) tales como los carotenoides, han probado ser eficientes como antioxidantes especialmente en la protección contra la peroxidación de lípidos (Lu y Foo, 2000; Grassmann y col., 2002). El caroteno y los pigmentos carotenoides son efectivos en la sustracción de EROs. Con el nombre de vitamina E se describe una familia de ocho antioxidantes (cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles), los que remueven radicales altamente activos y protegen a los lípidos insaturados de las membranas de la oxidación (Curry, 1996). Otros compuestos como los flavonoides (pigmentos derivados del metabolismo

de los fenoles) son excelentes eliminadores de EROs y consisten en decenas de compuestos estructuralmente similares, que sólo difieren en el grado y tipo de sustitución de los anillos o en el tipo y grado de glicosilación. Finalmente, se ha demostrado recientemente que los ácidos lipoico y dehidrolipoico son efectivos como agentes secuestrantes de radicales libres (Navari-Izzo y col, 2002).

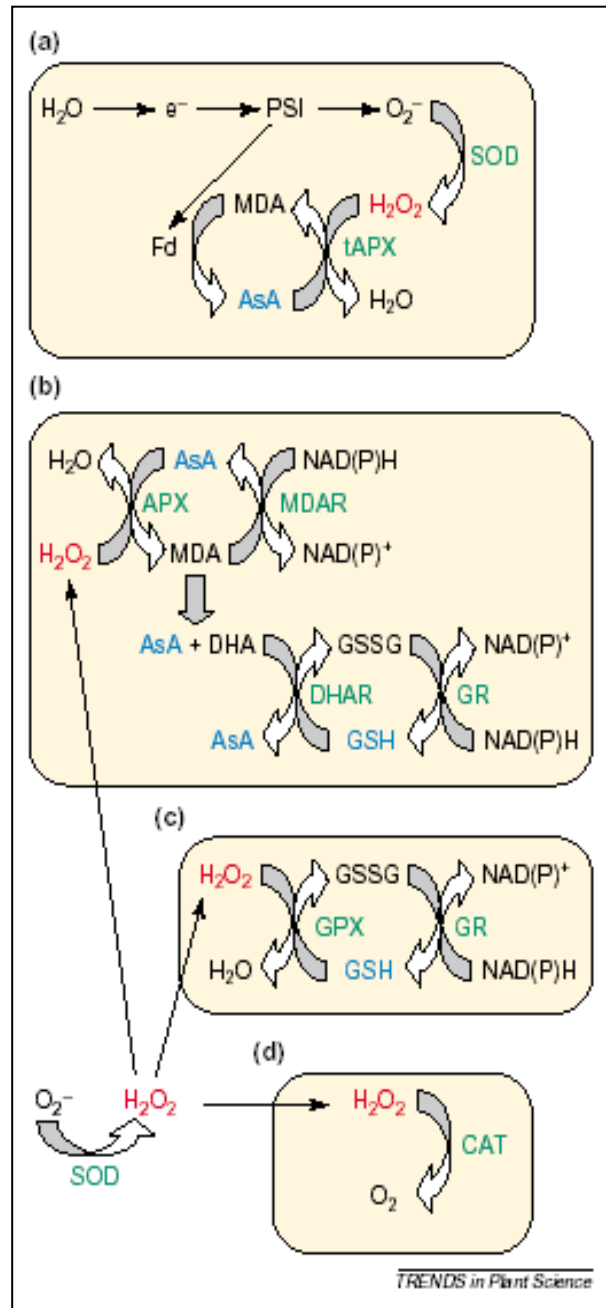
3.1. Mecanismos enzimáticos de eliminación de EROs

Entre los procesos enzimáticos de protección al estrés oxidativo existe un mecanismo mediado por la acción de SOD, que está presente en casi todos los compartimentos celulares, por el cual los aniones $O_2^{\bullet-}$ se eliminan con producción de H_2O_2 . Luego otras enzimas, la CAT y la APX, son las responsables de eliminar el H_2O_2 (**Figura 3**).

En los cloroplastos se ha encontrado operativa una vía que obtiene la energía para la reducción del H_2O_2 directamente del aparato fotosintético (**Figura 3 a**) y se ha denominado ciclo de Agua-agua (Asada, 1999). En el cloroplasto, en la mitocondria, en los peroxisomas y en el citoplasma, opera un mecanismo denominado ruta de Halliwell-Asada y que corresponde al ciclo del ascorbato-glutación (**Figura 3 b**). Esta vía implica la acción de las enzimas APX, MDAR, DAR y GR usando el poder reductor del NADPH mediante las cuales se elimina el H_2O_2 (Azcon-Bieto y Talon, 1993). La amplia distribución de esta vía y la alta afinidad de la APX por el H_2O_2 sugieren que la misma tiene un papel crucial en controlar el nivel de EROs en los compartimentos donde está presente.

Existen otros mecanismos que también actúan en la remoción de EROs, el de la glutación peroxidasa (GPX) en citosol, mitocondrias y plastidos (**Figura 3 c**), y la vía de las CAT en los peroxisomas (**Figura 3 d**). Las CAT no requieren un aporte de equivalentes de reducción, por lo tanto son independientes del estado redox de la célula, esto implica que su funcionamiento no se ve afectado por una situación de estrés oxidativo, al menos en forma directa por limitación de cofactores (Mittler, 2002).

Figura 3. Vías de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en plantas. (a) Ciclo agua-agua. (b) Ciclo de Ascorbato-glutación. (c) Ciclo de la Glutación peroxidasa (GPX). (d) Ciclo de la catalasa (CAT). La Superóxido dismutasa actúa en la primer línea de defensa convirtiendo O_2^- en H_2O_2 . La Ascorbato peroxidasa (APX), GPX y CAT luego detoxifican H_2O_2 . En diferencia a la CAT (d), la APX y GPX requieren ascorbato (AsA) y/o glutación (GSH) regenerado ciclicamente (a-c). Estos ciclos necesitan electrones donados directamente del aparato fotosintético (a) o del NAD(P)H (b,c) como poder reductor. Las EROs están indicadas en rojo, los antioxidantes en azul y las enzimas secuestradoras de EROs en verde. Abreviaturas: DHA, dehidroascorbato; DHAR, DHA reductasa; Fd, ferredixina; GR, glutación reductasa; GSSG, glutación oxidado; MDA, monodehidroascorbato; MDAR, MDA reductasa; PSI, fotosistema I. Extraído de: Mittler R. (2002) Trends Plant Science 7:405-410.



3.2. Evolución del sistema antioxidante en el desarrollo de órganos, en particular durante la maduración de los frutos

Durante la maduración de frutos climatéricos es característica la diferenciación de los cloroplastos en cromoplastos acompañada por una pérdida en clorofila, importantes

modificaciones estructurales y la acumulación de lípidos poliinsaturados y carotenoides. Se ha informado que el estrés oxidativo transiente "in vivo" juega un papel importante en la inducción de síntesis de carotenoides en cromoplastos y en la transformación de cloroplastos a cromoplastos (Bouvier y col, 1998). De igual manera en la piel de los frutos de manzanas coloreadas como "Gala" y "Smoothie" en frutos maduros persiste una cierta cantidad de clorofila que hace funcional al sistema fotosintético (Ma y Cheng, 2003).

Jimenez y col., 2002-a han determinado que en frutos de tomate los niveles de indicadores de procesos oxidativos (peroxidación de lípidos y concentración de peróxidos de hidrógeno) tanto como la actividad de las enzimas del ciclo del glutathione-ascorbato aumentan siguiendo el proceso de maduración. No obstante, cuando comienzan la senescencia se registra declinación en los niveles de los sistemas antioxidantes tanto no enzimático como enzimático, disminuyendo así su capacidad de eliminar EROs (Hodges y Forney, 2000).

Abassi y col. (1998), estudiando la capacidad de detoxificación de EROs durante el desarrollo de yemas de flores y crecimiento de frutos en manzana (*Malus domestica* Borkh cv. Red Delicious), demostraron que la actividad de enzimas antioxidantes es elevada en los primeros estadios hasta que el fruto se establece, luego baja y se estabiliza durante el desarrollo de los mismos y llegado el momento de maduración el comportamiento varía entre las diferentes enzimas. La SOD permaneció estable hasta la fecha de cosecha en cambio CAT presentó un leve aumento. En estudios realizados sobre la variedad de manzana Braeburn al acercarse la fecha de cosecha también fue variable el nivel de actividad de las enzimas antioxidantes. Se observó aumento en peroxidasas y declinación en SOD desde las fechas más tempranas de cosecha hacia las más tardías (Gong y col., 2001).

En general, existe acuerdo en que al producirse la senescencia de los tejidos vegetales se observa una disminución de las enzimas antioxidantes relacionadas con el aumento de EROs, el inicio de la degradación de los lípidos y la oxidación de proteínas, característicos de la muerte del vegetal (Shewfelt y Purvis, 1995; Lacan y Baccou, 1998; Hodges y col., 2004). Se ha demostrado que los niveles de compuestos reductores en hoja de varias especies herbáceas están negativamente correlacionados con la dinámica de la senescencia (Meir y col., 1995). Manipulando la cantidad de luz azul y UV en células de la capa de Aleurona de granos de cereal para estudiar el proceso de muerte celular programada, se encontró que la producción de EROs es un factor clave en el envejecimiento. El efecto de la luz en la muerte celular programada se vio contrarrestado incubando las células con compuestos antioxidantes. Se

observó que una reducción en las enzimas que metabolizan EROs incluyendo APX, CAT y SOD precede a la muerte celular (Jones y col., 2000).

3.3. Defensas antioxidantes frente a situaciones de estrés por altas temperaturas y elevada radiación solar

El proceso de muerte natural va acompañado de una disminución en el sistema antioxidante, pero cuando la muerte es producto de una situación de estrés oxidativo el comportamiento de los detoxificantes de EROs es diferente. En general las enzimas del ciclo de AsA-GSH aumentan así como los compuestos antioxidantes no enzimáticos. No obstante en situaciones extremas o de estrés prolongado, el aumento de las defensas no llega a ser suficiente y el daño oxidativo lleva a la muerte celular.

La exposición a elevadas temperaturas genera aumento en la respuesta antioxidante. En el quemado o asoleado de frutos de tomate, en el que se conjuga el estrés generado por altas temperaturas e irradiancia, se ha observado aumento en los niveles de SODs (Rabinowitch et al, 1980). En general, tanto en frutos de manzanas como en otros tejidos vegetales se ha encontrado que como respuesta al aumento de temperatura se incrementa la síntesis de proteínas de choque térmico y la actividad de las enzimas que constituyen el ciclo del glutatión ascorbato (Ritenour y col., 2001; Bowen y col., 2002; Hodges y col., 2004; Ma y Cheng, 2004; Almeselmani y col., 2006).

Las especies que presentan estas características resultan termotolerantes (Liu y Huang, 2000). Basados en este mecanismo existe un procedimiento (tratamientos de calor subletal por periodos cortos) para prolongar la conservación de los frutos y, consiste en inducir la actividad de enzimas antioxidantes para aumentar la capacidad de detoxificación de EROs y retardar los procesos de senescencia celular (Torres y col., 2003; Hodges y col., 2004; Vicente y col., 2006). En manzanas se ha comprobado que el camino enzimático del glutatión-ascorbato juega un papel importante en la adquisición de termo tolerancia mediante la detoxificación de EROs originadas por exposición al sol (Ma y Cheng, 2004).

Trabajando en estrés provocado por altas radiaciones lumínicas (600 W m^{-2}) en hojas de trigo (*Triticum aestivum* L.) se observó aumento en la actividad de SOD y APX indicando como consecuencia un incremento en la protección contra la mayor producción de EROs

debida a fotooxidación (Mishra y col., 1993). Este incremento en la concentración de enzimas fue por síntesis de novo según se demostró usando cycloheximida, un inhibidor directo de la síntesis proteica. El contenido de AsA siguió igual dinámica que SOD y APX, aunque respecto de CAT en ese estudio se observó un decrecimiento en la actividad enzimática, probablemente asociado a la fotolabilidad de la enzima.

En especies perennes sometidas a diferentes niveles de irradiancia (20, 100, 1200 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se ha observado en sus hojas un aumento en los compuestos antioxidantes AsA, GSH y α -tocoferol, así como se registraron incrementos en el “pool” de los compuestos del ciclo del glutatión-ascorbato (Grace y Logan, 1996). No obstante, en este estudio también se observó una leve disminución en la actividad de CAT.

Comparados con las hojas, los frutos tienen menor capacidad para fotosíntesis y por lo tanto la cara expuesta de los frutos presenta mayor necesidad de disipación del exceso de energía. Se ha observado que en los tejidos de la cara expuesta de estos órganos la actividad de las enzimas APX y GR es mayor, la de la SOD es similar y la de la CAT es menor respecto de la cara no expuesta (Ma F. y Cheng L. 2003).

4. Tolerancia al estrés oxidativo y manipulación genética del sistema de defensas antioxidante

Las plantas exhiben un espectro de respuestas a un aumento en la densidad de flujo fotónico (DFF) (**Figura 4.**). Por arriba de determinada intensidad de DFF el aparato fotosintético no es capaz de utilizar toda la energía absorbida por la clorofila y es derivada a procesos oxidativos. Estos daños son más dramáticos en plantas aclimatadas a la sombra ya que las mismas tienen baja capacidad tanto para el transporte fotosintético de electrones como para las respuestas de fotoprotección. Esas plantas van a experimentar una sustancial inactivación de los procesos fotosintéticos a un nivel DFF mucho más bajo que las plantas aclimatadas a plena exposición solar (Demmig-Adams B. y Adams W.W. 1992).

Eso ocurre porque las plantas tienden a aclimatarse a la energía solar que reciben y a la temperatura del ambiente en el cual se desarrollan y esa adaptación involucra cambios a nivel morfológico y en la regulación de procesos fisiológicos y bioquímicos.

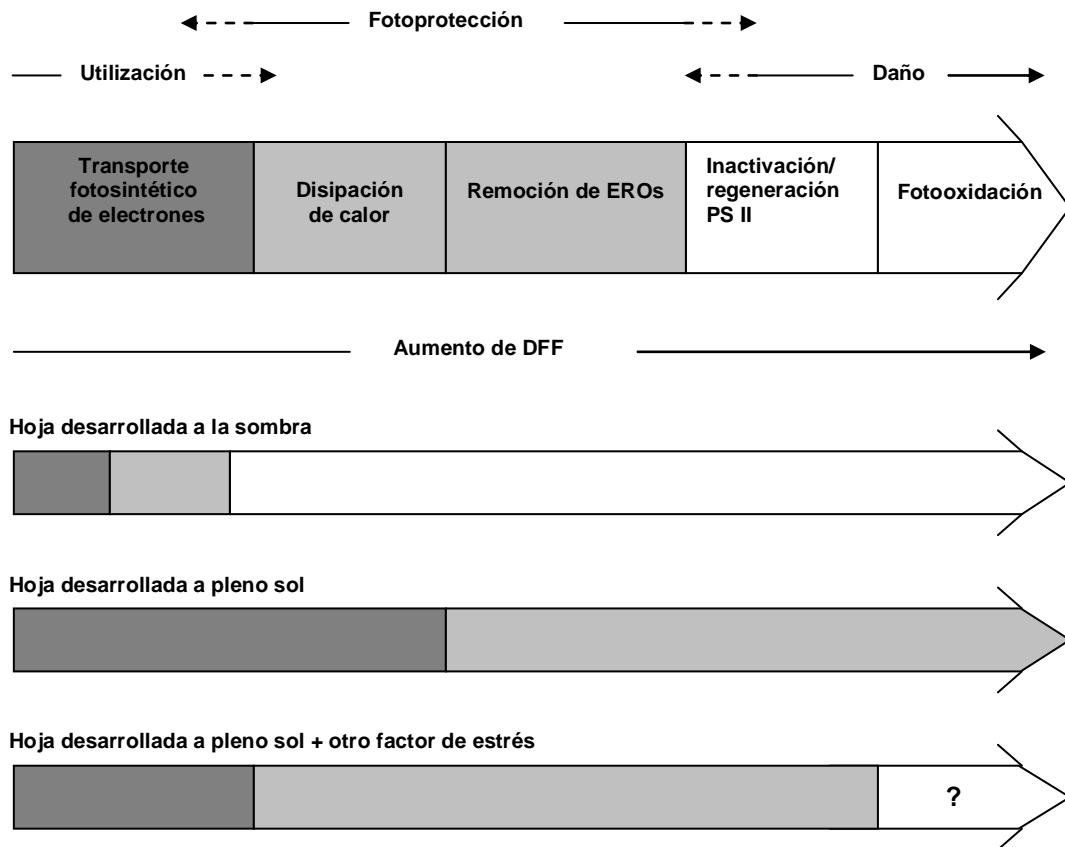


Figura 4.: Representación esquemática de las diferentes respuestas de aparato fotosintético a la absorción de niveles crecientes de DFF, incluyendo la utilización de la luz en fotosíntesis, varias respuestas de fotoprotección y daño potencial. La magnitud relativa de los diferentes procesos se ilustra para una hoja sombreada, una expuesta a plena radiación solar y a plena radiación solar sumado a otro factor de estrés. No se sabe a que grado de inactivación y recambio del PS II (y posible fotoprotección) ocurre en hojas expuestas a plena radiación solar sumado a otro factor de estrés. Extraído de Demmig-Adams B. y Adams W.W., 1992.

Numerosos estudios realizados sobre diferentes géneros de plantas en condiciones de estrés oxidativo han demostrado un aumento en los compuestos asociados al sistema de defensas antioxidantes (Grace y Logan, 1996; Hodges y col., 1997; Zhang y Schmidt, 2000). Dado que las situaciones de estrés inducen un aumento en la actividad en las defensas antioxidantes, surgieron investigaciones con el fin de obtener vegetales que sobreexpresen uno o varios de los componentes del sistema antioxidante.

Se comprobó que una alfalfa transgénica que sobreexpresaba SOD presentaba mayor tolerancia al déficit hídrico (Mc Kersie y col., 1996). Trabajos realizados sobre *Arabidopsis*

thaliana han logrado catorce mutantes que sobreexpresan APX citosólica, GR, monodehidroascorbato reductasa, y todas las isoformas de SOD, muchos de los cuales presentaron menor susceptibilidad a estrés oxidativo (Kliebenstien y col., 1997). Por otra parte estudios realizados en alfalfa transgénica que sobreexpresaba Fe-SOD han verificado una mayor resistencia al estrés oxidativo sufrido durante el invierno, debido a una mayor protección del sistema fotosintético (Mc Kersie y col., 2000).

En los vegetales con sobreexpresión de SOD se ha demostrado incremento en la resistencia a estrés oxidativo. Esto indicaría que la SOD es una enzima clave en la producción de transgénicos resistentes (Bjorn y Brian, 1997). Para dilucidar la correlación entre la actividad SOD y la tolerancia a estrés se aislaron cDNAs de Cu/Zn-SOD desde plastidios de gramíneas y arroz. Por ingeniería genética se desarrollaron plantas de arroz que presentaban aumentada la expresión de esta enzima y se observó un sorprendente aumento en el ARNm de Cu/Zn-SOD de plastidios en apenas dos horas después de tratar a las plantas con 10 μ M de paraquat, que es un potente generador de radicales libres en vegetales. Con idéntico propósito se produjeron plantas de tabaco que sobreexpresaban SOD y APX de espinaca y también demostraron mayor resistencia a paraquat (Kaminaka y col., 1997). En comparación con SOD, otras enzimas del sistema antioxidante han recibido menor atención respecto de los efectos de producir plantas que las sobreexpresen. Usando síntomas de deterioro foliar como criterio de daño para evaluar resistencia a paraquat, se ha reportado que la introducción de genes de GR de bacteria a plantas de tabaco a rindió resultados exitosos (Aono y col., 1993)

En horticultura, la obtención de plantas mutantes que presenten elevada actividad de enzimas antioxidantes ha recibido mucha atención en los últimos años. Ensayos realizados en plantas de tomate que sobreexpresan Mn-SOD han proporcionado resultados alentadores en cuanto a aumentar su resistencia a bajas y altas temperaturas así como a salinidad (Wang y col., 2002-a). En este mismo género se ha logrado obtener plantas transformadas que por producir mayor cantidad de APX han demostrado claramente mayor supervivencia a la acción de frío, calor y paraquat (Wang y col, 2002-b).

En plantas de frutales son escasos los trabajos realizados para lograr mutantes resistentes a estrés por elevada radiación solar y temperatura. No obstante, en la Universidad del Estado de Oregón (EEUU), se han desarrollado recientemente líneas transgénicas de manzana “Gala” que sobreexpresan el gen de APX citosólico derivado de espinaca. La transformación fue realizada a través de *Agrobacterium* y el gen de APX fue diseñado bajo control del promotor

35S. Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se identificaron al menos veinte líneas, todas las cuales presentaron resistencia a estrés por elevada temperatura. Colocando discos de hojas a 44 °C por 14 h se verificó que las plantas tipo salvaje presentaban 100 % de pérdida de electrolitos, en cambio las transformadas exhibían solo 40 a 75 % dependiendo de cada línea específica (Wisniewski y col., 2002).

5. Uso del Caolín en la prevención de asoleado

El asoleado de frutos es una problemática común a distintas regiones productoras del mundo, especialmente en regiones áridas y semiáridas, en las cuales se produce un excesivo calentamiento del canopeo, término que es usado aquí como el volumen que abarca toda la copa del árbol incluyendo los frutos y el aire.

En la actualidad se están probando diferentes tipos de tecnologías para disminuir el daño por asoleado. Entre las alternativas evaluadas, la aplicación de pantallas solares minerales en base a Caolín es una de las que mejores resultados ha proporcionado a nivel mundial. Según estudios realizados en Nueva Zelanda, Australia y EEUU, el Caolín usado como protector ante situaciones de estrés, de enfermedades y como insecticida, constituye un insumo económicamente viable asociado a la ventaja de ser apto para la producción orgánica de manzanas y peras (Glenn y col., 1999; Wünsche y col., 2001)

En el estado de Washington, durante el año 2002 fueron tratadas con Caolín el 40% de la superficie de perales y el 20% de manzanos. En nuestra región algunas empresas han comenzado a realizar las primeras pruebas con resultados alentadores.

El Caolín es un polvo blanco y suave que está constituido fundamentalmente por Caolinita, una familia mineral del grupo de las arcillas. La formulación usada en la agricultura es un producto altamente purificado, calcinado y molido para dar un polvo químicamente inerte y no abrasivo. Los productos que se encuentran en el mercado contienen 95% de Caolín. La principal diferencia entre los productos se encuentra en el porcentaje de Caolinita presente en el Caolín usado por la empresa que fabrica el producto, y puede variar entre 70 a 93%. Así por ejemplo los Caolines extraídos de canteras de la provincia de Río Negro tienen concentraciones de 92% de Caolinita, el 8% restante lo constituye el Cuarzo y la Zeolita.

Tratadas con una ingeniería especial para lograr un tamaño y forma adecuado, las partículas de Caolín actúan reflejando los rayos solares. Así, un film de partículas generado

con la aplicación de Caolín refleja tanto las longitudes de onda del infrarrojo, que son las causantes de calentamiento, como las longitudes del UV que producen el “quemado” de diferentes órganos del vegetal (Glenn y col., 2000). No obstante, la luz visible que pasa a través de la película de partículas es suficiente para que el vegetal lleve adelante la fotosíntesis. Aplicado en forma agronómica, el film de caolín transmite un 90-98% de la radiación fotosintéticamente activa (Glenn y col., 2000), lo que explica por qué estudios realizados midiendo la tasa fotosintética por intercambio gaseoso de árboles cubiertos con caolín han demostrado 30 % más de eficiencia en la fotosíntesis que los no tratados (Glenn y col., 2000). Sobre este tema existen trabajos que reportan lo contrario, así por ejemplo Wünsche y Palmer (1997) encontraron una disminución del 20% en la absorción de luz en las hojas tratadas con caolín. Cuando las mediciones de tasa de asimilación de carbono se realizaron a nivel de hoja se registró una disminución en el intercambio gaseoso por tratamiento con caolín, aunque no se observaron cambios en la conductividad estomática ni en la transpiración de las hojas. Las diferencias en los índices fotosintéticos que se observan a nivel hoja respecto del canopeo pueden ser debido a una mejora en la distribución de la luz por reflexión dentro del árbol (Wünsche J.N. y col, 2002)

Estudios realizados por dispersión de rayos-X muestran que las partículas de caolín se embeben en las capas de cera de la cutícula de los frutos (Curry y col., 2002). Dado que el producto desvía los rayos infrarrojos disminuyendo el calentamiento de la superficie del fruto, mantiene la temperatura en valores más cercanos a lo normal para el metabolismo celular. Informes realizados sobre diferentes tipos de frutos indican una reducción promedio en la temperatura de la cara expuesta de los frutos de 5 °C (Melgarejo y col., 2002). Por otra parte, al reflejar los rayos ultravioleta el caolín merma la producción de radicales libres, responsables del bronceado (oxidación) de la piel del fruto a largo plazo.

La disminución de temperatura en el vegetal le permite superar en mejores condiciones el estrés hídrico e intenso calor (Williams, 1993). En los árboles tratados se observa que las hojas permanecen más tiempo verdes, y debido a su mejor condición fisiológica su caída se produce más tarde en la temporada. La mayor duración de la superficie fotosintéticamente activa prolonga el período de acumulación de carbohidratos, ya que se produce mayor cantidad de asimilados y azúcares lo que en algunas variedades resulta en un aumento del vigor de la planta y del rendimiento final. Trabajos realizados en pera variedad "D`Anjous"

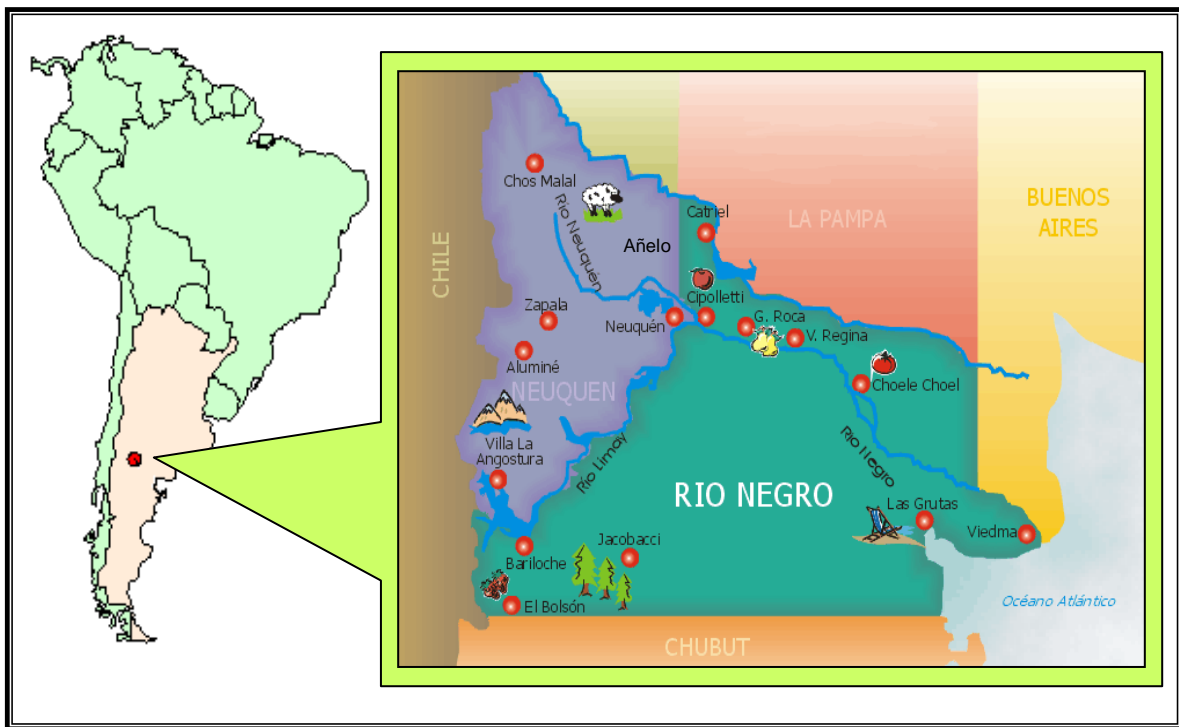
han demostrado un aumento de 10,7% en la producción de las plantas tratadas con caolín (Werblow, 1999).

Datos de distintas fuentes, tanto regionales como extranjeras, indican disminuciones en porcentaje de frutos asoleados en plantaciones tratadas con Caolín. En manzanas, la reducción promedio de frutos dañados es de un 20-25% dependiendo la variedad. Ensayos realizados en Estados Unidos indican una disminución de 23.9% de asoleado en frutos de la variedad Fuji (Schupp y col, 2002). En zonas productoras de Chile se han publicado mermas de asoleado de hasta 50% para la variedad Imperial Gala (Prado, 2003).

MATERIALES Y MÉTODO

1. Localización y datos meteorológicos del lugar y período de estudio

Los estudios fueron realizados en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue, en la localidad de Cinco Saltos (Latitud 38° S y Longitud 67° O), a 8 Km de la ciudad de Cipolletti, provincia de Río Negro, Argentina (**Mapa 1**).



Mapa 1: ubicación geográfica de la región donde se realizó el estudio.

El clima durante las temporadas en que se realizaron los ensayos (detallado en la **Tabla 4**) se caracterizó por temperaturas elevadas. Durante el verano en general fueron del orden de las temperaturas promedio, pero analizando enero se observa que en los dos años en que trabajamos las temperaturas máximas fueron superiores a los promedios históricos. También

es destacable que se registraron temperaturas máximas maximorum que llegaron a los 40 °C. La radiación y la heliofanía fue la característica para esta época del año.

Tabla 4: Registros meteorológicos obtenidos en la estación meteorológica instalada en la Facultad de Ciencias Agrarias para las temporadas de crecimiento de frutos 2002/03 y 2003/4 y promedios históricos para el mismo período.

Variables climatológicas	Meses		
	Diciembre	Enero	Febrero
Promedios históricos			
Temperatura máx.(°C)	28,2	29,6	28,7
Radiación máx. (W/m ²)	1258	1263	1128
Heliofanía efectiva med. (Hs)	10,2	10,5	9,5
Humedad Relativa med. (%)	54	54	58
2002-03			
Temperatura máx. (°C)	28,4	30,6	29,4
Radiación máx. (W/m ²)	1220	1235	1132
Heliofanía efectiva med. (Hs)	9,3	12,1	11,0
Humedad Relativa med. (%)	60	57	57
2003-04			
Temperatura máx. (°C)	26,4	31,7	27,6
Radiación máx. (W/m ²)	1255	1265	1095
Heliofanía efectiva med. (Hs)	11,1	11,4	10,6
Humedad Relativa med. (%)	67	54	68

Los años en los que se ha trabajado han presentado condiciones climáticas dentro del orden de los promedios históricos (**Tabla 4**), por lo tanto los frutos estuvieron expuestos a las condiciones de estrés características de la zona. Esta situación, sumado a que los árboles frutales se desarrollaban en una parcela donde se cumplieron con todas las pautas de manejo acordes con lo recomendado para la región, establece una cierta seguridad en cuanto a la representatividad del material usado y de los datos obtenidos. El suelo del cultivo es franco y el sistema de riego gravitatorio, por manto.

2. Material vegetal

El material vegetal sobre el cual se realizaron los estudios y ensayos fisiológicos y bioquímicos fueron frutos de manzanas (*Malus sylvestis* (L.) var. *domestica* Borkh) variedades “Red Delicious” (RD) y “Braeburn” (BR), sobre porta injerto MM111. Los árboles

estaban conducidos en espalderas, plantados con una separación de 2,7 m entre plantas x 4,0 m entre filas y la edad de la plantación era de 10 años, o sea, en plena producción.

La fenología de las dos variedades es similar en cuanto a la fecha de plena floración pero es ampliamente diferente en la fecha de cosecha comercial (**Tabla 5**) ya que la variedad BR permanece un mes más en la planta. Esta diferencia hace que la manzana BR esté expuesta por más tiempo a situaciones de estrés por exceso de radiación lumínica. Ambas variedades presentan diferencias morfológicas en los frutos y en el hábito de crecimiento de la planta. Comparativamente respecto de BR (**Foto 3**), la variedad RD (**Foto 4**) tiene más follaje, el porte del árbol y sus ramas es erecto y fructifica habitualmente en ramas cortas y firmes. En cambio BR se caracteriza por menor follaje, sus ramas, especialmente las cargadoras de frutos y son laxas con tendencia a volcarse cuando los frutos aumentan de peso.

Las determinaciones fisiológicas y bioquímicas fueron realizadas sobre muestras de piel de los frutos. Los frutos de manzana esta formado por el ovario interno que se suelda al receptáculo por lo tanto con la denominación de piel indicamos los tejidos epidérmicos y primeras capas de parenquimático del receptáculo.

Tabla 5: Variables fenológicas de las variedades de manzana Red Delicious y Braeburn para las temporadas de crecimiento de frutos 2002/03 y 2003/4

Variedad	Plena floración		Cosecha comercial	
	2002	2003	2003	2004
Red Delicious	26 Sep.	28 Sep.	14 Febrero	12 Febrero
Braeburn	26 Sep.	26 Sep.	16 Marzo	13 Marzo



Foto 3: variedad de manzana “Braeburn”, aspecto del árbol entero conducido en espaldera (izquierda) y detalle del hábito de vuelco de las ramas cuando los frutos aumentan de tamaño (derecha).



Foto 4: variedad de manzana “Red Delicious”, aspecto del árbol entero conducido en espaldera (izquierda). Se observa que las ramas cargadoras de frutos no sufren vuelco y presentan desarrollo erecto (derecha).

3. Período de estudio y de extracción de muestras

El período de estudio abarcó los años 2002 al 2004. Los trabajos de mediciones a campo y extracciones de muestras fueron realizados durante las estaciones de crecimiento y maduración de frutos de los años 2002/03 y 2003/04.

4. Determinación de la incidencia de daño por asoleado en frutos

Los niveles de daño se determinaron visualmente sobre la superficie de los frutos. Se clasificaron como:

- *Fruto sano:* Frutos que no presentaban ningún signo de daño o deterioro.

- *Fruto con daño leve*: Frutos que presentaban una leve a moderada coloración bronceada en la zona afectada. Este nivel de daño está asociado a lo que en la región se conoce como “reflejo de sol”.
- *Fruto con daño grave*: Frutos que presentaban desde coloración bronceada intensa a necrosis de la zona afectada. Este nivel de daño esta asociado a lo que en la región se conoce como “asoleado”.

En la temporada 2002/03 se muestrearon los frutos que llegaban a la planta de empaque de 10 empresas elegidas de una lista que incluía a las firmas de mayor relevancia por volumen de procesamiento de la zona del Alto Valle (Secretaría de Fruticultura de Río Negro, 2001). Dado que en el interín una de ellas no continuó colaborando, finalmente se analizaron las muestras de 9 empresas de la zona, distribuidas 1 en Villa Regina, 3 en Gral. Roca, 1 en Allen y 4 en Cipolletti (ver **Mapa 1**).

Las variedades muestreadas fueron: Golden Delicious, Starkrimson, Red Delicious, Braeburn, Fuji, Granny Smith y Pink Lady. Se analizaron 7.200 frutos en total. Los frutos muestreados se extrajeron al azar de 25 camiones por cada variedad en la entrada a cada empresa (generalmente zona de báscula). Según se presenta en la **Tabla 6** la cantidad de frutos inspeccionados por variedad no fue la misma para todas debido a que las variedades nuevas y Golden Delicious presentaron menor producción y no fueron procesadas en todas las empresas.

Es importante aclarar que los frutos muestreados en cada planta de empaque provenían de diferentes lugares de origen (**Tabla 6**). Es decir que como las empresas donde se muestrearon los frutos si bien se localizan en el Alto Valle, procesan frutos de otras regiones (Villa Manzano al norte de Río Negro; Belisle, valle medio del Río Negro), luego en la práctica este estudio se extendió a esas zonas. Por esa razón se diferenciaron seis áreas geográficas a las cuales se les adjudicó el nombre de una ciudad que las representó (**Tabla 7**).

Tabla 6: Procedencia y cantidad de frutos muestreados por variedad de manzana.

Variedad	Lugar de origen	Nº de frutos muestreados
Golden Delicious	Stefenelli, Gral. Roca, Cipolletti, Chañar, Allen	192
Red Delicious	Allen, Cipolletti, Chanar, Cuatro Esquinas, Belisle, Cervantes, Chichinales, Chimpay, Fdez. Oro, Gral. Roca, Godoy, Guerrico, Ing. Huergo, J.J. Gomez, Mainque, Stefenelli, V. Regina, Valentina	1784
Starkrimson,	Fdez. Oro, Ferri, Gral. Roca, Godoy, Guerrico, Ing. Huergo, J.J. Gomez, Stefenelli, V. Regina,	464
Granny Smith	Idem Red Delicious	2768
Fuji	Allen, Cervantes, Chichinales, Chimpay, Gral. Roca, Ing. Huergo, Mainque, V. Regina	400
Braeburn	Belisle, Cinco Saltos	800
Pink Lady	Belisle, Cinco Saltos, Cervantes, Chichinales, Chimpay, Gral. Roca, Ing. Huergo, Mainque, V. Regina	792

Tabla 7: Localidades que componen cada zona de muestreo. Ver **mapa 1**

Zona	Localidades
V. Manzano	Villa Manzano
Cipolletti	4 Esquinas, Ferri, Cipolletti, Cinco Saltos
Allen	Gral. Fdez. Oro, Allen, Puente 83
Gral. Roca	Guerrico, JJ Gomez, General Roca, Stefenelli, Cervantes
V. Regina	Maique, Ingeniero Huergo, Godoy, Villa Regina, Chichinales
Belisle	Chimpay, Belisle

5. Influencia de la radiación solar y la temperatura en la peroxidación de lípidos de membrana de frutos

Los ensayos fueron realizados a campo en frutos de manzana variedad BR que permanecieron en el árbol durante el tiempo que recibían los tratamientos. A los 122 días después de plena floración (DPF) se identificaron frutos que se desarrollaban en el interior del canopeo en iguales condiciones de cultivo y temperaturas y se los expuso a la radiación solar directa (1315 W m^{-2}) y a distintos niveles de temperatura (30-35, 37-42 y 45-50 °C) en la cara expuesta. Los frutos seleccionados se dividieron en dos grupos: a) En el grupo P = Protegido, en la cara expuesta se bloqueó la radiación solar mediante un film opaco negro que no permitía el paso de la luz, recibiendo solamente calor; y, b) En el grupo E = Expuesto, la cara expuesta recibió la radiación solar directa.

La fuente de calor fue la energía solar y como el ensayo se realizó desde las 13:00 hasta las 16:00 horas las temperaturas más elevadas se lograron con la sola exposición de los frutos al sol. Por eso los rangos inferiores de temperatura en el fruto (37-42 y 30-35 °C) se debieron regular mediante ventiladores conectados a una batería portátil y nebulizando agua. La temperatura de superficie de los frutos en la cara expuesta se monitoreó mediante termocuplas adheridas al fruto (**Foto 5**).



Fotos 5: medición de la temperatura en la cara expuesta a la radiación solar directa en un fruto de manzana variedad de manzana “Braeburn”.

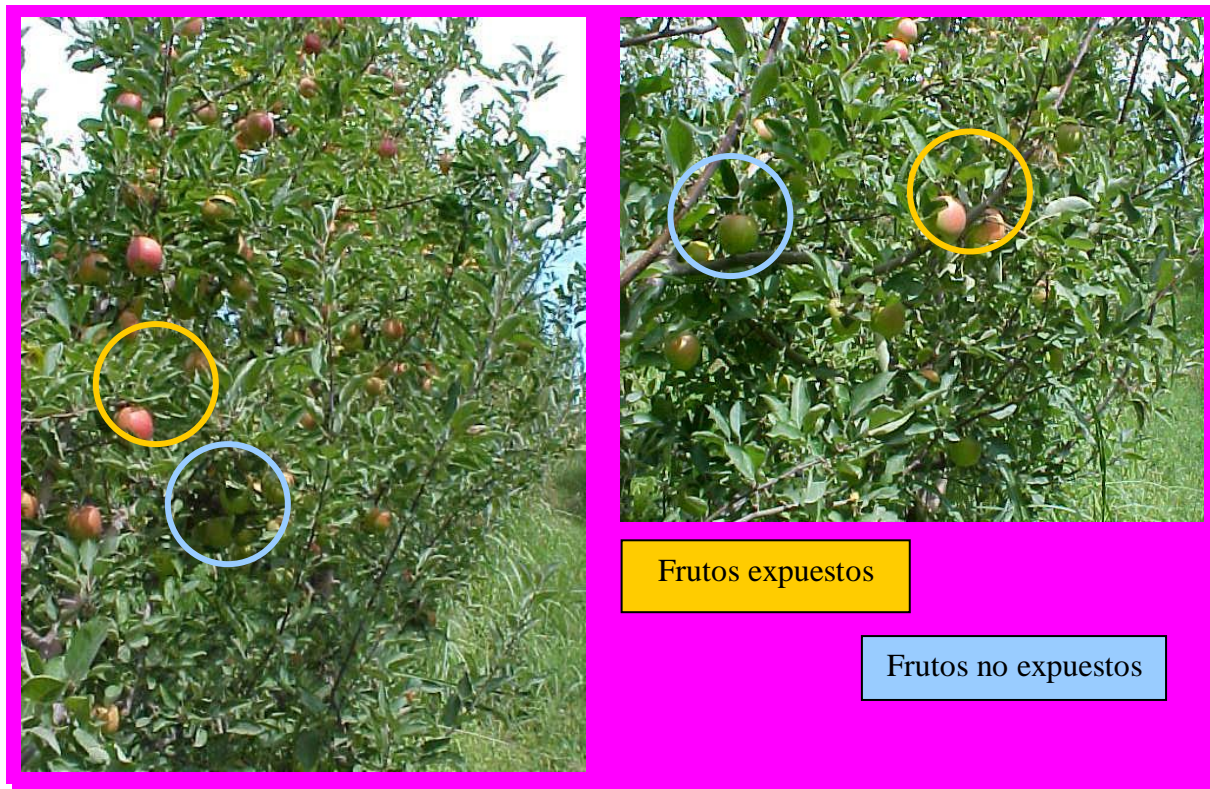
De cada uno de los dos grupos se extrajeron cuatro frutos a los 0, 30, 60, 120 y 180 minutos de tratamiento. De los frutos, se extrajeron muestras de piel y se midió el daño de membranas celulares mediante la valoración de peróxidos lipídicos como especies reactivas al ácido tio-barbitúrico (TBARs) (ver punto 7.2.).

6. Curva de crecimiento de los frutos

El crecimiento de los frutos de las variedades RD y BR fue evaluado periódicamente midiendo el diámetro de 20 frutos tomados al azar de 5 árboles homogéneos en área basal, altura y ancho de copa. La primera fecha de medición fue a los 67 DPF y se continuó con lecturas quincenales hasta la fecha de cosecha comercial de cada variedad. Los diámetros fueron medidos con calibre de corredera (modelo 30-410-5, General Supply Corporation, Jackson, Miss., U.S.A.).

7. Determinaciones fisiológicas, químicas y enzimáticas

Durante el desarrollo de los frutos de las variedades RD y BR se realizó el seguimiento quincenal de parámetros fisiológicos, químicos y enzimáticos sobre muestras de tejidos de piel de manzana. Se extrajeron muestras de cuatro frutos sanos por variedad y dos situaciones opuestas de exposición respecto de la radiación solar. Una situación fue de frutos expuestos que crecían en la periferia del canopeo recibiendo sol directo como mínimo entre las 12:30 hasta las 17:00 horas. La segunda situación fue de frutos sombreados que se desarrollaban en el interior del árbol y no quedaban expuestos a la radiación solar directa en ningún momento del día, les llegaba sólo el 8-15% de la radiación total (**Foto 6**). El inicio de extracción de muestras fue el 15 de diciembre de 2003 que correspondió a los 81 DPF y continuó hasta la fecha oficial de cosecha para cada variedad.



Fotos 6: Frutos de manzana var. Braeburn a 135 días después de plena floración, con diferente exposición a la radiación solar.

7. 1. Medición de la pérdida de electrolitos

Los cambios en la pérdida de electrolitos de tejidos vegetales fueron estimados mediante la determinación de la conductividad eléctrica de la solución acuosa en la que se sumergen los tejidos (Hodges D. y Forney Ch., 2001). Se extrajeron tres réplicas de 10 discos de 1 cm de diámetro de piel de los frutos que se colocaron en tubos de 50 mL conteniendo 35 mL de manitol 0,4 M en agua deionizada. Las muestras se incubaron por 1 h en baño de agua circulante a 24 °C y luego se determinó la conductividad con un conductímetro (modelo TCL-930, LIEE, Argentina). El valor determinado corresponde a la conductividad inicial. Luego las muestras fueron congeladas por 24 h, se descongelaron y se determinó nuevamente la conductividad eléctrica. Los valores de esta medición se consideraron como conductividad total ó 100 % del tejido. La pérdida de electrolitos se calculó como el porcentaje de la conductividad inicial respecto de la conductividad total.

7. 2. Determinación de peróxidos lipídicos

El nivel de peróxidos lipídicos en los tejidos de piel de manzana fue medido en términos de concentración de malondialdehído (MDA, un producto de la peroxidación de los lípidos) determinado por reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Asakawa y Matsushita, 1980). Se homogeneizó 0,25 g de piel con 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 %. El homogeneizado fue centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos. A una alícuota de 0,5 mL del sobrenadante se le adicionó 2 mL de TCA 20 % que contenía 0,5 % TBA. La mezcla fue calentada a 95 °C por 30 minutos y luego rápidamente enfriada en baño con hielo. Luego se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm y se le sustrajo el valor de absorbancia no específica por turbidez leído a 600 nm. Las mismas lecturas se realizaron para las muestras sin reaccionar con el TBA. Este último valor se restó del anterior, eliminando de esa manera la interferencia de pigmentos y otros compuestos que absorben a la misma longitud de onda. La concentración de MDA se calculó en base a una curva estándar usando como generador de MDA al 1,1,3,3 tetrametoxi propano, calculando el coeficiente de extinción del MDA en $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7. 3. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas se determinó mediante el método de Bradford usando sero albúmina bovina como estándar (Bradford M., 1976).

7. 4. Determinación de compuestos antioxidantes

7. 4. 1. Preparación de los extractos celulares

Las determinaciones de metabolitos antioxidantes se realizaron sobre 1 g de peso fresco de piel de manzana que se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido y se suspendió en 3 mL de TCA 5%. El homogeneizado se centrifugó a 10.000 g a 4 °C por 15 minutos, el sobrenadante se guardó a -20 °C para futuras determinaciones analíticas

7. 4. 2. Glutación Reducido (GSH)

La determinación de GSH se realizó en base a la reacción del grupo reducido -SH en el GSH y otros tioles ácidos-solubles (AST) con el reactivo de sulfhidrilos 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB). El producto TNB por ruptura del puente S-S en el DTNB se detecta con un máximo de absorbancia a 412 nm (Ellman, 1959, modificada por Venturino y col., 2001). La medición de GSH se realizó agregando 50 μ L de la muestra a 1 mL de DTNB, luego se dejó transcurrir la reacción de color por 5 minutos y se leyó la absorbancia, a la cual se le descontó la medida del blanco de muestra (sin DTNB). El contenido de GSH se determinó en comparación a una curva estándar de GSH puro.

7. 4. 3. Ascorbato (AsA)

La determinación de AsA se realizó espectrofotométricamente a 524 nm en base a la reacción de reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCIP) por el AsA de la muestra (Mishra N. y col., 1993). Una alícuota de 150 μ L de muestra, se mezcló con 500 μ L de buffer citrato-fosfato 100 mM, pH 2,3 y 500 μ L de solución acuosa de DCIP (30 mg L⁻¹). Se dejó transcurrir la reacción durante 30 segundos e inmediatamente se registró la absorbancia, a la cual se le descontó la medida del blanco de reactivos conteniendo TCA en vez de muestra. El contenido de AsA se determinó en comparación a una curva estándar de referencia.

7. 5. Determinaciones enzimáticas

7. 5. 1. Preparación del extracto proteico

Se pulverizaron 2 g de peso fresco de piel de manzana en mortero con nitrógeno líquido. Al polvo de tejido se lo suspendió en 10 mL de de buffer fosfato de potasio 100 mM (pH 7,8) que contenía 0,5% (v/v) Triton X-100 para aumentar la extractabilidad de la enzima. Se agregó 1 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) que actuó como absorbente de fenoles, dado que la manzana contiene elevados niveles de estos compuestos que interfieren en la extracción y en las determinaciones enzimáticas (Serradell y col., 2000). La mezcla fue dializada toda la

noche a 5 °C contra el mismo buffer y luego fue centrifugada a 22.000 g por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recolectado y conservado a -20 °C para las posteriores determinaciones de actividad enzimática (Abassi y col., 1998), que se realizaron mediante espectrofotometría usando un espectrofotómetro Shimadzu 240 UV-Vis de doble haz.

7.5.2. Actividad de Superoxido Dismutasa (SOD)

La actividad enzimática fue medida en base a la inhibición de la oxidación de NADH mediante radicales superóxido en presencia de SOD (modificación de Paoletti y col., 1986). La reacción de oxidación, en presencia de cantidades adecuadas de EDTA.Mn²⁺ y 2-mercaptoetanol, se realiza por una reacción en cadena de radicales libres que involucra la oxidación de grupos tiol y reducción univalente de O₂. El agregado de SOD al medio de reacción causa una inhibición proporcional de la tasa de oxidación del NADH.

El medio de reacción fue 800 µL trietanolamina-dietanolamina (Tea-Dea) 100mM (pH 7,4), 100 µL de solución EDTA 100 mM más MnCl₂ 50 mM (pH 7,0), 40 µL NADH 7,5 mM; a esta mezcla se le agregó 5-25 µL de muestra (o agua o buffer), 100 µL mercaptoetanol 10 mM se mezcló suavemente se dejó reaccionar por 10 minutos y luego se leyó el decrecimiento en la absorbancia a 340nm por 5 minutos. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que reduce a la mitad la velocidad de oxidación del NADH, tomando como referencia una cantidad inicial de NADH equivalente a una unidad de absorbancia. Para el cálculo de las unidades de SOD presentes en las muestras se usó la fórmula:

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

Donde,

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

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

Vol : volúmen de muestra empleado.

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

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

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

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

7. 5. 3. Actividad de Catalasa (CAT)

La actividad de CAT fue determinada siguiendo la disminución de H₂O₂ en el medio de reacción (Ma y col., 2003), mediante el seguimiento de la caída de la absorbancia a 240 nm (coeficiente de extinción de 40 M⁻¹ cm⁻¹). El medio de reacción estuvo constituido por 2,5 mL de sustrato de reacción (168 µL de H₂O₂ 100 vol. en 60 ml de buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0) a los que se agregó 50 µL de muestra.

7. 5. 4. Actividad de Glutación Reductasa (GR)

La actividad enzimática de GR se determinó siguiendo la técnica de Schaedle y Bassham (1977) modificada por nosotros, mediante el seguimiento cinético del consumo de NADPH dependiente de GSSG en condiciones saturantes a 340 nm (coeficiente de extinción 5,9 mM⁻¹ cm⁻¹). El medio de reacción fue 700 µL buffer de reacción (buffer fosfato de potasio 143 mM, EDTA 6,3 mM pH 7,5, NADPH 0,21 mM) al que se agregó 300 µL de muestra. La reacción se inició agregando 10 µL de GSSG 50 mM. Las mediciones fueron corregidas sustrayendo la actividad inespecífica de NADPH oxidasas, medida en ausencia de GSSG (Grace S. y col., 1996).

7. 5. 5. Actividad de Ascorbato Peróxidasa (APX)

La actividad de APX se midió siguiendo la oxidación del ascorbato por la disminución de la absorbancia a 290 nm (coeficiente de extinción 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹) (Mishra N. y col., 1993). El ensayo fue realizado a 20 °C y el medio de reacción contenía buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, ascorbato de Na 0,5 mM y 0,1 mM de H₂O₂ y 100 µL de muestra. La reacción se disparó con el agregado de H₂O₂ y el cambio en la absorbancia se

midió desde 10 a 30 segundos después de la adición del H₂O₂. Se realizó una corrección con el dato de la oxidación del ascorbato por el H₂O₂ en ausencia de la muestra.

8. Capacidad de adaptación de los frutos a plena radiación solar

A los 118 DPF a un grupo de frutos de la variedad BR y otro de RD que crecían a la sombra en el interior del canopeo se los trató exponiéndolos bruscamente a plena radiación solar. Para forzar esta exposición se realizó un cambio en la posición en que se encontraban las ramillas flexibles portadoras de frutos. Se evaluaron frutos que permanecieron en interior del canopeo (sombreados) para determinar el valor basal de TBARs y se tomaron como control frutos que siempre estuvieron expuestos al sol. A partir de la fecha de los 118 DPF y hasta los 122 DPF, se muestrearon diariamente cuatro frutos por tratamiento por variedad a los que se analizó pérdida de electrolitos (punto 7. 1.) y daño de membranas celulares mediante TBARs (punto 7. 2.).

9. Influencia de la aplicación de pantalla solar en base a caolín en el daño por asoleado de frutos

9. 1. Parámetros físicos

9. 1. 1. Medición de la radiación fotosintéticamente activa

Para medir la interferencia que ejerce una película de caolín sobre la cantidad de radiación fotosintéticamente activa (RFA) que llega a la superficie del fruto, se asperjaron soluciones de caolín de distintas concentraciones (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 %) con un pulverizador manual sobre un film de acetato transparente a la RFA. Una vez que las soluciones de caolín secaron, los acetatos fueron colocados sobre un ceptómetro-PAR (AccuPAR, modelo 80, Decagon Devices, EEUU) mediante el cual se midió la RAF que atravesaba la película de caolín. El ceptómetro es un equipo que mediante un sensor mide la RFA (radiación de longitud de onda entre 400 y 700 nm) expresada como $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

9. 1. 2. Medición de la temperatura

Sobre manzanas de la variedad BR se aplicaron concentraciones crecientes de caolín (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 %). Cada concentración fue un tratamiento con cinco repeticiones de 10 frutos recién cosechados. Una vez que se secó el producto se expusieron los frutos a plena radiación solar entre las 13:00 y 15:00 h. Luego de transcurrido ese tiempo se midió la temperatura de la superficie del fruto utilizando termómetro con sonda de contacto (modelo TCL-930, LIEE, Argentina) (**Foto 7**).

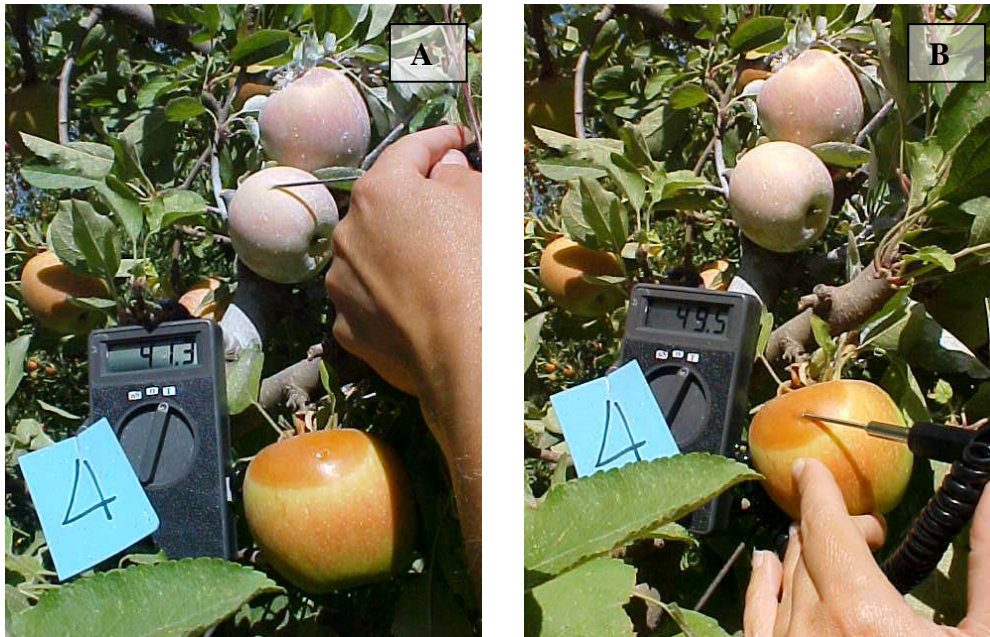


Foto 7: Medición de temperatura con termómetro de sonda de contacto, en frutos de manzana “Braeburn” con aplicaciones de caolín al 6% (A) y sin tratar (B).

9. 1. 3. Comportamiento del caolín en la absorción de diferentes radiaciones

Sendas soluciones de caolín marcas Duoprotect^{MR} y SurroundTM al 15% se extendieron sobre la mitad de un portaobjeto (formando una lámina de aproximadamente 0,2 mm de espesor) y se dejaron secar en el ambiente, la otra mitad se usó como control. Luego que el

material se secó, se midió la absorbancia entre los 400 y 800 nm en un espectrofotómetro de doble haz. Se hicieron cuatro repeticiones del extendido por marca de caolín.

Para analizar la absorbancia en la región del UV se utilizó una solución de caolín equivalente a 0,2 unidades de absorbancia a 800 nm. Se registró el espectro de absorción entre los 200 y 800 nm, utilizándose cubeta de cuarzo de 3 ml contra blanco de agua.

9. 2. Parámetros morfológicos

9. 2. 1. Medición del área foliar y medición de clorofila

Para la medición de área foliar y clorofila se utilizaron 10 muestras de 50 hojas cada una, extraídas de la parte central de brotes de un año elegidos al azar. El área foliar se determinó mediante un medidor de área foliar óptico (modelo 3100, LiCor, EEUU) y la clorofila se estableció usando un instrumento que determina indirectamente la clorofila sobre la base del verdor de la hoja y se expresa en unidades SPAD (chlorophyll meter, modelo 502, Minolta, Japón) en función del verdor de las hojas.

9. 2. 2. Medición del crecimiento de los frutos

La influencia de las aplicaciones de caolín sobre el crecimiento de los frutos de las variedades RD y BR fue evaluada sobre manzanas que recibieron un tratamiento con pulverizaciones quincenales de caolín al 4%. Las pulverizaciones que comenzaron 1/12/03 y finalizaron el 15/02/04 para RD y el 1/03/04 para BR, se realizaron sobre 5 árboles homogéneos en área basal, altura y ancho de copa. Otro grupo de 5 árboles con iguales características se tomaron como control sin pulverizar.

En cada árbol se marcaron 20 frutos al azar a los que se les midió el diámetro comenzando a los 67 DPF y continuando con lecturas quincenales hasta la fecha de cosecha comercial de cada variedad. Para la medición de diámetro se utilizó igual instrumental que el descrito en el punto 6. Las pulverizaciones de caolín se realizaron con una maquina

pulverizadora de 2.000 L de capacidad marca Pazzima, calibrada con una presión de 500 Lb y se aplicó un volumen de 2.500 L ha⁻¹ a una velocidad de 4 Km h⁻¹.

9. 3. Evaluación del uso de caolín en el daño de membranas de frutos expuestos a alta radiación solar

Los ensayos fueron realizados sobre árboles de manzanas de las variedades RD y BR plantados en parcelas de propiedad de la Empresa Transmarítima S.A. en la localidad de Cinco Saltos. Las pautas culturales y de manejo del monte fueron las que se aplican en las explotaciones con adecuado y actualizado asesoramiento agronómico. Las plantas estaban conducidas en espalderas orientadas E-O y en densidad de plantación media (aproximadamente 1.500 árboles ha⁻¹).

Se eligieron tres filas de árboles para cada tratamiento y variedad y se aplicaron las siguientes pulverizaciones en base a caolín: a) control (sin tratar), b) caolín al 2 % y c) caolín al 4 %. El producto de caolín utilizado fue la marca comercial Duoprotect^{MR}. El volumen aplicado fue de aproximadamente 2.500 L ha⁻¹ con un sistema igual al usado en el punto 9. 2. La primera aplicación se realizó el 14 de diciembre 2003 y la frecuencia de aplicación fue quincenal hasta 6-10 días antes de la fecha oficial de cosecha para cada variedad.

Se seleccionaron 20 árboles homogéneos en área basal, altura y ancho de copa en la fila central de las tres que fueron tratadas (considerando las laterales como borduras de tratamiento). En fecha de cosecha comercial se extrajo toda la fruta por árbol (como unidad muestral) y se clasificó en sana y asoleada.

10. Análisis estadísticos

Las principales herramientas estadísticas utilizadas fueron el análisis de la varianza (ANOVA) y el de regresión y correlación.

El nivel de significación estadístico se estableció en $\alpha= 0,05$ y los resultados fueron expresados como el promedio \pm un desvío estándar. Cuando en el ANOVA se determinaron diferencias significativas las comparaciones fueron hechas usando la prueba de igualdad de medias de Tukey.

En todos los casos, la normalidad de los datos fue analizada por el test de Lilliefors y la homogeneidad de las varianzas fue controlada a través de la prueba de Levene.

El programa estadístico utilizado fue el InfoStat versión 1.1. y STATISTICA versión 6.0.

RESULTADOS

1. Evaluación de la incidencia de asoleado en la producción de manzanas en la región del Alto Valle de Río Negro

La incidencia de afección por exposición de los frutos a elevada radiación solar sobre su producción y comercialización se evaluó, conforme a lo descrito en la sección 4 de Materiales y Métodos, teniendo en cuenta dos niveles de daño: 1) frutos con afección leve que pueden ingresar al mercado en grados de calidad bajos con consiguiente menor precio; y, 2) frutos con daño grave que no son comercializables bajo ninguna jerarquía de calidad, constituyendo lo que se denomina descarte.

La incidencia de daño por sol en los frutos producidos en la región del Alto Valle durante la temporada 2002-03 puede verse en la **Tabla 8** en la que se muestra cómo la incidencia fue diversa dependiendo de las distintas variedades de manzana.

Tabla 8: Daño por sol en frutos de diferentes variedades de manzana cultivadas en el Alto Valle de Río Negro, expresado en % respecto del total de frutos analizados para cada variedad. N= 7200.

Nivel de daño	Variedad de manzana						
	Golden Delicious	Granny Smith	Starkrimson	Braeburn	Pink Lady	Fuji	Red Delicious
Leve (%)	16.6	11.5	4.7	13.3	8.9	20.8	8.0
Grave (%)	28.3	30.4	10.2	24.8	18.4	34.8	16.7
Total* (%)	44.9	41.9	14.9	38.1	27.3	55.6	24.7

- Indica la suma de los dos niveles de daño en frutos

De las siete variedades muestreadas la variedad que mayor susceptibilidad presentó a la exposición solar plena fue Fuji. En efecto el 55,6 % de frutos de manzana de la variedad

Fuji que llegó a las plantas de empaque tuvo síntomas de daño por afecciones derivadas de sol.

Por el contrario las variedades que menor daño por asoleado registraron fueron Starkrimson y luego Red Delicious. De cualquier manera es importante puntualizar que aún en el caso de la variedad Starkrimson el porcentaje de daño (15%) es lo suficientemente alto como para incidir fuertemente en la economía de la producción.

La incidencia de asoleado en las distintas zonas dentro de la región del Alto Valle también resultó ser diferente. Como puede verse en la **Figura 5** de las seis regiones muestreadas, en las explotaciones cercanas a Villa Regina el problema se presentó con mayor intensidad. Así cuando se cosecharon los frutos de la estación de crecimiento 2002-03 la producción de manzanas (sin discriminar por variedades) de Villa Regina presentó el mayor porcentaje de incidencia de daño grave por sol alcanzando al 31,17 %. En las otras cinco regiones, la incidencia no fue tan alta y, además fue bastante similar ya que el porcentaje de frutos sanos osciló entre 60 y 80%.

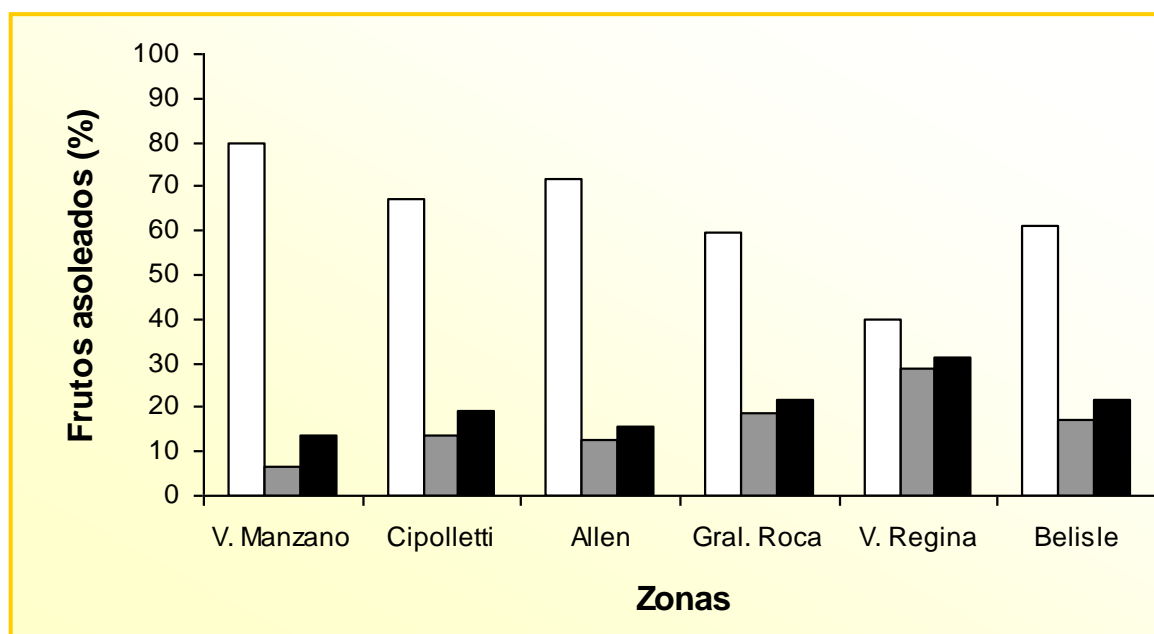


Figura 5: Incidencia de daño por sol en frutos de manzana, según zonas de la región del Alto Valle. Sin daño (), con daño leve (■) y con daño grave (■).

2. Influencia de la radiación solar y la temperatura en la peroxidación de lípidos de membrana de frutos

A fin de evaluar el efecto que tiene la energía solar incidente sobre los frutos expuestos, tanto por su factor térmico (principalmente IR) como por la elevación de los niveles energéticos de las moléculas absorbentes (UV y visible), se realizaron varias determinaciones bajo condiciones controladas a campo. Durante ellas se analizó el efecto que ambos factores tenían en el corto plazo sobre la producción de daño de membranas de frutos evaluado en nmoles TBARs g⁻¹PF.

En la **Figura 6** se puede ver el patrón de peroxidación de lípidos para los frutos expuestos a la energía radiante del sol (suma de los factores: IR-térmico + UV-visible) y para aquellos protegidos de la radiación solar por un film negro (recibieron solamente calor). Los valores obtenidos no presentaron diferencias estadísticas cuando se compararon TBARs entre frutos expuestos vs protegidos para tratamientos a igual temperatura y tiempo.

En cambio se puede apreciar un marcado efecto de la energía térmica, registrándose un incremento altamente significativo de peróxidos lipídicos dependiente del aumento de temperatura. En los frutos que permanecieron a 30-35 °C el nivel basal de peroxidación fue 20 nmoles TBARs g⁻¹PF, tanto para frutos expuestos como sombreados, valor basal que se mantuvo sin cambios durante los 180 minutos de tratamiento. Por su parte hasta los 30 minutos de tratamiento el contenido de TBARs en los frutos expuestos y no expuestos al sol que permanecieron a 37-42 °C y a 45-50 °C fue similar observándose un aumento significativo de 40% respecto al control (30-35 °C). Luego de los 30 minutos en el tratamiento 45-50°C el daño de membrana continuó aumentando significativamente llegando a los 180 minutos de tratamiento a valores de peroxidación de lípidos de 99.2 nmoles TBARs g⁻¹PF en frutos expuestos al sol y 95.6 nmoles TBARs g⁻¹PF en los frutos que permanecieron protegidos.

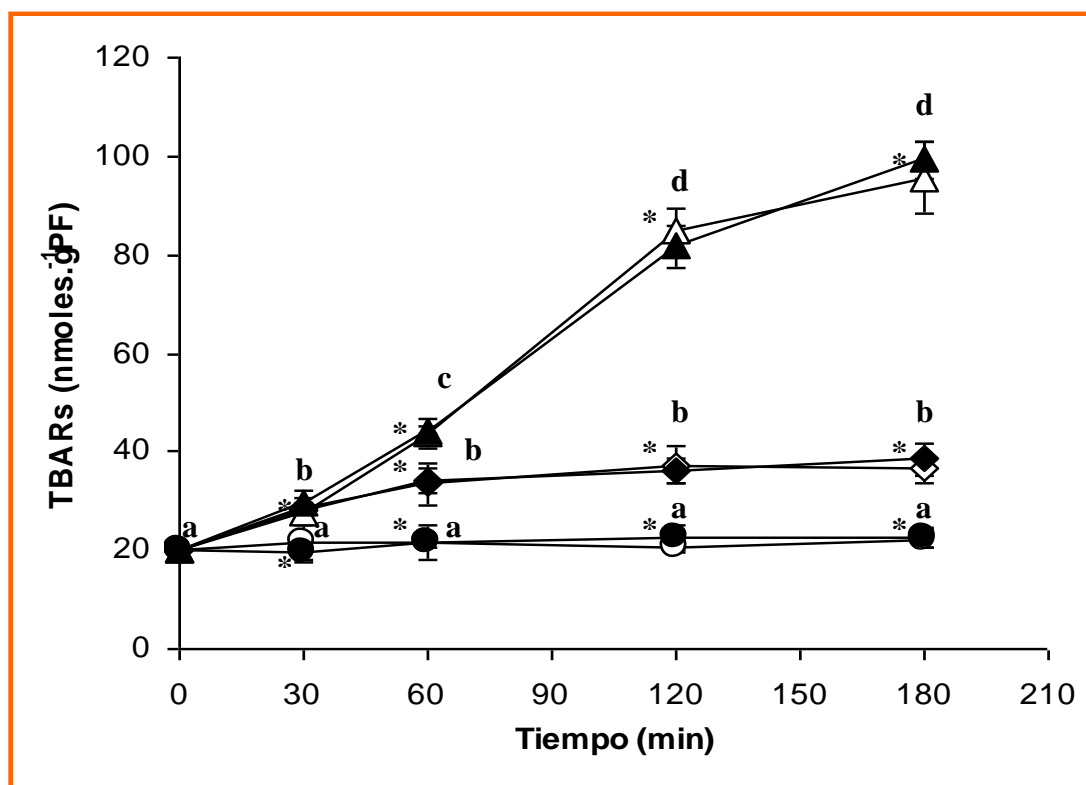


Figura 6: evolución de la peroxidación de lípidos (nmoles TBARs g⁻¹PF) de membranas de piel de frutos de manzana var. Braeburn protegidos (símbolos vacíos) y expuestos (símbolos llenos) a plena la radiación solar, tratados a temperaturas de 30-35 (●), 37-42 (◆) y 45-50 °C (▲) durante 0, 30, 60, 120 y 180 minutos. Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio del tratamiento. (*) Indica diferencias significativas entre tratamientos en igual tiempo. $P < 0.05$

3. Cambios bioquímicos durante el desarrollo de los frutos sombreados y expuestos a la radiación solar

El inicio de extracción de muestras para determinar la evolución de la mayoría de las variables fisiológicas, químicas y enzimáticas comenzó el 15 de diciembre con el objetivo de contar con evaluaciones previas al mes de enero, momento en que se producen las condiciones climáticas más severas para ocasionar estrés por radiación solar. Se consideró importante por lo tanto, seguir la evolución del crecimiento (diámetro) y tasa de crecimiento de los frutos de las dos variedades (sección 3.1.) con el propósito de precisar en que momento del desarrollo del fruto en las dos variedades se comenzó y finalizó con las distintas

evaluaciones del efecto de la radiación solar sobre la integridad de las membranas (secciones 3.2. y 3.3.), acumulación de proteínas (sección 3.4.), enzimas y metabolitos antioxidantes (sección 4.1. y 4.2.).

3.1. Curva de crecimiento

El crecimiento de los frutos desde los 67 DPF hasta la fecha de cosecha siguió patrones similares para las variedades RD y BR (**Figura 7**). Al inicio del período de estudio el diámetro fue igual para las dos variedades y al final, en fecha de cosecha, alcanzaron 71 mm para RD y 70 mm para BR.

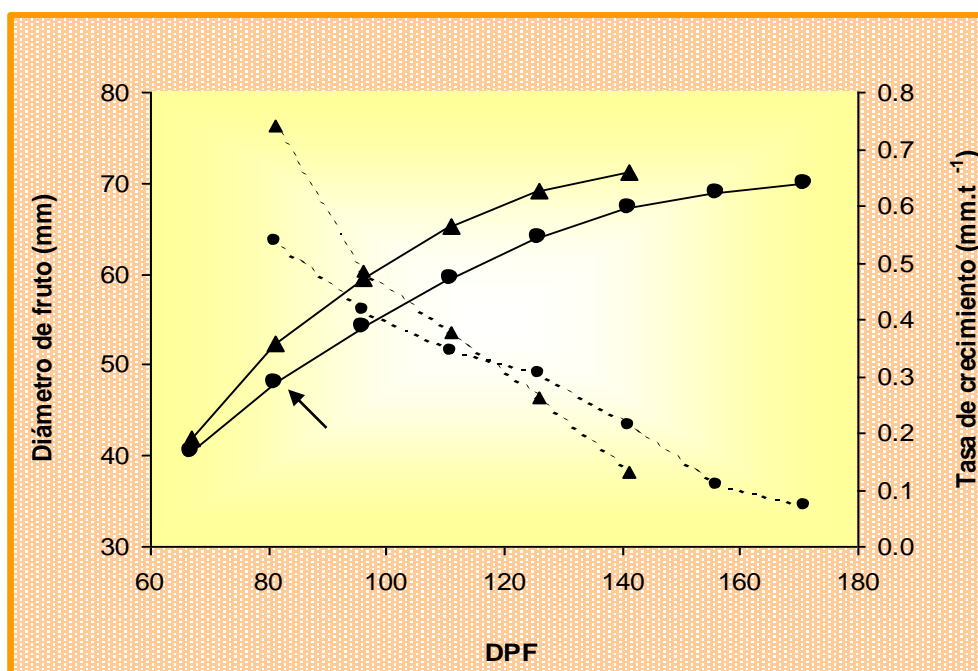


Figura 7: Crecimiento de los frutos (línea llena) de manzanas variedad Red Delicious (▲) y Braeburn (●) desde los 67 días después de plena floración (DPF) hasta la fecha oficial de recolección para cada variedad. Las líneas punteadas indican las tasas de crecimiento para cada variedad. La flecha indica el momento del inicio de muestreo para evolución de enzimas y metabolitos antioxidantes. n=20 frutos por fecha y por variedad.

Las tasas de crecimiento (**Figura 7**) que se registraron en la primer quincena del período de estudio fueron 0,74 y 0,54 mm d⁻¹ para RD y BR respectivamente. A partir de ese momento las tasas de crecimiento fueron decayendo hasta que a cosecha presentaron valores acordes con el respectivo lapso de crecimiento estudiado: alto para RD y menor para BR.

3.2. Evolución de la peroxidación de lípidos

La evolución de la peroxidación de lípidos durante el desarrollo de los frutos de manzana siguió comportamientos similares en RD y BR (**Figura 8**). Hasta los 120 DPF la producción de TBARs tanto en frutos expuestos como sombreados se mantuvo a un nivel constante (valores cercanos a 25 nmoles TBARs g⁻¹ PF), pero luego con la maduración de los frutos aumentó significativamente y este incremento fue intensificado en los frutos que permanecieron durante todo el período expuestos a plena radiación solar.

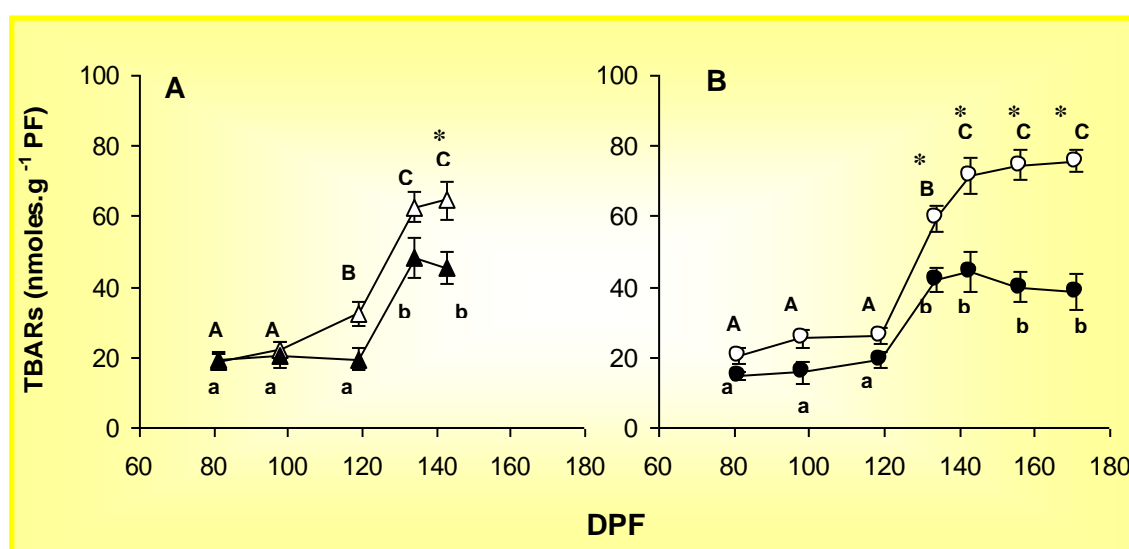


Figura 8: Evolución de la peroxidación de lípidos de membranas (nmoles TBARs g⁻¹ PF) en piel de frutos de manzanas expuestos al sol (símbolos abiertos) y sombreados (símbolos cerrados) a partir de los 81 días después de plena floración (DPF) hasta la fecha oficial de cosecha de las variedades Red Delicious (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha. $P < 0,05$.

Tanto en los frutos de la variedad RD como en BR se observó un incremento brusco en la tasa de peroxidación de lípidos a partir de los 120 DPF. Sin embargo, luego de transcurridos otros quince días (135 DPF) en los frutos sombreados el incremento cesó pasando a un comportamiento prácticamente constante, mientras que por su parte en los frutos expuestos los peróxidos lipídicos continuaron aumentando a medida que los frutos crecieron y hasta la cosecha. Como consecuencia de ello en la fecha de cosecha, los frutos de las dos

variedades expuestas al sol presentaron significativamente mayor peroxidación de lípidos (entre 65 para RD y 75 nmoles TBARs g^{-1} PF para BR) que los sombreados (aproximadamente entre 45 y 50 nmoles TBARs g^{-1} PF para ambas variedades).

3.3. Cambios en la pérdida de electrolitos

Los niveles de pérdidas de electrolitos en los frutos de las dos variedades estudiadas mostraron leves cambios al inicio de las determinaciones manteniéndose en niveles de 40%, sin observarse diferencias entre frutos expuestos y sombreados (**Figura 9**). A partir de los 120 a 135 DPF y hasta la fecha de cosecha, se observó un rápido incremento en la pérdida de electrolitos haciéndose significativa la diferencia entre la permeabilidad de membrana de frutos expuestos y no expuestos al sol ($P < 0,05$).

En fecha de recolección comercial la pérdida de electrolitos registrada en frutos expuestos de RD fue de 81% y en BR fue mayor llegando a valores de 89%. En los frutos que permanecieron a la sombra la pérdida de electrolitos fue significativamente menor registrándose valores de 58% en RD y 70% en BR, la diferencia entre los registros para ambas variedades fue altamente significativa.

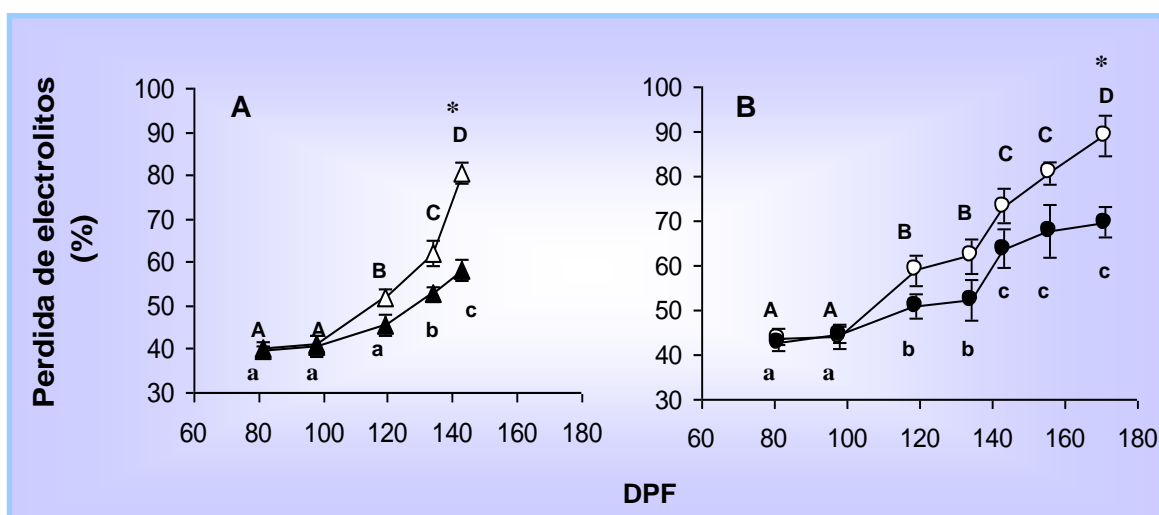


Figura 9: evolución de la pérdida de electrolitos en piel de frutos de manzanas expuestos al sol (símbolos abiertos) y sombreados (símbolos cerrados) a partir de los 81 días después de plena floración hasta la fecha oficial de cosecha de las variedades Red Delicious (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha. $P < 0,05$.

La pérdida de integridad de las membranas celulares medida por pérdida de electrolitos como por peroxidación de lípidos se correlacionaron en un 82% (**Figura 10**).

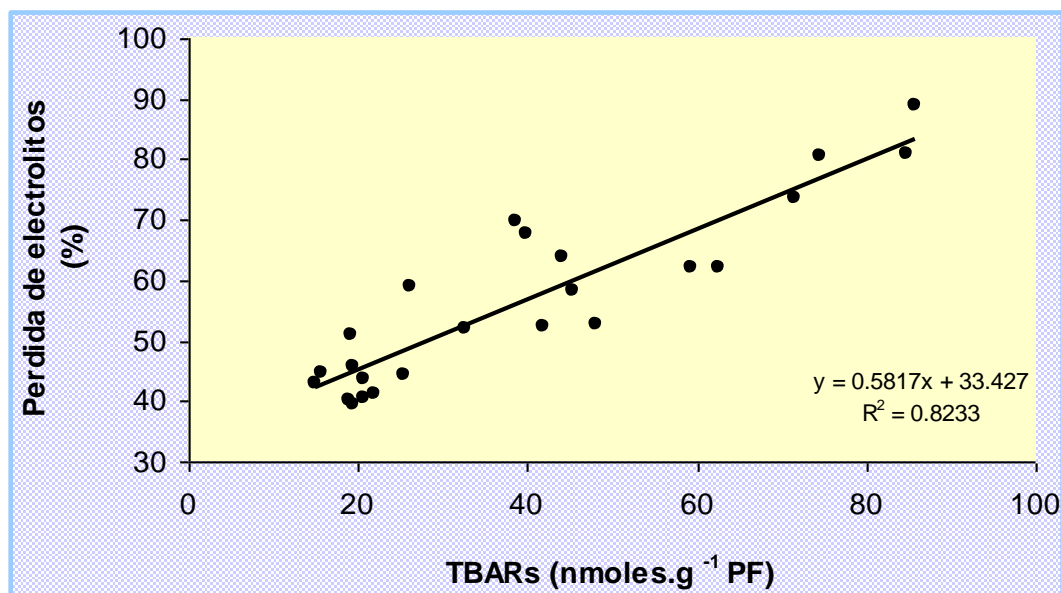


Figura 10: correlación entre la pérdida de electrolitos y la peroxidación de lípidos de membranas celulares de piel de manzana.

3.4. Evolución del contenido de proteínas

Durante el desarrollo de los frutos de ambas variedades, la concentración de proteína por unidad de peso fresco de piel fue generalmente mayor en los expuestos a la radiación solar.

Por su parte la evolución de la concentración de proteínas a lo largo del desarrollo del fruto fue diferente entre variedades. En efecto, en la variedad RD al comienzo del período de estudio, la concentración de proteínas en la piel de los frutos expuestos y sombreados fue de $1,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ y se incrementó llegando a registrarse en cosecha valores de $3,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ y $2,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$, respectivamente. En cambio, en la variedad BR la concentración de proteínas por unidad de peso fresco de piel se mantuvo constante durante casi todo el desarrollo de los frutos, aumentando en las dos últimas fechas y fue significativamente mayor la cantidad de proteínas en frutos expuestos que en sombreados (**Figura 11**).

0

RESULTADOS

A

DPF	Open (mg.g ⁻¹ PF)	Shaded (mg.g ⁻¹ PF)
81	1.3 (A)	1.2 (a)
98	1.9 (B)	1.8 (b)
120	1.6 (AB)	1.3 (ab)
135	2.2 (B)	1.6 (ab)
145	3.6 (*) (C)	2.4 (c)

B

DPF	Open (mg.g ⁻¹ PF)	Shaded (mg.g ⁻¹ PF)
81	1.9 (A)	0.9 (a)
98	1.9 (A)	0.9 (a)
120	2.0 (*) (A)	0.7 (a)
135	2.2 (*) (A)	0.8 (a)
145	2.0 (*) (A)	1.2 (b)
155	2.6 (*) (B)	1.4 (b)
170	2.7 (*) (B)	1.5 (b)

Figura 11: evolución del contenido de proteínas en piel de frutos de manzanas expuestos al sol (símbolos abiertos) y sombreados (símbolos cerrados) a partir de los 81 días después de plena floración hasta la fecha oficial de cosecha de las variedades Red Delicious (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha. $P < 0,05$.

61

4. Cambios en la actividad de enzimas y metabolitos antioxidantes durante la evolución de los frutos

4.1. Enzimas antioxidantes

4.1.1. Superoxido Dismutasa

Tanto la actividad enzimática (expresada por gramos de peso fresco –PF-) como la actividad específica (expresada por miligramos de proteínas) de la enzima SOD fueron superiores en los frutos de la variedad BR (**Figuras 12 y 13**).

En los frutos sombreados de las dos variedades estudiadas el perfil de evolución de la actividad enzimática de SOD fue similar (**Figura 12**). Bajo esa condición de radiación la actividad enzimática comenzó con valores bajos que se mantuvieron así hasta los 135 DPF. A los 145 DPF fecha que coincide con la cosecha de RD, se produce un incremento de la actividad registrándose 425,9 UI g⁻¹ PF (**Figura 12 A**). En la variedad BR también se produce un aumento a los 145 DPF hasta los 1622,2 UI g⁻¹ PF y se observó que este valor se mantuvo constante hasta la fecha de recolección (**Figura 12 B**).

La evolución de la actividad enzimática en los frutos de las dos variedades expuestos a plena radiación solar fue similar a la de los frutos sombreados hasta los 100 DPF. A partir de esa fecha en las dos variedades se observó un aumento continuo hasta los 140 DPF y luego se estabilizó. Así en la variedad RD desde un valor de 289,1 UI g⁻¹ PF la actividad subió hasta los 791,3 UI g⁻¹ PF, mientras que en la variedad BR desde un valor de 324,1 UI g⁻¹ PF llegó a los 6090,0 UI g⁻¹ PF.

Cuando la actividad enzimática de SOD se midió como actividad específica por unidad de proteína se vio que fue similar en frutos expuestos y sombreados hasta los 100 DPF para ambas variedades (**Figura 13**). A partir de ese momento la actividad específica de SOD en los frutos expuestos aumentó notablemente, hace un pico máximo de 385 UI mg⁻¹ prot. en RD y 3540 UI mg⁻¹ prot. en BR para luego caer en ambas variedades en época de cosecha cuando se produjo un aumento en el contenido de proteínas (**Figura 11**). En RD llega a los valores de los frutos sombreados (cerca de los 200 UI mg⁻¹ prot.), en cambio en BR finaliza en registros superiores en un 100% a los obtenidos para frutos que permanecieron a la sombra.

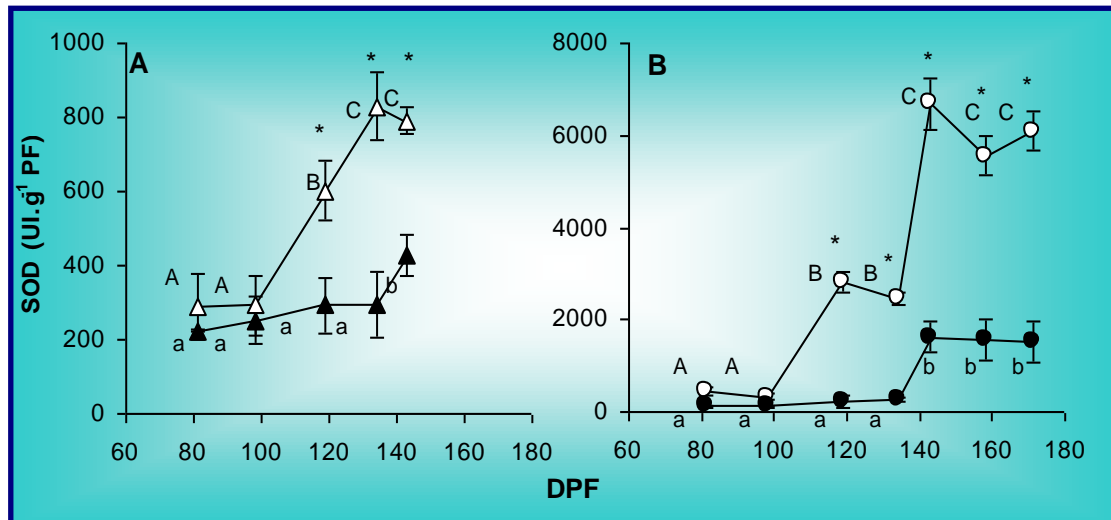


Figura 12 : Cambios en la actividad de superóxido dismutasa (SOD) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolo abierto) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Delicioso (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n= 4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha. $P < 0,05$.

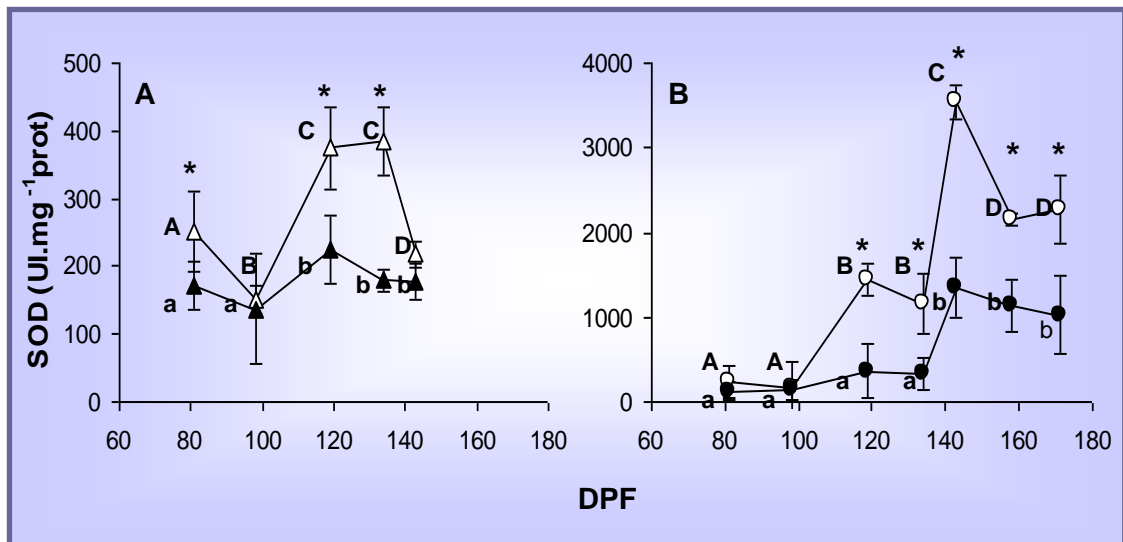


Figura 13: Cambios en la actividad específica de superóxido dismutasa (SOD) de frutos expuestos al sol (símbolo abierto) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Delicioso (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n= 4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha ($P < 0,05$).

4.1.2. Catalasa

A lo largo de todo el período estudiado la actividad de la enzima CAT en los frutos expuestos al sol fue mayor que en los sombreados, tanto en la variedad RD como en la variedad BR (**Figura 14**). Respecto al patrón de evolución de la actividad de CAT se registraron diferencias entre las variedades estudiadas. La variedad RD presentó un aumento significativo de la actividad desde los 100 DPF hasta la cosecha. Se inició en valores próximos a 8 UI g⁻¹ PF tanto en frutos sombreados como expuestos para alcanzar 36 UI g⁻¹ PF en frutos expuestos y 22 UI g⁻¹ PF en frutos sombreados (**Figura 14 A**). En cambio en la variedad BR el comportamiento de la actividad de CAT fue lo contrario a lo mostrado en RD. En efecto hasta los 145 DPF la actividad se mantuvo constante y no hubo cambios significativos. Luego según se aproximaba la cosecha, la actividad enzimática fue decreciendo tanto para los frutos expuestos como sombreados. Así hasta los 145 DPF la actividad osciló alrededor de valores cercanos a las 20 UI g⁻¹ PF para frutos expuestos y 10 UI g⁻¹ PF para frutos sombreados. Luego de los 145 DPF, en madurez, se observó un descenso significativo ($P < 0,05$) de la actividad en los dos tipos de exposiciones, por lo que los valores de la actividad enzimática a cosecha de los frutos expuestos fue de 8 UI g⁻¹ PF y de 2 UI g⁻¹ PF en los sombreados (**Figura 14 B**).

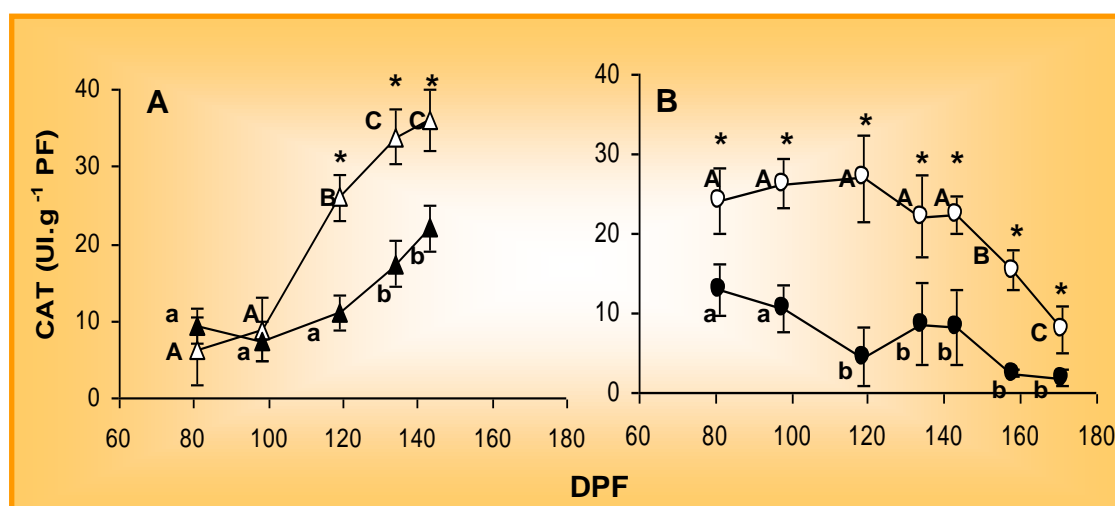


Figura 14: Cambios en la actividad de catalasa (CAT) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolos abiertos) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Delicious (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha ($P < 0,05$).

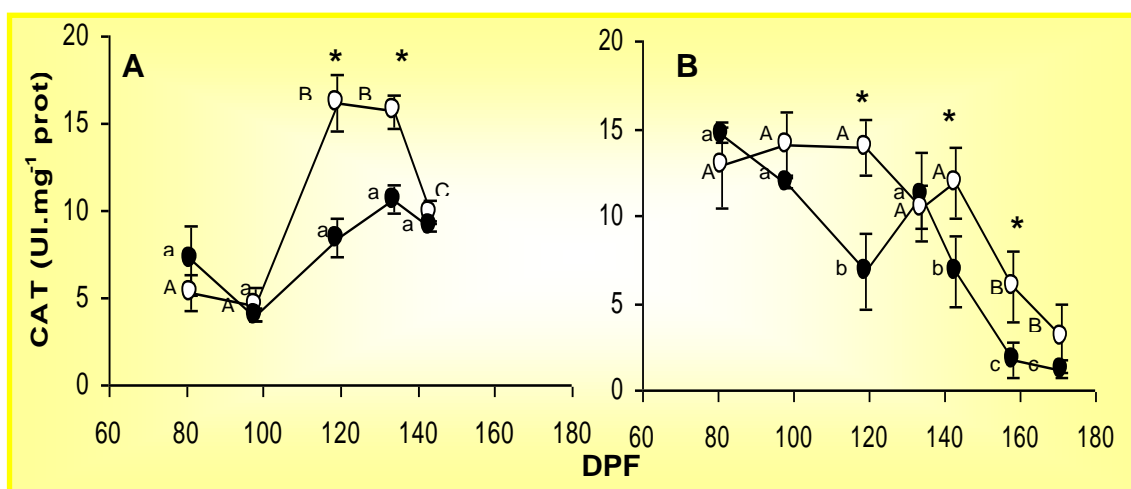


Figura 15: Cambios en la actividad específica de catalasa (CAT) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolos abiertos) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Deliciosos (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha ($P < 0,05$).

La evolución de la actividad específica de la CAT (**Figura 15**) fue similar a la actividad expresada por unidad de PF, en la variedad RD se determinó una tendencia a aumentar mientras que en la variedad BR se observó lo inverso. En la variedad RD, tanto para frutos expuestos como sombreados, no se presentó diferencia significativa entre los valores del comienzo del período ya que los mismos fueron cercanos a 8 UI mg⁻¹ prot. En los frutos expuestos (**Figura 15 A**) se observó un pico máximo correspondiente al período que va desde los 120 a los 130 DPF con 16 UI mg⁻¹ prot. En la variedad BR la actividad específica de CAT, luego de mantenerse constante, disminuyó significativamente hacia la cosecha sin observarse diferencias entre frutos expuestos y sombreados. La actividad específica (**Figura 15 B**) comenzó en 13 UI mg⁻¹ prot. y disminuyó a 2 UI mg⁻¹ prot. en la madurez.

4.1.3. Ascorbato Peroxidasa

La actividad de APX fue similar en frutos expuestos y sombreados al inicio del período estudiado, tanto para la variedad RD como BR, registrándose valores próximos a 9 UI g⁻¹ PF (**Figura 16**). A partir de los 100-120 DPF comenzó un aumento significativo de la actividad enzimática en los frutos de ambas variedades. Como el ritmo del aumento fue mayor en los frutos expuestos, la actividad enzimática a cosecha en los frutos expuestos fue casi dos veces mayor que en los sombreados alcanzando niveles semejantes para ambas variedades.

Por su parte la actividad específica de APX aumentó a lo largo de todo el período llegando desde 5,7 UI mg⁻¹ prot. al inicio del estudio hasta los 24,6 UI mg⁻¹ prot. en la madurez en la variedad RD, no observándose diferencias significativas entre frutos expuestos

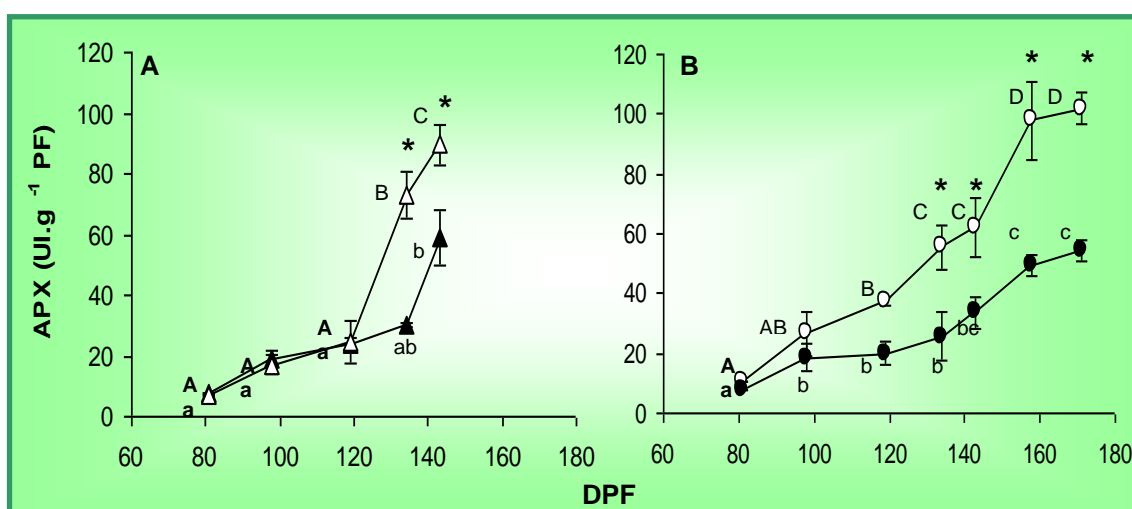


Figura 16: Cambios en la actividad de ascorbato peroxidasa (APX) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolo abierto) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DAFB) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Delicious (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha ($P < 0,05$).

y sombreados (**Figura 17**). En la variedad BR la actividad enzimática específica también aumentó registrándose valores próximos 8,0 UI mg⁻¹ prot. en frutos pequeños que llegaron hasta los 37,0 UI mg⁻¹ prot. en frutos maduros.

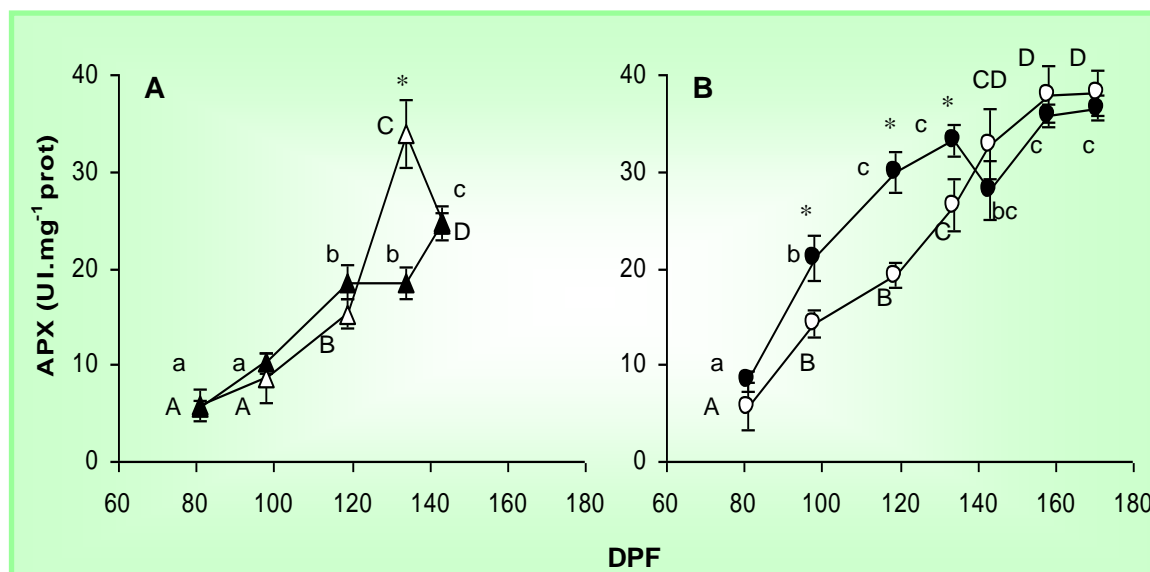


Figura 17: Cambios en la actividad específica de ascorbato peroxidasa (APX) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolo abierto) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Delicioso (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha ($P < 0,05$).

4.1.4. Glutación Reductasa

La actividad de GR en los frutos de ambas variedades que se desarrollaron expuestos al sol fue significativamente superior a la registrada en aquellos que estuvieron protegidos por el follaje (**Figura 18**). La actividad a lo largo del tiempo fue constante tanto para expuestos como sombreados en la variedad RD. En cambio en la variedad BR se registró una disminución en función del tiempo, siendo la misma en los frutos expuestos tan pronunciada que en la madurez llegó a los mismos valores que los frutos sombreados.

La actividad específica de la enzima GR cuando los frutos eran pequeños fue superior en los expuestos ($0,67 \text{ mUI mg}^{-1} \text{ prot.}$ para RD y $0,97 \text{ mUI mg}^{-1} \text{ prot.}$ para BR) respecto de los sombreados ($0,38 \text{ mUI mg}^{-1} \text{ prot.}$ para RD y $0,68 \text{ mUI mg}^{-1} \text{ prot.}$ para BR). Se observó que con el transcurso del tiempo la actividad específica disminuyó significativamente llegando a la madurez con valores similares entre expuestos y sombreados tanto para la variedad RD como BR registrándose valores de $0,1 \text{ mUI mg}^{-1} \text{ prot.}$ (**Figura 19**).

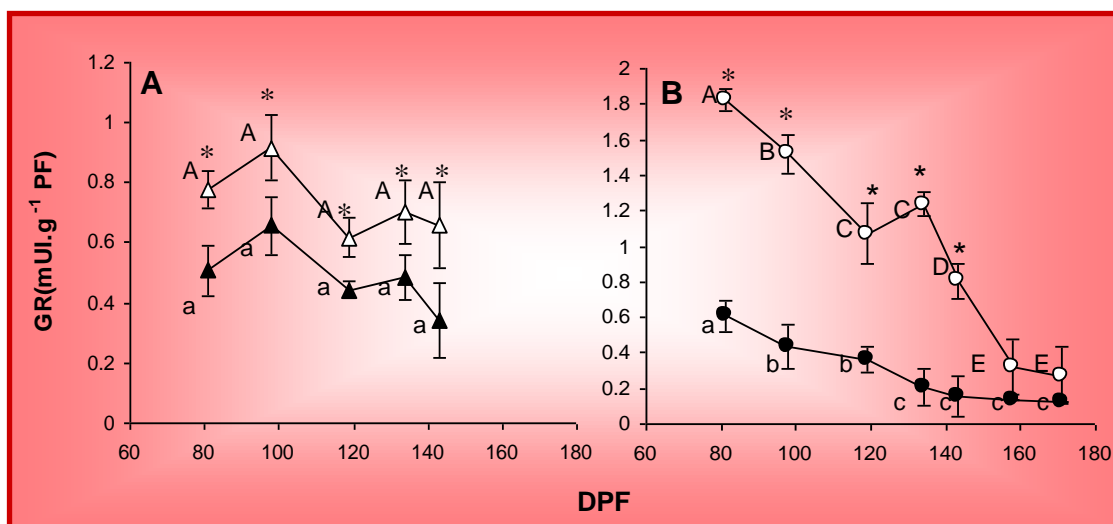


Figura 18: Cambios en la actividad de glutatión reductasa (GR) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolo abierto) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Deliciosos (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha ($P < 0,05$).

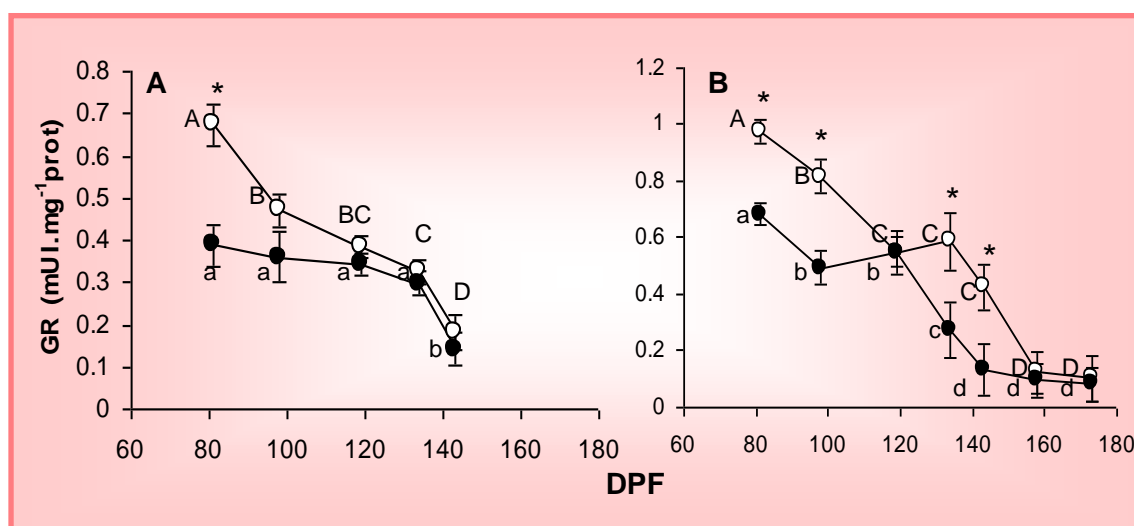


Figura 19: Cambios en la actividad específica de glutatión reductasa (GR) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolo abierto) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Deliciosos (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales (mayúsculas para frutos expuestos y minúsculas para frutos sombreados) no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones; (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre frutos expuestos y sombreados en una misma fecha ($P < 0,05$).

4.2. Metabolitos antioxidantes

4.2.1. Glutación

La concentración de GSH en la variedad RD fue desde el inicio significativamente mayor en frutos expuestos que en sombreados. Se mantuvo en valores estables hasta los 130 DPF para luego aumentar rápidamente hacia la fecha de cosecha llegando en frutos expuestos a 784,4 nmoles g^{-1} PF, mientras que en los frutos sombreados la concentración se mantuvo constante en aproximadamente 379,5 nmoles g^{-1} PF (**Figura 20 A**).

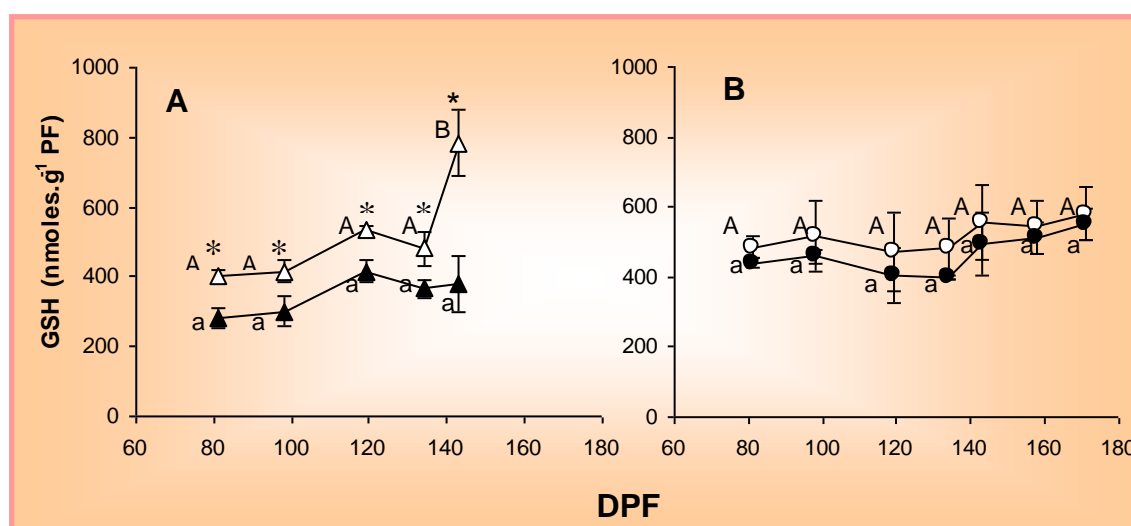


Figura 20: Cambios en el contenido de glutatión reducido (GSH) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolo abierto) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Delicioso (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE. (*) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones ($P < 0,05$).

En la variedad BR no se registró diferencia significativa en el contenido de GSH durante todo el período de estudio midiéndose valores próximos a 500,0 nmoles g^{-1} PF, y no se observó diferencia entre frutos que recibieron distinta exposición solar (**Figura 20 B**).

4.2.2. Acido Ascórbico

El contenido de AsA en los frutos expuestos de ambas variedades presentó un importante aumento a partir de los 90 DPF, llegando a 439,6 nmoles g^{-1} PF en RD y 484,5 nmoles g^{-1} PF en BR en fecha de cosecha (Figura 21). En los frutos que permanecieron sombreados por las hojas el AsA fue siempre menor y no se observaron cambios en la concentración a lo largo de la evolución de los frutos.

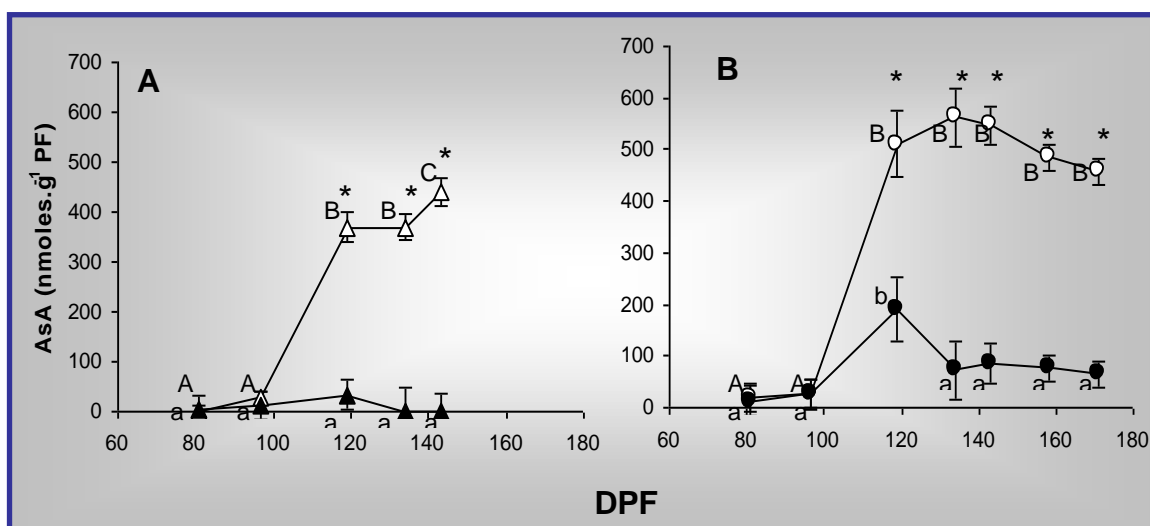


Figura 21: Cambios en el contenido de ascorbato (AsA) durante la evolución de los frutos de manzana expuestos al sol (símbolo abierto) y sombreados (símbolos cerrados) desde los 81 días después de plena floración (DPF) hasta fecha oficial de cosecha en las variedades Red Delicioso (A) y Braeburn (B). Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE. (*) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones ($P < 0,05$).

5. Capacidad de adaptación de los frutos a plena radiación solar

5.1. Evolución del daño de membrana

El nivel basal de peroxidación de lípidos de los frutos que siempre estuvieron expuestos a la radiación solar se mantuvo en valores próximos a los 35,0 nmoles TBARs g⁻¹ PF, mientras que en los que permanecieron a la sombra fue significativamente menor registrando valores de 20,0 nmoles TBARs g⁻¹ PF (**Figura 22**). Por el contrario, a los tres días de iniciada la exposición al sol tanto en la variedad RD como BR se observó un incremento de peroxidación de lípidos llegando a valores de 95,4 TBARs g⁻¹ PF en RD y 99,5 TBARs g⁻¹ PF en BR a los tres días de iniciada la exposición al sol (**Figura 22**). Las dos variedades presentaron en todos los tratamientos un comportamiento estadísticamente igual en la evolución del daño de membranas.

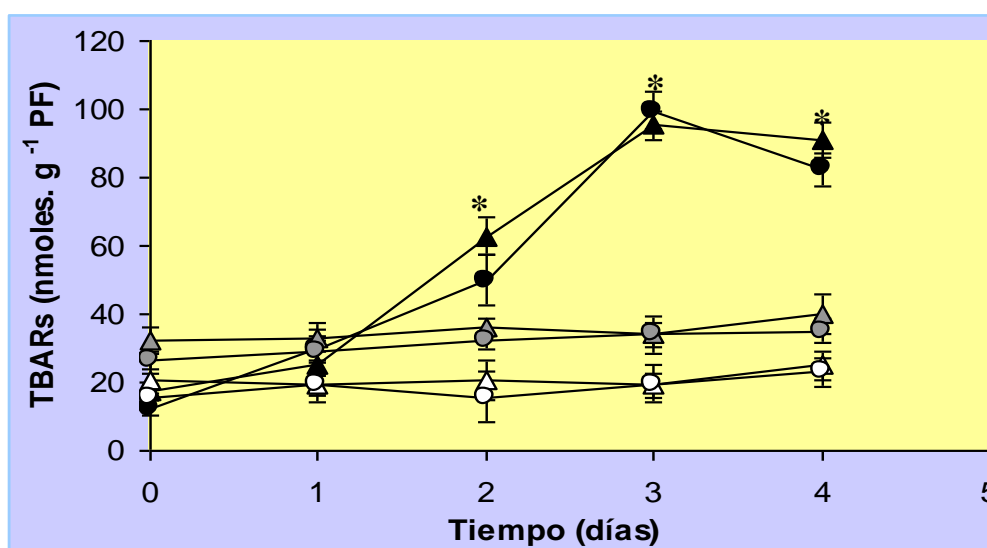


Figura 22: Evolución de la peroxidación de lípidos de frutos de manzanas variedades Red Delicious (triángulos) y Braeburn (círculos) que se desarrollaron en el interior de la canopea y fueron expuestos repentinamente a plena radiación solar (símbolos negros) respecto de los que siempre estuvieron expuestos al sol (símbolos grises) y de los que permanecieron sombreados (símbolos blancos), en función del tiempo de exposición transcurrido. (*) indica diferencias estadísticamente significativas respecto del inicio del tratamiento, $P < 0.05$.

Cuando la integridad de la membrana celular se evaluó midiendo la pérdida de electrolitos siguió comportamiento similar a la evolución del daño de membrana medido por peroxidación de lípidos. El grado de relación de las dos variables fue $R^2 = 0.934$ para un $P < 0.01$.

5.2. Sintomatología asociada a daño de sol

Los síntomas visibles de asoleado en los frutos pueden ser observados en las **Fotos 8 a 10**. Se observa que luego de transcurrido el primer día de tratamiento en la cara expuesta bruscamente a plena radiación solar aparece una zona blanquecina (**Foto 8**), síntoma que no estuvo asociado a un aumento de peroxidación de lípidos (**Figura 22**). Al día siguiente comenzó a manifestarse sobre la mancha blanquecina una zona parda asociada a un incremento significativo en el contenido de TBARs g^{-1} PF respecto de los frutos sombreados. El daño siguió aumentando y en el tercer día se observó una zona necrótica (**Foto 9**) coincidente con el máximo de peroxidación lipídica (**Foto 9**). Al continuar la exposición se hizo evidente la presencia de tejidos que estaban muertos (**Foto 10**).

FOTO 8**FOTO 9****FOTO 10**

FOTOS 8, 9 y 10: Evolución del síntoma de asoleado en frutos de manzana Braeburn desarrollados a la sombra luego de haber sido expuestos bruscamente a plena radiación solar.

6. Uso de Caolín como filtro protector

6.1. Comportamiento espectrofotométrico del caolín utilizado

El barrido espectral del depósito de una fina capa de solución al 15% de caolín usado en el ensayo (Duoprotect^{MR}) indica un comportamiento descendente de la absorbancia que se inicia con 1,204 UA (Unidades de Absorción) a los 400 nm y llega a 0,542 UA a los 800 nm, sin presentar picos en ninguna longitud de onda. Resultados similares se observaron midiendo el depósito de una capa fina de solución de SurroundTM (otro Caolín comercial que se usó como compuesto testigo) cuyo absorción se inició con 1,206 UA a los 400 nm, llegando a 0,767 UA a los 800 nm.

Cuando las mediciones se realizaron en una solución de caolín en suspensión, las mismas mostraron que la absorbancia fue 0,403 UA a los 400 nm y fue decreciendo lentamente hasta llegar a 0,190 UA a los 800 nm. Esta misma solución presentó una absorbancia de 1,960 UA a los 200 nm.

6.2. Influencia de la aplicación de caolín en la radiación y temperatura que reciben los frutos

La radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) que llega al fruto fue reducida con la aplicación de caolín según una función exponencial (**Figura 23**) respecto a su concentración. La dosis de caolín que reduce al 50% la RFA es de 9,6%. Al aumentar la concentración de caolín y hasta la dosis del 12-16% se registró reducción de la temperatura del fruto. Luego de superado el 16% se produjo aumento de temperatura (**Figura 24**). El comportamiento de la temperatura según la dosis de caolín aplicada fue de tipo polinómico de segundo orden.

En la epidermis del fruto la temperatura registrada fue siempre menor que la medida en la pulpa (a 1,5 cm de profundidad respecto a la superficie del fruto). La diferencia entre ambas temperaturas fue de aproximadamente 3 °C y se mantuvo constante independientemente de la dosis de caolín.

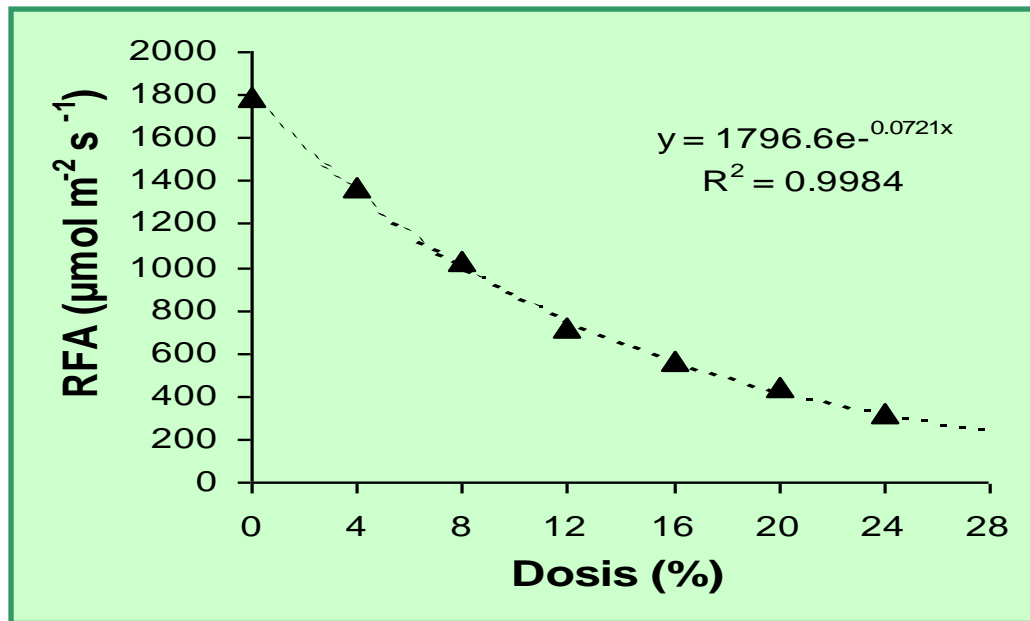


Figura 23: Disminución de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) (▲) que llega a la superficie del frutos según la dosis de caolín aplicada. La línea punteada indica el ajuste exponencial a los datos de RFA. Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE.

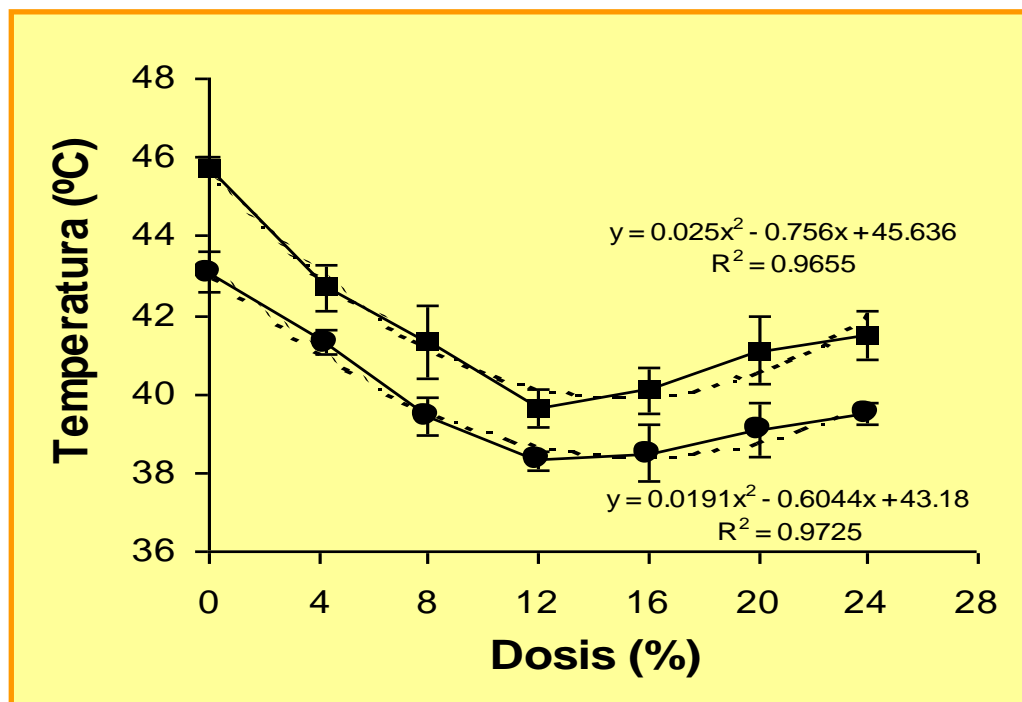


Figura 24: Evolución de la temperatura en la epidermis (●) y en la pulpa (■) a 1.5 cm de la superficie del fruto, según la dosis de caolín aplicada. Las líneas punteada indica el ajuste polinómico. Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE.

6.3. Atenuación del daño por aplicación de caolín

6.3.1. Efecto protector sobre la integridad de las membranas

La efectividad del caolín aplicado como protector fue evaluado comparando la evolución de la pérdida de electrolitos de frutos en sombra, de frutos expuestos al sol y expuestos al sol pero tratados con una dosis de caolín al 4% (**Figura 25**). Los frutos que permanecieron sombreados en el interior del árbol no presentaron cambios en la pérdida de electrolitos. En cambio en los frutos que fueron expuestos a plena radiación solar se observó aumento significativo del daño de membranas a partir del segundo día de exposición, llegando al 100% de pérdida de electrolitos a la semana de recibir radiación solar.

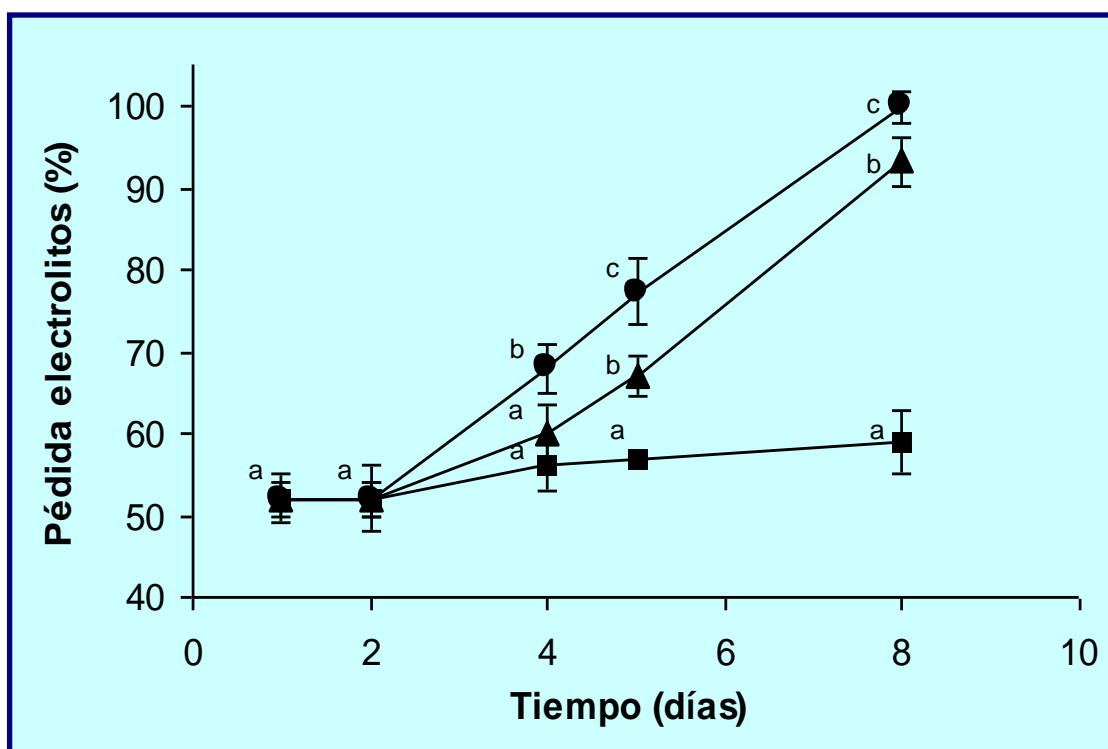


Figura 25: Evolución del daño de membranas celular de piel de frutos de manzana var. Braeburn expuestos a la radiación solar sin pantalla solar (●), con pantalla en base a Caolín en dosis del 4% (▲) y sombreados por las hojas, control (■) según días de exposición a plena radiación solar. Los valores representan la media ($n=4$) \pm 1 DE, seguidos de letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al inicio de las observaciones ($P < 0,05$).

Una situación intermedia en el daño de membrana se registró en los frutos tratados con Caolín al 4%, donde se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los sombreados recién a partir de los cinco días del inicio del ensayo. Es de destacar además que en los frutos tratados con pantalla solar se determinó una disminución significativa en la afección de las membranas respecto de los frutos expuestos. En efecto a los siete días, fin del período de ensayo, se determinó un 10% menos de pérdida de electrolitos en los frutos con caolín al 4% respecto de los frutos expuestos.

6.3.2. Influencia de la aplicación del caolín en el control de asoleado de frutos

6.3.2.1. Variedad Braeburn

La incidencia de daño por sol en el control (árboles asperjados con agua) fue elevada ya que el 35% de los frutos presentaban síntomas de asoleado. La aplicación de caolín disminuyó la cantidad de frutos afectados, siendo este efecto significativo cuando se realizaron aplicaciones a dosis del 4%, ya que con las mismas se registró una disminución del 50 % en el daño provocado por el asoleado (**Figura 26**).

Según se observa en la **Figura 27** las aplicaciones de caolín produjeron mayor efecto preventivo en el asoleado de los frutos que se desarrollan en los estratos superiores del árbol. De los frutos que crecían en la parte superior de las plantas control el 82,0 % presentaron asoleado. La dosis al 2% redujo sustancialmente la incidencia de asoleado al 24,2 % y la dosis al 4% resultó en una disminución significativa respecto de la primera a un 16,1%. En el estrato inferior no se observaron diferencias significativas por la aplicación del producto.

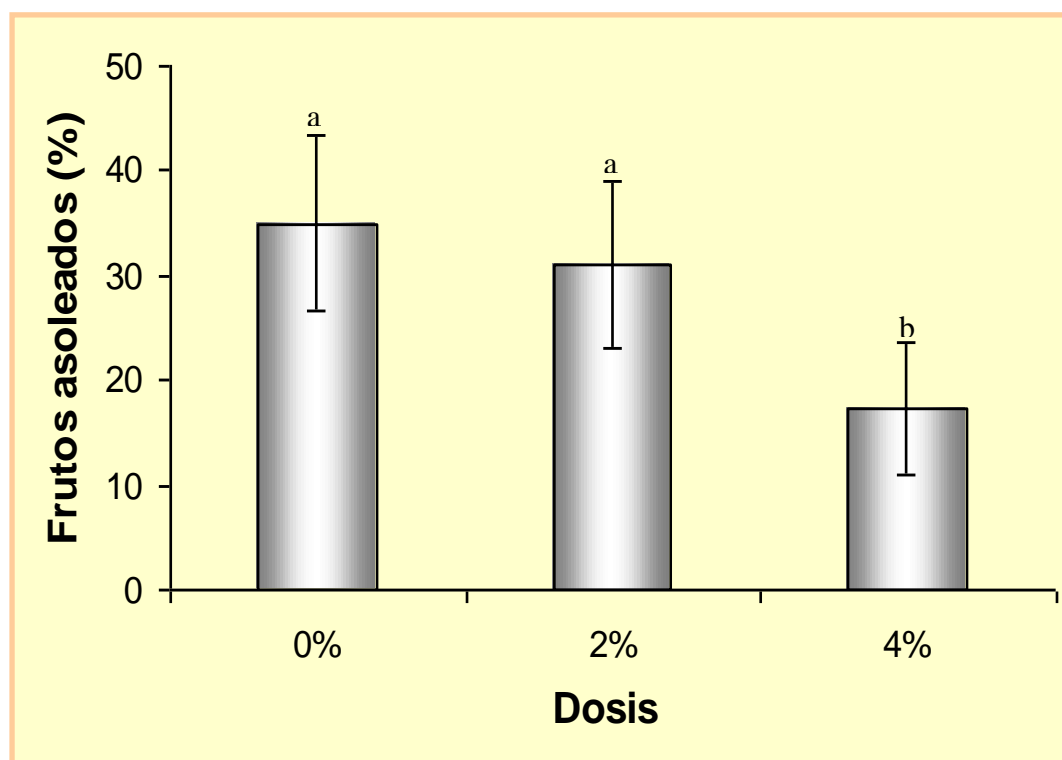


Figura 26: Porcentaje de frutos de manzana var. Braeburn con síntoma de asoleados respecto a diferentes dosis de caolín. Las barras representan ± 1 DE, letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos ($P < 0,05$).

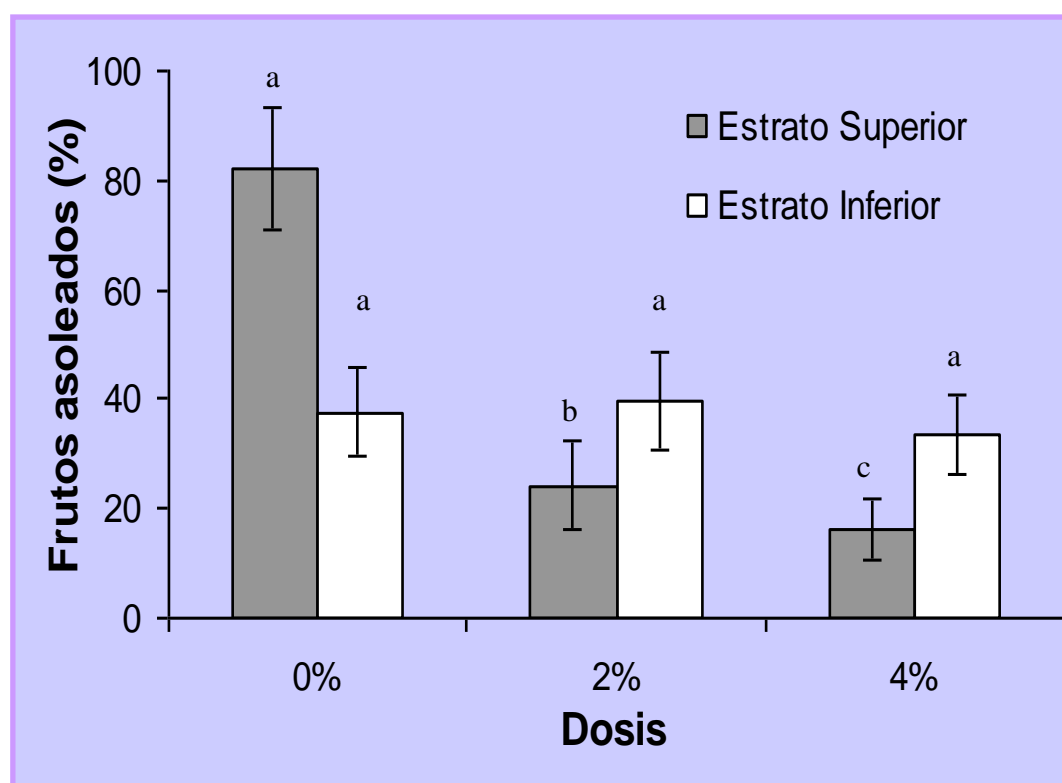


Figura 27.: Influencia de la aplicación de caolín en diferentes dosis respecto del asoleado de frutos de manzana var. Braeburn según los diferentes estratos del árbol. Las barras representan ± 1 DE, letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos ($P < 0,05$).

6.3.2.2. Variedad Red Delicious

En la variedad Red Delicious la aplicación de caolín no produjo efecto significativo en la aparición de frutos con síntoma de asoleado ya que tanto en el control como en los tratamientos el porcentaje de frutos dañados fue de valores cercanos al 20% (**Figura 28**). El análisis realizado con los frutos que se desarrollan en diferentes estratos del árbol no indicó diferencias significativas (datos no mostrados).

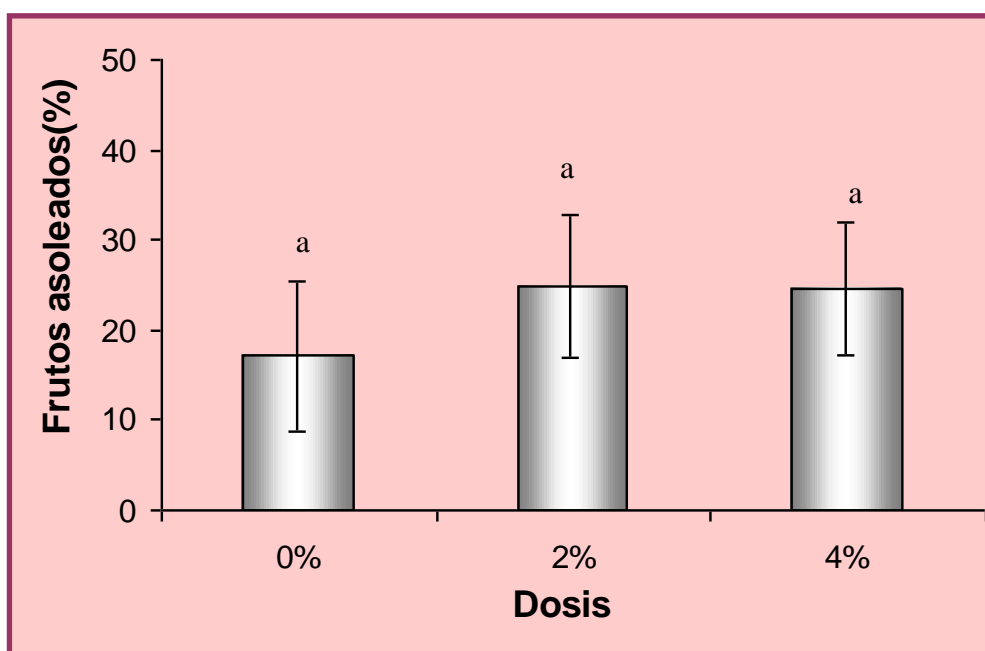


Figura 28: Porcentaje de frutos de manzana var. Red Delicious con síntoma de asoleado respecto a diferentes dosis de caolín. Las barras representan ± 1 DE, letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos ($P < 0,05$).

6.3.3. Influencia de la aplicación de caolín en el crecimiento de los frutos y en algunas variables vegetativas

El crecimiento de los frutos, determinado por el diámetro, no fue afectado por la aplicación de caolín al 4% (**Figura 29**). En las manzanas variedad Red Delicious y Braeburn, tanto en el tratamiento control como en el tratado con caolín, los frutos presentaron igual curva de evolución del diámetro. Como consecuencia el tamaño final de los frutos tratados en las dos variedades fue igual al tamaño de los frutos control.

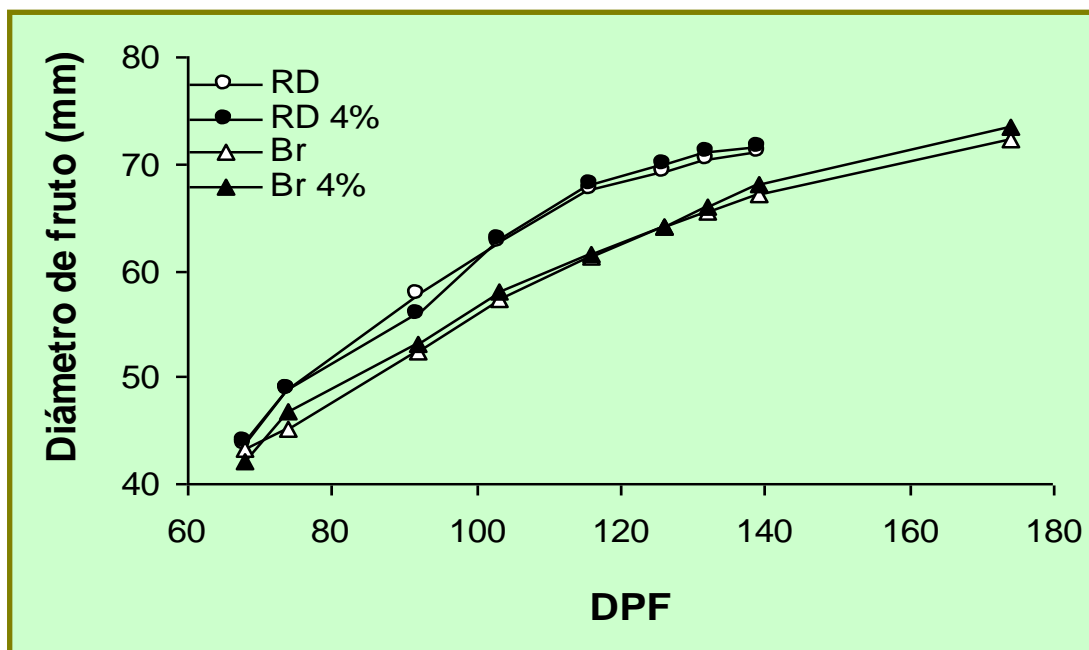


Figura 29: Influencia de la aplicación de caolín 4% en la evolución del diámetro (mm) de los frutos de manzana var. Red Delicious (RD) y Braeburn (Br) según días después de plena floración (DPF). Los valores representan la media ($n=20$).

Concentraciones de caolín al 4% no afectaron las variables vegetativas de los árboles de la variedad Red Delicious (**Tabla 9**). En cambio en la variedad Braeburn la aplicación de caolín no produjo diferencias estadísticas en la longitud de los brotes, pero se observaron diferencias significativas en la clorofila y en el área foliar. En efecto los árboles de la variedad Braeburn tratados presentaron un aumento de 3,8 unidades SPA de clorofila y de 125,2 mm² en el área foliar.

Tabla 9. Cambios en las variables vegetativas de plantas de manzana var. Red Delicious y Braeburn tratadas con pantalla solar en base a caolín en dosis al 4% respecto de plantas sin tratar (control).

Variedad	Tratamiento	Variable vegetativa		
		Longitud de brote (cm)	Clorofila (SPAD)	Area foliar (cm ²)
Red	Control	44.9 a	43.1 a	1004.6 a
Delicious	Caolín 4%	48.5 a	44.5 a	1188.9 a
Braeburn	Control	48.7 a	46.0 a	995.0 a
	Caolín 4%	43.6 a	49.8 b	1120.5 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, test de Tukey)

DISCUSION

1. Disminución de la calidad y pérdida de producción de manzanas a causa del daño de sol en Río Negro

En las regiones frutícolas del mundo caracterizadas por clima árido o semiárido es común que se presente la problemática de pérdida de calidad de frutos por daño de sol. El clima de la zona del Alto Valle de Río Negro es semiárido y durante el período de crecimiento del fruto del manzano se caracteriza por alcanzar temperaturas máximas extremadamente altas y elevada radiación solar. Esto hace que los frutos cultivados en esta región puedan quedar frecuentemente expuestos durante la mayor parte de la estación de crecimiento a condiciones ambientales que provocan asoleado.

Una prueba de ello es que en la evaluación realizada en el Alto Valle de Río Negro para la temporada 2002-03 (**Tabla 8**) se ha registrado en promedio entre las diferentes variedades un 35 % de pérdidas de producción de frutos de manzana a causa de asoleado. Los valores encontrados por otros grupos de trabajo sobre la temática de asoleado varían entre un 15% en las regiones productoras de peras y manzana de Nueva Zelanda (Wünsche y col., 2001) hasta un 40 % informado para algunas variedades cultivadas en Chile (Yuri y col., 2000). Esta comparación indica que el daño por sol de nuestra región es similar al de otras regiones productoras de fruta de pepita del mundo.

La incidencia de asoleado en frutos depende de la variedad que se estudie y los resultados obtenidos en esta Tesis confirman esos datos. Por lo tanto la elección de las variedades que se usaron en el presente estudio fue correcta dado que RD representaría a las variedades que menor susceptibilidad tiene al problema de asoleado y BR manifestaría la problemática de las variedades más afectadas (**Tabla 8**). En la selección de variedades se tuvo en cuenta que las variedades Fuji y Golden Delicious presentan mayor incidencia de asoleado que Braeburn. Las dos primeras fueron descartadas porque son cultivares que prácticamente no se producen en la región y la tendencia es de arrancar las plantas existentes (Secretaría de Estado de Fruticultura de la Provincia de Río Negro, 2001).

La incidencia de afección por exposición de los frutos a elevada radiación solar fue evaluada teniendo en cuenta que los frutos con daño grave no son comercializables bajo

ningún grado de calidad, mientras que los frutos con afección leve pueden ingresar al mercado en niveles de calidad bajos con consiguiente menor precio. En contraposición con la variedad Fuji, los valores de daño encontrados para las variedades Starkrimson y Pink Lady son relativamente bajos, lo que constituye un dato alentador sobre todo para la última variedad que tiene un futuro promisorio en el mercado de fruta nacional e internacional. Es importante destacar que los resultados de la evaluación estarían indicando que dentro de la zona de Villa Regina existen factores determinantes que promueven el asoleado de los frutos (**Figura 5**). Estas causales pueden abarcar la composición varietal, los tratamientos culturales y razones de índole microclimáticas. Entre los tratamientos culturales como poda, riego fertilización, etc. el uso de herbicidas del tipo Paraquat (metil viologen) es un factor que aumenta el estrés oxidativo (Tsang y col., 1991; Abarca y col., 2001). Sería interesante recabar datos sobre el uso de herbicidas en las distintas regiones del valle dado que sería un factor que podría estar incidiendo en la promoción de asoleado de frutos. Avanzar sobre estos temas escapa al alcance del presente trabajo y podría constituir una de las posibles líneas de progresión del mismo.

2. Factores causantes de asoleado relacionados con exposición a elevada temperatura y alta radiación solar

Especificar el principal factor causante de asoleado (radiación UV, alta RFA, alta temperatura, etc.) no es tarea fácil dado que el problema además de relacionarse a la exposición solar excesiva también varía según la susceptibilidad de la especie, edad y el vigor de la planta, condiciones de cultivo, estrés hídrico, térmico, presencia de malezas, etc. (Yuri y col., 2000). En la región del Alto Valle durante la época de crecimiento de las manzanas se registran altas temperaturas y elevada radiación solar (**Tabla 1**), por lo tanto los frutos están expuestos a una combinación de ambos factores ambientales.

Actualmente se han definido dos tipos de daño por sol: A) uno asociado a una mancha necrótica (asoleado-quemado) que se produce por pocas horas de exposición al sol cuando se registran temperaturas de fruto próximas a 52 °C. B) Otro tipo de daño en el que se observa una mancha bronceada (asoleado-bronceado) en la cara expuesta del fruto producido por temperaturas próximas a los 45 °C durante un periodo de tiempo superior a los 22 días siendo necesaria la presencia de radiaciones UV (Schrader y col., 2002).

En el presente trabajo siguiendo el patrón de peroxidación de lípidos como indicador de procesos oxidativos en las membranas celulares (Shewfelt y Purvis, 1995) se observó en frutos de manzanas BR una función constante en el tiempo, registrando 20 nmoles TBARs g⁻¹ PF mientras la temperatura en la cara del fruto expuesta al sol no superó los 35 °C (**Figura 6**). Esta observación está de acuerdo con el fundamento del control de asoleado por pulsos de riego por aspersión que se basa en mantener la temperatura máxima del fruto en niveles inferiores a los 35 °C (Parchomchuk y Meheriuk, 1996).

En los tratamientos realizados a temperaturas mayores a 35 °C se observó que a medida que se elevaba la temperatura del fruto se incrementaba el daño de membranas tanto en los frutos expuestos como los protegidos de la radiación solar. Esto indica que el factor más importante, aunque no el único, en causar el asoleado de frutos de manzana en la región del Alto Valle es la temperatura. Los resultados a los que arribamos acuerdan con los presentados por Parchomchuk y Meheriuk (1996) quien expone que el asoleado es un desorden fisiológico resultante del daño de los tejidos causado por el calentamiento debido a la energía radiante sobre la superficie del fruto cuando es expuesto directamente a la luz solar.

Los frutos protegidos de la radiación presentaron un comportamiento similar en el daño de membranas que los expuestos. Es importante destacar que por la metodología usada en este trabajo (realizando los tratamientos en frutos que permanecieron unidos al árbol) los síntomas de despigmentación seguidos de manchas pardas (característicos de asoleado) se visualizaron a los 180 minutos. Pero cuando la fruta es cosechada y expuesta al sol se puede producir el quemado en menos de tres horas posiblemente debido a la falta de enfriamiento transpiratorio (Yuri y col., 2000), y si la temperatura del fruto excede los 50 °C por solamente una hora se ha observado asoleado en varios cultivares de manzana (Bergh col., 1980).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que no se puede descartar que la radiación solar directa a través de su componente UV pueda contribuir a la aparición de daño por sol a largo plazo o al menos períodos mayores a 180 minutos. Sin embargo, teniendo en cuenta las temperaturas máximas extremas registradas durante el verano en días calurosos y secos sería indudable que este es el principal factor promotor de asoleado en frutos de pepita en la región del Alto Valle.

3. Cambios en las membranas celulares y contenido de proteínas durante el desarrollo de los frutos

Los registros de las curvas de crecimiento de los frutos de las variedades Red Delicious y Braeburn permitieron establecer que la fecha de inicio de muestreo coincidió con el estado ontogénico de comienzo de disminución de la tasa crecimiento (**Figura 7**), según la curva sigmoidea establecida para frutos de manzanas (Westwood, 1993; Garriz y col., 1993).

La extracción de muestras para los diferentes análisis comenzó a mediados del mes de diciembre, una quincena antes de que se presenten las condiciones climáticas extremas características del mes de enero en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (**Tabla 1**). Como se discute en la sección anterior, las altas temperaturas son una de las principales causas promotoras de daño por sol en frutos y el efecto producido va a determinar diferentes grados de afección según el momento del desarrollo en que se produzcan (Lakso, 1994).

En el período registrado durante el presente estudio no se observaron situaciones de cambios bruscos en los ritmos de crecimiento de ninguna de las dos variedades. Esto indicaría que los frutos estudiados no estuvieron afectados por incorrectos manejos de la parcela experimental respecto a riego, poda severa, etc. (Westwood, 1993). En la parcela donde se realizaron los tratamientos no se realizaron aplicaciones de herbicidas. Por lo tanto se puede suponer que los frutos no han recibido otra situación de estrés más que el producido por los diferentes tratamientos respecto a la exposición al sol.

En los frutos de RD y BR se observó disminución de la integridad las membranas celulares asociadas a los cambios fisiológicos y bioquímicos que involucran la senescencia de los órganos vegetales (Lutts y col., 1996; Buchanan-Wollaston, 1997; Fang y col., 1998; Hodges y col., 2000). El aumento en la peroxidación de lípidos hacia la madurez (**Figura 8**) estuvo relacionado probablemente a la formación de radicales hidroxilos en las membranas celulares que en estrecha proximidad a los ácidos grasos poliinsaturados forman radicales perhidroxilos (Shewfelt y Purvis, 1995; Lacan y Baccou, 1998). El daño por peroxidación del plasmalema determinó aumento en la pérdida de electrolitos (**Figura 9**) que estaría asociado con salida del contenido celular, una rápida deshidratación y la muerte de las células (Gong y col., 2001). Nuestros datos concuerdan con los encontrados por Rogiers y col., (1998) que estudiando la maduración de *Amelanchier alnifolia*, frutos climatéricos como las manzanas, informaron que el proceso fue acompañado del aumento de producción de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico.

Si bien, es normal que hacia la senescencia se observe pérdida de integridad de membranas celulares (Jimenez y col., 2002-a), en las manzanas estudiadas pudimos establecer que la exposición a plena radiación solar incrementó este proceso (**Figuras 8 y 9**). Es decir, que los frutos expuestos a alta radiación solar y elevada temperatura estuvieron soportando una situación de estrés oxidativo mayor que los protegidos por las hojas (Ali y col., 2005). El daño de membranas estaría asociado a un exceso de producción de EROs (Hodges y col., 2004), igual que sucede con otros factores causantes de estrés oxidativo tales como elevadas salinidad, sequía, exposición a ozono y radiación UV entre otros (Rogiers y col., 1998; Yuri y col., 2000-a; Mittler, 2002; Hodges y col., 2004).

Coincidentemente con Abassi N. y col. (1998) en el presente estudio también se registró aumento en el contenido de proteínas a medida que se acercaba la madurez de los frutos, con una mayor síntesis de proteínas en los frutos expuestos que en los sombreados. Esta tendencia, que fue más marcada en la variedad RD que en BR, se ha observado también en manzanas Granny Smith no expuestas y expuestas a radiación solar (Yuri y col., 2000). En otras enfermedades fisiológicas de origen oxidativo como la mancha oscura de la mandarina se ha cuantificado un aumento del doble de proteínas en frutos afectados, acompañado con cambios en el patrón de amino-ácidos, aumentando los hidrofóbicos y esto lo asocian con cambios que afectan la estructura y las propiedades de la membrana celular (Vitor R. y col., 1999).

4. Efectos de estrés por calor y alta radiación solar en los frutos

Los vegetales en la naturaleza están expuestos a una combinación de factores productores de estrés (Mittler, 2002; Rizhsky y col., 2002; Hodges y col., 2004). Altas dosis de estos factores promueven en última instancia mayor producción de EROs los que ocasionan cambios fisiológicos, bioquímicos y metabólicos (muchos de ellos son reversibles) relacionados con la inducción de síntesis de proteínas o alteración de sus funciones (Levitt, 1980; Teeri, 1980) y adquisición de tolerancia (Gulen and Eris, 2004). Cuando la situación de estrés se prolonga o supera los niveles de tolerancia del vegetal la superproducción de EROs produce la muerte de las células por procesos oxidativos (Shewfelt y Purvis, 1995).

El estrés oxidativo que frecuentemente deben soportar los frutos de manzanas que se desarrollan expuestos al sol en la región del Alto Valle determina síntoma de tejidos necróticos característico de asoleado (Schrader, 1997; Yuri y col., 2000-a). Si bien, nosotros

hemos determinado que en nuestra región el calor es el factor más importante en la generación de asoleado (**Figura 6**), no podemos descartar la influencia de radiación solar elevada. Por lo tanto los síntomas, cambios fisiológicos y bioquímicos que hemos registrado en los frutos que se desarrollaban a campo y sufrieron asoleado posiblemente son consecuencia de una combinación de ambos factores.

El primer cambio visual que se observó luego de un día que los frutos fueron expuestos repentinamente al sol y al calor fue una decoloración de la piel acompañada de una zona blanquecina (**Foto 8**). Si bien, este cambio no fue acompañado de daños en las membranas celulares en un primer momento (**Figura 22**), si se pudo visualizar que hubo pérdida de pigmentos inclusive clorofila (Song y col., 2001). Observaciones microscópicas permitieron comprobar la presencia de cloroplastos en los tejidos epidérmicos y perivasculares de frutos de manzanas en menor proporción y más pequeños que en las hojas. Durante el período de maduración se registra un decrecimiento de la clorofila pero su concentración nunca llega a ser despreciable y los cloroplastos retienen la clorofila hasta bien avanzada la madurez (Blanke y Lenz, 1989). El contenido de clorofila en los frutos coloreados es menor que en una hoja pero igual se registra en ellos actividad fotosintética (Ma y Cheng, 2004). La degradación de pigmentos provocó que disminuya la capacidad del fruto de disipar energía por fotosíntesis y caminos asociados a otros pigmentos (Ma y Cheng, 2003). Tanto el exceso de energía solar como el calor provocan daños por fotooxidación de los pigmentos y la fotoinhibición por ataque al fotosistema II (Smillie, 1992; Guoa y col., 2006). De esta manera el fruto queda con menor capacidad de metabolizar excesos de energía radiante la que seguramente afectó el equilibrio electrónico de las moléculas y aumentó la formación de EROs (Demmig-Adams y Adams, 1992; Foyer y Harbinson, 1994).

El fruto tiene poca capacidad para transpirar por tanto disipa menos el calor que las hojas (Yuri y col., 2000-a). En general, la velocidad de catálisis de las enzimas aumenta con la temperatura entre 0 a 35 °C. Ese aumento es proporcional al Q_{10} característico de cada enzima. Esto hace que el aumento de velocidad de reacción de las diferente enzimas que componen una ruta metabólica no sea el mismo para todas y se generen desequilibrios que conducen a trastornos metabólicos. Si las temperaturas superan los 45 °C se produce además desnaturalización de proteínas impidiendo la actividad enzimática y desorganizando las membranas celulares (Salisbury y Ross, 2000).

El aumento de temperaturas sobre los óptimos induce mayor síntesis de fosfolípidos con ácidos grasos insaturados por tanto aumenta la fluidez y permeabilidad de las membranas (Azcon-Bieto y Talón, 1993). Sumado a esto si las temperaturas de los tejidos son superiores a los óptimos fisiológicos se produce peroxidación de lípidos (Xiaozhong y Bingru 2000; Hui y col, 2007). Al prolongarse la situación de estrés sobre los frutos se observó daños en los tejidos y paralelamente se registró aumento de peroxidación de lípidos (**Figura 22**) lo que estaría indicando incremento en la producción de EROs y por tanto de estrés oxidativo (Xiaozhong y Bingru, 2000; Xu y Huang, 2004). Los cambios en la composición química de los lípidos y proteínas de membranas celulares disminuyeron la capacidad de regulación del flujo de metabolitos y de iones (Liu y col., 2003) lo que produjo la muerte de tejidos y la aparición de una mancha marrón (**Foto 9 y 10**). Esta mancha oscura característica del asoleado de frutos (Mitcham, 2003) posiblemente actuó como cuerpo negro aumentando aun más la temperatura de los tejidos.

En los frutos que se desarrollaron siempre expuestos al sol y no llegaron a presentar síntomas de asoleado se observó aumento en las enzimas del ciclo del glutation-ascorbato. Esto estaría indicando una posible capacidad de adquisición de tolerancia relacionada a un aumento en sistema de detoxifixación de EROs (Rizhsky et al, 2002) que podría estar asociado a otros mecanismos como pueden ser la síntesis de “heat shock proteins” (Panchuck et al, 2002).

5. Cambios en los sistemas antioxidantes durante la evolución de los frutos según variedad y exposición a diferente intensidad de radiación solar

Durante el desarrollo de la planta se generan EROs como consecuencia de reacciones del metabolismo celular relacionadas con el transporte de electrones tales como: fotosíntesis, respiración, fotorespiración, β -oxidación de ácidos grasos. Pero bajo condiciones ambientales normales la cantidad de EROS producidos no presentan un riesgo para las plantas ya que existen en las células mecanismos bioquímicos que contribuyen a mantener (detoxificar) niveles basales de estas especies. Una de las estrategias celulares efectivas para detoxificar las

EROs lo constituyen las enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX, monodehidroascorbato reductasa (MDAR), dehidroascorbato reductasa (DAR) y GR operando en el ciclo del glutatión-ascorbato (Bowler y col., 1992; Scandalios y col., 1993; Purvis y col., 1997; Hodges y col., 2001; Mittler, 2002) y compuestos antioxidantes no enzimáticos como el AsA y el GSH (Polle A., 2001; Potters y col., 2002; Belmonte y col., 2005).

La concentración de EROs, que con condiciones ambientales normales se mantiene estable y baja durante el transcurso del crecimiento de un órgano vegetal, tiende a aumentar al aproximarse el envejecimiento. Así se ha demostrado que llegando a la senescencia algunos antioxidantes aumentan mientras otros decrecen con un perfil específico que probablemente depende de la especie y la variedad (Hodges y Forney, 2000). Es decir, que la homeostasis celular mantenida por la acción coordinada de varios pasos bioquímicos tiende a romperse con el envejecimiento con el consiguiente aumento en la concentración de EROs.

En este trabajo la maduración de los frutos de las dos variedades coincidió con los cambios más marcados en el comportamiento de las enzimas antioxidantes. Estos cambios se produjeron durante los meses de enero y febrero, lapso durante el cual la alta radiación solar y elevadas temperaturas determinaron en los frutos una mayor producción de antioxidantes posiblemente relacionada con una mayor producción de EROs. En efecto los frutos que, en el Alto Valle de Río Negro y Neuquen, se desarrollaron expuestos a plena radiación solar (del orden de 1.300 W m^{-2}) experimentaron temperaturas en la piel del fruto que promediaron los $46 \text{ }^\circ\text{C}$ (**Figura 24**) es decir, una situación de estrés oxidativo. En otras regiones de mundo productoras de manzana, como es el Valle del río Jordan en Israel, la exposición de los frutos a plena radiación solar resulta en que la temperatura de los tejidos de la cara expuesta se eleva a valores superiores en $15 \text{ }^\circ\text{C}$ a los registros ambientales, con temperaturas máximas de pulpa de frutos en desarrollo que varían entre 40 y $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Woolf y col., 2000).

Todos los organismos vivos tienen un rango de temperaturas óptima para su crecimiento. Cuando la temperatura se eleva por encima de las óptimas el crecimiento celular cesa y sobreviene un estado de estrés. Bajo un “shock” provocado por temperaturas subletales, las células responden sintetizando sustancias que le permiten superar las condiciones de estrés y al mismo tiempo incrementan su capacidad para resistir temperaturas letales. En ese proceso de aclimatación se producen cambios metabólicos tales como inducción de la síntesis de “heat shock proteins”, inducción de enzimas que detoxifican las

EROs, supresión de pasos metabólicos involucrados en la generación de EROs, etc (Panchuck y col., 2002; Rizhsky y col., 2002).

Creciendo a campo las plantas se ven a menudo sujetas a una combinación de condiciones estresantes tales como calor, alta radiación y sequía (Woolf y col., 2000). En nuestro caso se estuvo ante la combinación de un estrés provocado por la suma de altas temperaturas y radiación, condiciones propias de un ambiente árido, y bajo las cuales se caracterizaron algunos de los mecanismos de respuesta desarrollados por los frutos de manzano. Caracterización que puede resultar importante si se quiere manipular el metabolismo de la planta para aumentar natural o artificialmente la tolerancia a ese estrés.

Los tejidos vegetales capaces de fotosintetizar o al menos de transformar la energía luminosa en energía química tienden a aclimatarse a la radiación solar que reciben y por consiguiente a las condiciones de estrés fotooxidativo (Abarca y col., 2001). Analizando la expresión de genes en hojas de tabaco aclimatadas a estrés oxidativo Vranová y col. (2002) han determinado que al menos 95 genes alteran su expresión, de los cuales el 83 % sufren inducción y sólo el 17 % restante son reprimidos. Entre los genes inducidos están los relacionados a síntesis de enzimas antioxidantes. De los mecanismos de fotoprotección dos procesos bioquímicos han recibido mayor atención en los últimos 15 años. Uno es la disipación del exceso de energía de excitación a través del ciclo de las xantofilas (Müller y col., 2001); el otro, es la fotorreducción del oxígeno y la subsiguiente detoxificación de las EROs por un sistema antioxidante enzimático y no-enzimático integrado (Asada, 1999). Así muchos estudios han demostrado que en hojas expuestas al sol se observa mayor producción de antioxidantes respecto de hojas sombreadas (Mishra y col., 1993; Grace y Logan, 1996; Brugnoli y col., 1998; Hodges y col., 2001; Vranová y col., 2002). Comparado con las hojas, los estudios realizados en aclimatación de frutos a la radiación solar son pocos y establecen al menos una similitud y una diferencia en el sistema experimental. Primero, durante su crecimiento los frutos, al igual que las hojas, se somborean a sí mismos y por las hojas; y segundo, los frutos tienen más baja capacidad de fotosíntesis que las hojas, por lo tanto son sujetos a mayor exceso de energía de excitación.

Si bien es importante tener en cuenta que la producción de superóxido y de peróxido de hidrógeno en bajas concentraciones pueden actuar como una señal de que la célula está bajo una situación de estrés (Shigenaga y col., 2005), aquí hemos trabajado con condiciones de estrés prolongado a fin de estudiar el comportamiento de los sistemas de detoxificación de un

exceso de EROs y la capacidad de adaptación de los frutos a esas condiciones. Los incrementos observados en la actividad enzimática y en la peroxidación lipídica indicarían que el aumento de radiación+temperatura provocó estrés oxidativo en los frutos (Toivonen, 2004; Shiu y Lee, 2005).

Cuando por aumentos en la temperatura y densidad de flujo fotónico en frutos de las variedades BR y RD se alcanzaron las condiciones de estrés oxidativo los resultados mostraron aumentos en la actividad de SOD (Bowler y col., 1992; Scandalios, 1993; Mishra y col., 1993; Grace y Logan, 1996; Gong y col., 2001; Ma y col., 2003) (**Figuras 12 y 13**). Nuestros resultados coinciden con determinaciones realizadas en otras variedades de manzanas como Granny Smith (Yuri y col., 2000-b), en *Cucurbita pepo* desarrollada a campo (Logan y col., 1998) y con lo observado en estudios realizados en hojas de *Vinca major*, *Schefflera arboricola*, *Mahonia repens* en experimentos en cámaras de crecimiento (Grace y Logan, 1996). En cambio trabajos realizados por Ma y Cheng (2003) indican que la actividad de SOD en piel de manzanas Gala y Smothee no mostró respuestas significativas a diferentes radiaciones solares.

Dentro de las células la actividad de la enzima SOD constituye la primera línea de defensas contra el exceso de EROs y es una de las enzimas más importantes en la detoxificación de estos compuestos (Andrea Polle, 2001; Grene Alscher y col., 2002).

La actividad de SOD es central en el mecanismo antioxidante ya que determina la concentración de H_2O_2 y de aniones superóxido, que son los sustratos de la reacción de Haber-Weiss (fuente de radicales hidroxilo). El H_2O_2 , que debe ser rápidamente reducido para que no oxide los tejidos del fruto, puede eliminarse por la vía de las CAT (**Figura 3**) o por la reducción a través de la APX dando como productos AsA y monodehidroascorbato (MDHA) (**Figura 30**) (Andrea Polle, 2001).

En los primeros estadios de crecimiento de los frutos de las dos variedades que hemos estudiado la actividad de SOD fue similar. En estadios de desarrollo posteriores, y a medida que las condiciones climáticas se presentaron más severas (pleno verano) el nivel de las resistencias naturales a los factores de estrés oxidativo varió entre variedades (Lutfor y col., 2004), la actividad de SOD registrada en frutos de BR llegó a ser 10 veces superior que en frutos de RD. Según Foyer y col. (1994) las diferencias en la resistencia pueden estar relacionadas a modificaciones en los niveles de antioxidantes enzimáticos o no-enzimáticos, dependiendo de la edad, especie o modificaciones en la expresión génica.

En esto podría radicar, en parte, la mayor susceptibilidad al asoleado que hemos determinamos para la variedad BR respecto de RD en la cuantificación realizada en la región del Alto Valle de Río Negro. En efecto en BR, si bien CAT tuvo mayor actividad en frutos expuestos la tendencia fue a disminuir a medida que progresaba el verano, en cambio en RD se determinó un comportamiento inverso (**Figuras 14 y 15**). Por ello se sugiere que la mayor susceptibilidad de BR estaría relacionada con:

- 1) Una alta expresión de SOD, que generó una mayor producción de H_2O_2 ; y,
- 2) Una baja en la capacidad de reducir el H_2O_2 debido a la disminución en la actividad de CAT.

Esta posibilidad está apoyada por estudios realizados en tomate (Kerdnaimongkol y Woodson, 1997) y variedades de manzana que mostraron una declinación de la actividad de CAT en la piel de frutos expuestos al sol, y por determinaciones que indican que CAT es sensible a fotoinactivación *in vivo* e *in vitro* (Ma y Cheng, 2003). No obstante en frutos de *Cucurbita pepo*, en plántulas de *Sinapis alba*, en hojas de *Vinca major* y de *Spinacia oleracea* sometidas a alta densidad de flujo fotónico se registró inducción de la actividad de CAT (Logan y col., 1998; Dat y col., 1998; Hodges y col., 2001).

La otra ruta de detoxificación de EROs que ha sido estudiada aquí fue la vía de Halliwell-Asada (glutación-ascorbato) que es funcional tanto en cloroplastos, citoplasma, mitocondrias y peroxisomas. En este caso la vía de degradación de H_2O_2 (**Figura 30**) indicarían que: 1) el MDHA producido por la APX puede ser reducido a AsA por la MDAR obteniendo el poder reductor del NAD(P)H; o, 2) dismutarse a AsA y dehidroascorbato (DHA) y éste, a su vez, ser reducido a AsA por la DAR en un proceso dependiente de GSH y NADPH (ciclo del glutación-ascorbato) (Noctor y Foyer 1998; Chew y col., 2003).

Esta vía también aportaría razones para explicar por qué los tejidos de frutos de BR serían más dañados por foto-oxidación ya que si bien entre las dos variedades la evolución del contenido de AsA (**Figura 21**) fue similar y no se registró disparidad en el comportamiento de APX (**Figuras 16 y 17**), sí se determinó diferencias en GR (**Figuras 18 y 19**). Mientras en RD la enzima GR se mantuvo en niveles estables durante todo el período de estudio, en BR disminuyó 10 veces al acercarse la cosecha, lo que limitaría la capacidad de obtener poder reductor del NADPH para reciclar el GSH y podría restringir la capacidad de degradar el H_2O_2 formado a través del ciclo del glutación-ascorbato. Asociado a la baja actividad de GR estaría también el hecho de que no se encontraron en BR diferencias en el contenido de GSH

entre frutos expuestos y protegidos (**Figura 20**). La limitación en el contenido de GSH estaría afectando la capacidad de defensa antioxidante tanto por disminuir el pasaje de poder reductor en el ciclo del glutatión-ascorbato como por su acción en la protección de las proteínas que contienen grupos tioles (Potter y col., 2002).

La vía que estaría más activa para degradar H_2O_2 sería a través de la directa reducción (mediada por la MDAR y el NAD(P)H, ver **Figura 30**) del MDHA a AsA sin pasar a DHA, vía que se ha demostrado en cloroplastos y mitocondrias (Chew y col., 2003). En este caso el poder reductor posiblemente haya provenido directamente del aparato fotosintético, por lo tanto sería autónomo respecto al aporte de energía (Mittler, 2002). De todos modos hay que tener en cuenta que en los frutos y a medida que se aproxima la madurez, los cloroplastos pasan a cromoplastos y esto restringiría la cantidad de organelas para la vía propuesta. A similares resultados se ha llegado estudiando el sistema antioxidante en mitocondrias durante la maduración de frutos de morrón (*Capsicum annuum*) donde se encontró que la actividad de GR fue 3 veces menor en frutos maduros que en frutos verdes (Jiménez y col., 2002-b). Estos autores coinciden en explicar esta situación indicando que en esta especie la regeneración de AsA estaría más ligada a la MDAR y en menor proporción a GR. El poder reductor podría provenir del NADH como del NADPH igual que vía GR, pero en este caso la ruta podría ser el ciclo de las xantofilas (Azcon-Bieto y Talon, 1993). Un estudio realizado por Ma y Cheng (2003) en frutos de manzanas expuestos al sol confirmaría este supuesto, ellos determinaron aumento en el ciclo de las xantofilas relacionado con mayor disipación de energía térmica.

Es probable entonces que la mayor capacidad de fotoprotección que la variedad RD ha mostrado contra las EROs, radique en que en los frutos expuestos al sol hubo un aumento simultáneo de la actividad de la mayoría de las enzimas de los dos sistemas de defensa estudiados, la vía de la CAT y la ruta de Halliwell-Asada, aumento que no se observó en la variedad BR.

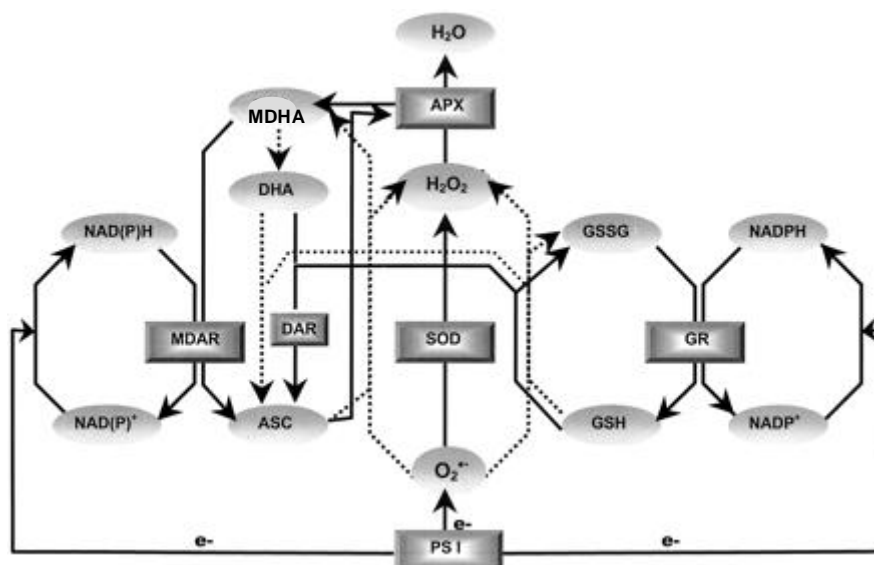


Figura 30: El ciclo SOD-GSH-AsA (líneas gruesas, reacciones enzimáticas) y reacciones redox no-enzimáticas (líneas punteadas). Extraído de: Polle A. (2001) *Plant Physiology*, 126: 445-462.

6. Capacidad de adaptación de los frutos a alta radiación solar

Los frutos de diferentes variedades de manzanas que se desarrollan a la sombra o luz solar indirecta son, por lo general, más susceptibles al daño por sol cuanto más tarde son expuestos a la radiación solar comparados con aquellos que la reciben durante todo el período de crecimiento (Yuri y col., 2000). En el presente trabajo hemos observado que los frutos que se desarrollaron todo el tiempo al sol una parte sufrió asoleado, especialmente los que crecían en la parte superior del árbol (**Figura 27**). Esto puede ser debido a la continua exposición a la radiación solar y también a la suma de otros factores de estrés oxidativo como menor llegada de agua, mayor deshidratación por viento, menor protección de follaje, etc. La otra parte de los frutos que crecieron al sol llegó en buen estado a la fecha de cosecha. Esto indicaría que los frutos que reciben desde el comienzo de su crecimiento un aumento paulatino de situaciones de estrés por exceso de radiación, se adaptarían al estrés generando defensas que hasta ciertos límites los protegerían. En cambio, cuando la exposición a alta radiación se realiza repentinamente los tejidos no alcanzan a adaptarse.

El hecho que los frutos que crecen a la sombra se hacen más susceptibles al daño por sol cuando son expuestos en forma repentina a la radiación solar (ver sección 5.1. de Resultados y **Figura 22**) reforzaría la posibilidad de un proceso de adaptación, ya que como la exposición

se produce bruscamente no alcanzarían a sintetizar suficientes defensas antioxidantes observándose en consecuencia el “quemado” de los tejidos. En efecto, en los frutos que fueron repentinamente expuestos al sol se visualizaron a los 2 días los síntomas de asoleado y en menos de una semana se observó la muerte total de los tejidos (**Fotos 8, 9 y 10**). Los síntomas que evolucionaron desde la despigmentación de los tejidos, pasando por manchas pardas y finalmente tejidos necróticos, coincidieron en el tiempo con las determinaciones de pérdida de electrolitos indicando que las membranas celulares estaban dañadas y las células no podían volver a la situación normal de turgencia (Palta J., 1990).

7. Eficiencia del uso de caolín en prevención de asoleado

Como se ha analizado en capítulos anteriores, el asoleado es un problema que baja la productividad de frutos de buena calidad en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. En la actualidad se está trabajando a escala mundial en buscar herramientas que permitan disminuir este problema. Las alternativas evaluadas van desde cambios en aspectos culturales del huerto, pulverización de protectores solares y generación de transgénicos que sobre expresen enzimas antioxidantes (Rabinowitch y Sklan, 1980; Mc Kersie y col., 1996 y 2000; Wang y col., 2002; Wisniewski y col. 2002; Luftor y col., 2004). Dada la urgencia en encontrar soluciones al problema presentado por daño de sol se consideró de mucha importancia para nuestra región evaluar la eficiencia del caolín (Caolinita, una familia mineral del grupo de las arcillas; Glenn y col, 1999; Wünsche y col, 2001) como pantalla solar.

En las determinaciones que hemos realizado la aplicación de caolín redujo la RFA a medida que aumentaba la concentración del producto (**Figura 23**), pero para dosis en concentraciones agrónomicamente viables del 3-4% (Wünsche y Palmer, 1997; Glenn y col, 2001) la disminución de la RFA no sería mayor al 20%.

Un film de partículas generado con la aplicación de caolín actúa reflejando los rayos solares, tanto las longitudes de onda del infrarrojo, que son las causantes de calentamiento, como las longitudes del UV. En las mediciones que hemos realizado respecto del barrido espectral de caolín (ver sección 6.1. de Resultados) los mayores índices de absorbancia (1,960 UA) se registraron en las longitudes de onda UV de alta energía. A partir de esa longitud de onda se observa un descenso hasta llegar a 0,542 UA en los 800 nm.

La desviación de los rayos infrarrojos disminuyó la temperatura en los frutos tratados con caolín al 4% en 3°C manteniendo la temperatura en valores más cercanos a lo normal para

el metabolismo celular. Esta disminución de temperatura en la cara expuesta de los frutos se observa hasta una dosis de 16% de caolín. Luego se observó aumento de la temperatura del fruto (**Figura 24**) relacionado probablemente a que en concentraciones superiores la arcilla forma una capa que actúa como aislante impidiendo la refrigeración de la superficie del mismo.

El film de caolín al provocar disminución de temperatura en el vegetal, le permite superar en mejores condiciones el estrés hídrico y calórico (Curry y col., 2002), por lo que los frutos tardaron más en presentar daño y éste fue menor que en los controles que también estuvieron expuestos y sin protección (**Figura 25**), por lo que puede afirmarse que la productividad de frutos sanos aumenta con el uso de caolín.

Es importante destacar que los tratamientos con caolín que hemos realizado dieron diferentes resultados según la variedad de manzana. En BR aplicaciones mensuales de caolín al 4% redujeron en 50% los frutos dañados (**Figura 26**), en cambio los estudios realizados en RD no presentaron diferencias con el control (**Figura 28**). Tanto Fuji y BR son variedades más susceptibles al asoleado que RD (**Tabla 8**), lo que sugeriría que el caolín puede ser más efectivo en la prevención de asoleado en cultivares más sensibles. Coincidentemente trabajos realizados en España con caolín aplicado en un esquema de 5% el 18 de junio, 2,5% el 25 de junio y dos aplicaciones más una en julio y otra en agosto indican una reducción del 20% de frutos de granada dañados (Melgarejo y col., 2002). Ensayos realizados en Estados Unidos durante el mes de julio en manzanos de la variedad Fuji indicaron una disminución de 23,9% de asoleado (Schupp y col, 2002). En zonas productoras de Chile se han publicado mermas de asoleado de hasta 50% para la variedad Imperial Gala (Prado, 2003).

Si bien, trabajos realizados en pera variedad "Anjous" y manzana "Empire" han indicado aumento de tamaño de los frutos tratados en hasta un 17% (Werblow, 1999; Glenn y col., 2000) en las variedades de manzana RD y BR no hemos encontrado diferencias en el diámetro de los frutos. Siguiendo la evolución de los frutos en las distintas etapas del crecimiento hemos llegado a la conclusión que los tratamientos con caolín en nuestra región no afectan el tamaño (**Figura 29**). Pero sí acordamos con Glenn y col., (2000) que en la época de cosecha los árboles tratados presentan mayor contenido de clorofila y, además hemos determinado aumento en el área foliar (**Tabla 9**).

SINTESIS GENERAL

El daño por sol o "asoleado" es un desorden fisiológico que produce perjuicio en la calidad de los frutos. En la región del Alto Valle las pérdidas de manzanas por asoleado son importantes y oscilan entre un 15 a 56% dependiendo del cultivar o variedad. Las variedades seleccionadas para realizar este estudio representaron a las más afectadas, el caso de BR y a las que manifiestan menos el asoleado como es RD.

Los altos niveles de peroxidación de lípidos y el breve tiempo en que aparecen los síntomas indican que entre las causas que producen asoleado de frutos en nuestra región la más importante, aunque no podemos afirmar que sea la única, es la temperatura elevada que se registra en frutos expuestos al sol. En efecto, los frutos que se desarrollaron en condiciones expuestas a plena radiación solar (radiación+temperatura) presentaron mayor estrés oxidativo que los protegidos por el follaje. Los rangos de temperaturas utilizados en los ensayos estuvieron dentro de los máximos característicos para el verano de la región. Los frutos que crecieron a la sombra fueron más susceptibles al daño por sol dado que cuando fueron sometidos en forma repentina al sol presentaron rápidamente lesiones, mientras que, los desarrollados constantemente expuestos no fueron dañados. Esto reforzaría la probabilidad de que exista un proceso de adaptación, ya que como la exposición se produce bruscamente no alcanzarían a sintetizar suficientes defensas antioxidantes observándose en consecuencia el quemado de los tejidos.

El daño por asoleado, compatible con un estrés oxidativo, se manifestó tanto por síntomas visibles como por cambios fisiológicos (aumento de la pérdida de integridad de las membranas), bioquímicos (incremento en la peroxidación de lípidos) y metabólicos (cambios en las vías de detoxificación de EROs). Las rutas enzimáticas que hemos estudiado evidenciaron que el sistema antioxidante ciclo SOD-CAT y SOD-GSH-AsA operan con ritmos diferentes a lo largo del desarrollo del fruto. No obstante, cuando los frutos se desarrollaron expuestos a estrés oxidativo por alta radiación solar la síntesis de los componentes antioxidantes de estos sistemas se determinó aumentada, mostrando que dentro de las manzanas se presentan diferencias entre variedades en cuanto a la dinámica de estos procesos (**Figura 31**). Esto constituye una de las posibles causas que explicarían por qué la incidencia de asoleado es mayor en BR que en RD. La mayor susceptibilidad de la variedad BR al estrés causado por elevada radiación solar se debería, en parte, a la menor capacidad

antioxidante por la vía SOD-CAT y a que la disminución registrada en GR haría inoperante o menos eficiente la degradación del DHA por el ciclo del glutatión-ascorbato.

En la presente tesis hemos registrado variaciones en la actividad de las enzimas antioxidantes entre las diferentes variedades de manzanas. Estos datos relacionados con la distinta susceptibilidad al asoleado que presentan BR y RD alientan la posibilidad de

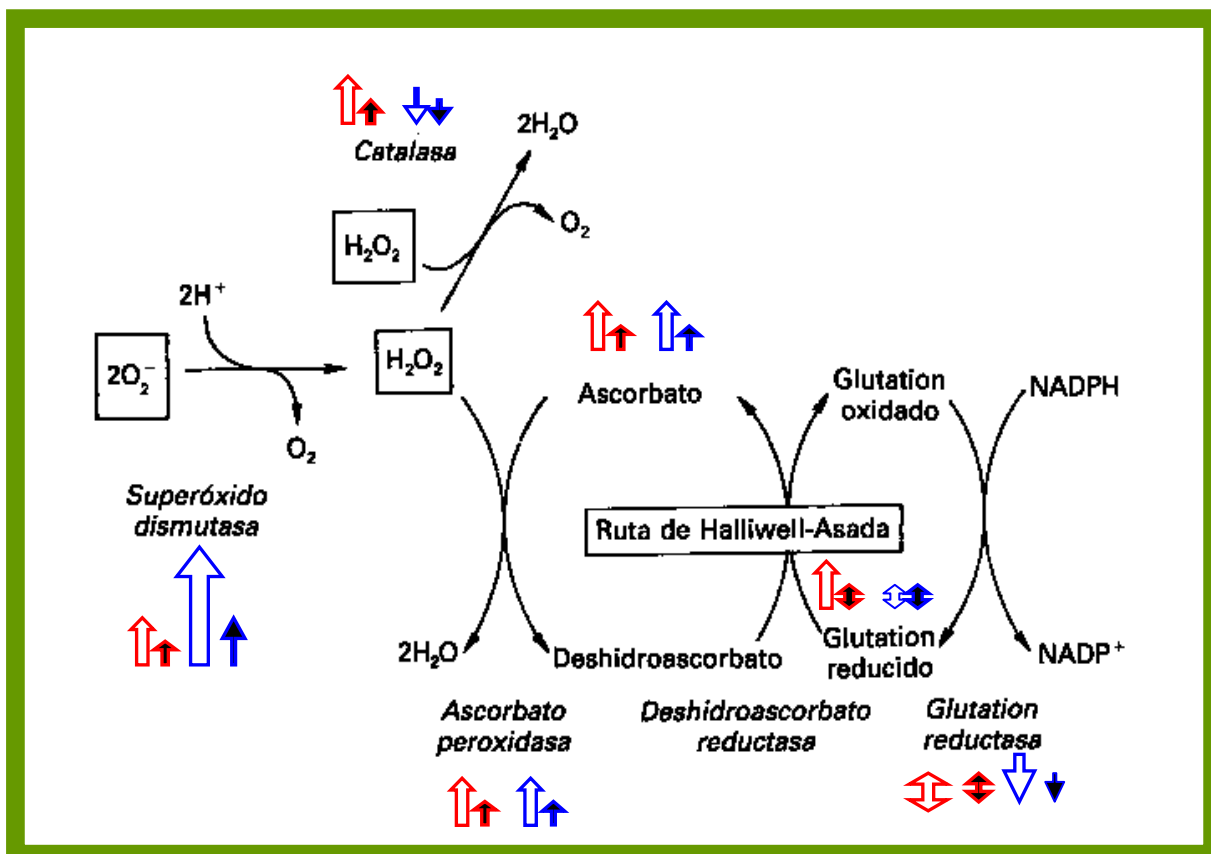


Figura 31: Evolución de la actividad del sistema antioxidante en piel de frutos de manzana Red Delicious (color rojo) y Braeburn (color azul), expuestos a plena radiación solar (flechas vacías) y sombreados (flechas llenas) a lo largo de la estación de crecimiento. La dirección de la flecha indica la tendencia de la actividad enzimática a aumentar (↑), disminuir (↓) o mantenerse igual (⇕) con el transcurso del crecimiento; El tamaño de la flecha señala la cantidad relativa de enzima en la madurez de los frutos de ambas variedades sometidos a diferentes condiciones de radiación solar.

continuar trabajos de ingeniería genética para lograr variedades mutantes más resistentes al estrés oxidativo causado por exposición a elevada radiación solar.

No obstante, hemos probado que prevenir una súbita exposición de frutos sombreados a una alta radiación y el uso de protectores solares en base a caolín, pueden ser una herramienta agronómica preventiva del asoleado.

CONCLUSIONES

- El daño por sol en el Alto Valle de Río Negro es similar al de otras regiones productoras de fruta de pepita del mundo. Esta afección presenta diferente intensidad según las distintas variedades, siendo Braeburn una de las más susceptibles y Red Delicious menos afectada.
- Las altas temperaturas registradas en la región del Alto Valle durante la estación de crecimiento son el principal factor promotor de asoleado en frutos de manzanas.
- Ante un estrés por exposición a elevada radiación solar los frutos de manzanas presentan aumentada la síntesis de las defensas antioxidantes de rutas del glutatión-ascorbato y de las catalasas. La eficiencia de estas vías cambia según las diferentes variedades.
- La mayor peroxidación de lípidos y consecuente mayor daño de membranas en BR respecto de RD estaría relacionada con una alta actividad de SOD que genera mayor producción de H₂O₂ y una baja capacidad de reducirla dado que presenta disminución en la actividad de CAT y desbalances en el ciclo del glutatión-ascorbato.
- Los frutos que reciben desde pequeños aumento paulatino de situaciones de estrés por exceso de radiación solar generarían defensas antioxidantes que hasta ciertos límites los protegerían.

- Los protectores solares en base a caolín actúan reflejando los rayos solares, tanto las longitudes de onda del infrarrojo, que son las causantes de calentamiento, como las longitudes del UV que producen el “quemado” de diferentes órganos del vegetal. Por lo tanto, son productos con cierta eficacia en la prevención de asoleado.

POSIBLES LINEAS DE AVANCE EN EL ESTUDIO

Estudiar las razones por las cuales la zona de Villa Regina presenta mayor afección por asoleado. Los factores analizados podrían ser de índole microclimáticas, composición varietal, tratamientos culturales entre otros.

Siendo la temperatura uno de los factores principales causantes del daño por sol sería importante avanzar sobre la determinación de períodos de exposición, umbrales de temperatura, susceptibilidad en los diferentes estados ontogénicos, etc.

Avanzar sobre la comprensión y caracterización de las vías de síntesis y regulación de las enzimas antioxidantes de los ciclos estudiados sería importante con el fin de controlar el metabolismo de la planta para aumentar natural o artificialmente la tolerancia al estrés por altas temperaturas así como por elevada radiación solar.

Estos resultados motivan a la investigación de mutantes en diferentes enzimas antioxidantes y proyectarlos en trabajos para la obtención de frutales resistentes a asoleado de frutos.

Definido que los frutos que se desarrollan expuestos a pleno sol presentan aumento de sus sistemas antioxidantes sería importante experimentar sobre prácticas culturales que eviten la exposición brusca de frutos que crecen protegidos. Entre las intervenciones agronómicas sería importante profundizar en el adecuado uso de los protectores solares como el caolín.

BIBLIOGRAFIA

1. Abarca D., Roldan M., Martín M., Sabater B. (2001) "*Arabidopsis thaliana* ecotype Cvi shows an increased tolerance to photo-oxidative stress and contains a new chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase isoenzyme". *Journal of Experimental Botany* 52: 1417-1425.
2. Abassi N.A., Kushad M.M., Endress A.G. (1998) "Active oxygen-scavenging enzymes activities in development apple flowers and fruit". *Scientia Horticulturae* 74(3): 183-194.
3. Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. (2005) "Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*". *Plant Physiology and Biochemistry*;43(3):213-23.
4. Almeselmani M., P.S. Deshmukha, R.K. Sairama, S.R. Kushwahaa and T.P. Singha (2006) "Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress" *Plant Science* 171(3):382-388.
5. Andrew P., Johnson J. (1996) "Physiology of sunburn development in apples". *Good Fruit Grower* Juli: 33-36.
6. Aono M., Kubo A., Saji H., Natori T., Tanaka K. Kondo N. (1993) "Enhanced tolerance to photo-oxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathion reductase activity". *Plant Cell Physiology* 34: 129-135.
7. Arakawa O. (1991) "Effect of temperature on anthocyanin accumulation in apple fruit as affected by cultivar, stage of fruit ripening and bagging". *The Journal of Horticultural Science* 66 (6): 763-768.
8. Asada K. (1999) "The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photon". *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
9. Asakawa T., Matsushita S. (1980) "Thiobarbituric Acid test for detecting lipid peroxides". *Lipids* 14: 401-406.
10. Azcon-Bieto J., Talon M. (1993) "Fisiología y bioquímica vegetal". Ed. 1era, español, Mc Graw-Hill-Interamericana de España, Madrid, pag. 581.
11. Barber H. N., Sharpe P.H. (1971) "Genetics and physiology of sunscald of fruits". *Agricultural Meteorology* 8: 175-191.
12. Belmonte MF, Macey J, Yeung EC, Stasolla C. (2005) "The effect of osmoticum on ascorbate and glutathione metabolism during white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development". *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 337-46

13. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer (2003) "Bioquímica". Ed. Española, 5^{ta} edición, Editorial Reverté S.A., Barcelona, España, pag. 506.
14. Berh O., Frankken E. J., Van Kloppers F., Dempers A. (1980) "Sunburn on apples- Preliminary results of an investigation conducted during the 1978/79 season". *Deciduous Fruit Grower* 30(1): 8-22.
15. Bjorn O. L., Brian E. E. (1997) "The effect of overexpression of ascorbate peroxidase on ozone-induced necrosis in the ozone-sensitive tobacco cultivar Bel-W3". *Plant Physiology* 114: 103.
16. Blanke M. M. y Lenz F, (1989) "Fruit photosynthesis". *Plant cell and environment* 12:31-46.
17. Bouvier F., Backhans R.A., Camara B., (1998) "Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress". *Journal of Biological Chemistry* 273: 30651-30659.
18. Bowen J., Lay-Yee M., Plummer K., Ferguson I (2002) "The heat shock response is involved in thermotolerance in suspension-cultured apple fruit cells". *Journal of Plant Physiology* 159(6):599-606
19. Bowler Ch., Van Montagu M., Inzé D. (1992) "Superoxide dismutase and stress tolerance". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
20. Brugnoli E., Scartazza A., De Tullio M., Monteverdi M., Lauteri M., Augusti A. (1998) "Zeaxanthin and non-photochemical quenching in sun and shade leaves of C3 and C4 plants". *Physiologia Plantarum* 104: 727-734.
21. Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000) "Biochemistry and molecular biology of plants". Ed. 1^{era}, ingles, editorial American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pag. 1367.
22. Buchanan-Wollaston V. (1997) "The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181-199.
23. Chew O., Whelan J., Millar A. H. (2003) "Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants". *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 47: 46869-46877.
24. Curry E. (1996) "Golpe de sol: la experiencia norteamericana". En: Coloquio en Pomaceas, Centro de Pomaceas, Universidad de Talca, Chile. pp. 64-74.
25. Curry E., Baer D., Young J. (2002) "X-ray microanalysis of apples treated with kaolin indicates wax-embedded particulates in the cuticle". XXVI International Horticultural Congress and Exhibition, Toronto, Canada, 11-17/08/2002. Libro de resúmenes, International Society for Horticultural Science, pp 147.

26. Damario E.A., Cattáneo C.L. (1982) "Estimación climática de la evapotranspiración potencial en la Argentina según el metodo de Penman 1948". *Rev. Facultad de Agronomía* 3 (3): 271-292.
27. Dat J., Lopez-Delgado H., Foyer Ch., Scott I. (1998) "Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in Mustard seedlings". *Plant Physiology* 116: 1351-1357.
28. Desikin R. (2001) "Regulation of the Arabidopsis transcriptosome by oxidative stress". *Plant Physiology* 127:159-172.
29. Dhindsa R. S., Plumb- Dhindsa P., Thorpe T. A. (1981) "Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased level of superoxide dismutase and catalase". *Journal of Experimental Botany* 32: 93-101.
30. Ellman C.L. (1959) "Tissue sulphhydryl group". *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
31. Evans R. (1993) "Designing and operating overtree evaporative cooling system for apples", Part One. *Good Fruit Grower* June: 23-27.
32. Fang Z., Bouwkamp J.C., Solomos T. (1998) " Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris*L.". *Journal of Experimental Botany* 49: 503-510.
33. Foyer C.H., Harbinson J. (1994) "Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport". In Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants (Foyer and Mullineaux P.M., eds), pp1-42. CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN 0-8493-5443-9)
34. Foyer Ch. H., Lelandais M, Kunert K.J. (1994) "Photooxidative stress in plant". *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
35. Frenkel C. (1991) "Disruption of macromolecular hydration - A possible origin of chilling destabilization of biopolymers. *Trends Food Science and Technology* 2: 39-41.
36. Garriz P.I., Alvarez H.L., Colavita, G.M. (1996) "A regression model of the growth pattern of 'Bartlett' pear fruits". *Advances in Horticultural Science* 10: 191-194.
37. Glenn D. M., Puterka G.J., van der Zwet T., Byers R.E., Feldhake C. (1999) "Hydrophobic particle films: A new paradigm for suppression of arthropod pests and plant diseases". *Journal Economic Entomology* 92: 759-771.
38. Glenn D. M., Puterka G.J., Wisniewski M.E. (2000) "White washing agriculture". *Agricultural Research* Noviembre 2000: 14-17

39. Gong Y., Toivonen P., Lau O., Wiersma P. (2001) "Antioxidant system level in 'Braeburn' apple is related to its browning disorder". *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42: 259-264.
40. Guoa Y.P., Zhoua H.F., Zhanga L.Ch. (2006) "Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species". *Scientia Horticulturae* 108(3):260-267.
41. Grace S.C., Logan B.A. (1996) "Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species". *Plant Physiology* 112: 1631-1640.
42. Grassmann J., Hippeli S., Elstner E.F. (2002) "Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress". *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 471-478.
43. Grene Alscher R., Erturk N., Heath L.S. (2002) "Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants". *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
44. Guerzoni M.E., Lanciotti R., Cocconcelli P.S. (2001) "Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*". *Microbiology* 147:2255-2264.
45. Hérouart D., Baudouin E., Frenco P., Harrison J., Santos R., Jamet A., Van der Sype G., Touati D., Puppo A. (2002) "Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-Rhizobium symbiosis?". *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 619-624.
46. Hodges D. M., Andrews Ch. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. (1997) "Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines". *Journal of Experimental Botany* 48: 1105-1113.
47. Hodges D.M., De Long 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.
48. Hodges M. D., Forney Ch. F. (2000) "The ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves". *Journal of Experimental Botany* 51: 645-655.
49. Hodges D. M., Forney Ch. F., Wismer W. V. (2001) "Antioxidant responses in harvest leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates". *Journal of the American Society of Horticultural Science* 126(5):611-617.
50. Hodges D., Lester G., Munro K., Toivonen P. (2004) "Oxidative stress: importance for postharvest quality". *HortScience* 39:924-929

51. Hopkins W.G., Hüner N.P. (2004) "Introduction to Plant Physiology. 3rd Ed. Wiley and Sons, Inc. USA, pag. 557.
52. Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P. (2002-a) "Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening". *Planta* 214(5):751-8.
53. Jimenez A., Gómez J.M., Navarro E., Sevilla F. (2002-b) "Change in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits". *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 515-520.
54. Jones R., Bethke P., Fath A., Beligni V. (2000) "Hormones, reactive oxygen and the regulation of cell death in cereal aleurone". XXIII Reunión de Fisiología Vegetal, Río Cuarto, 29/11-01/12/2000. Actas de congreso, Ed. Coordinación de Comunicación Institucional Universidad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. pp 8.
55. Kaminaka H., Morita S., Susuki T., Masumura T., Tanaka K. (1997) "Responses of rice superoxide dismutase to oxidative stresses and tolerance of superoxide dismutase overproducing transgenic plants to paraquat". The Quadrenial Joint Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists and the Canadian Society of Plant Physiologists, 2-6/08/1997, Vancouver, Canada, *Plant Physiology* 114: 102.
56. Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingste G., Creissen G., Mullineaux P. (1999) "Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*". *Science* 284: 654-657.
57. Kerdnaimongkol K., Woodson W. (1997) "Antisense expression of catalase gene in transgenic tomato". *Plant Physiology* 114: 102-103.
58. Kliebenstien D.J., Conklin P.L., Landry L.G., Williams E.H., Robert L. (1997) "Arabidopsis mutants altered in antioxidant enzyme accumulation". *Plant Physiology* 114: 56.
59. Krause G.H., Schmude C., Garen H., Koroleva O.Y., Winter K. (1999) "Effect of solar ultraviolet radiation on the potential efficiency of photosystem II in leaves of tropical plants". *Plant Physiology* 121: 1349-1358.
60. Lacan D., Baccou J-C. (1998) "High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in non-netted muskmelon fruits". *Planta* 204: 377-382.
61. Lakso A. (1994) "Environmental physiology of the apple" In Schaffer B., Andersen P.C. (Eds.), Environmental physiology of Fruit Crops, vol. 2 CRC Press, pp. 3-42
62. Langebartels Ch., Wohlgemuth H., Kschiesschan S., Grün S., Sandermann H. (2002) "Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants". *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 567-575.

63. Levitt J., Responses of Plants to Environmental Stresses, vol. I, Academic Press, New York, 1980, pp. 347–470.
64. Liu Y., Tong C., Glime J.M. (2003) "The changes of membrane permeability of Mosses under high temperature stress". *The Bryologist* 106(1): 53-60.
65. Liu X. y Huang B. (2000) "Heat Stress Injury in Relation to Membrane Lipid Peroxidation in Creeping Bentgrass". *Crop Science* 40:503-510.
66. Logan B., Demming-Adams B., Adams W., Grace S. (1998) "Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* acclimated to four growth PPFs in the field". *Journal of Experimental Botany* 49: 1869-1879.
67. Lu Y., Foo L.Y. (2000) "Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace". *Food Chemistry* 68(1): 81-85.
68. Luftor Rahman S.M., Mackay W.A., Nawata E., Sakuratani T., Mesbah Uddin A.S.M., Quebedeaux B. (2004) "Superoxide dismutase and stress tolerance of four tomato cultivars". *HortScience* 39: 983-986.
69. Lutts S., Kinet J.M., Bouharmont J. (1996) "NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa*) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* 78:389-398.
70. 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 Science* 165: 819-827.
71. Ma F., Cheng L. (2004) " Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophyll cycle and the ascorbate–glutathione cycle". *Plant Science* 166(6): 1479-1486.
72. Mazza C. A., Scopel A.L., Ballaré C.L. (2000) "Efectos de la radiación ultravioleta-B en agro-ecosistemas". XXIII Reunión de Fisiología Vegetal, Río Cuarto, 29/11-01/12/2000. Actas de congreso, Ed. Coordinación de Comunicación Institucional Universidad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. pp 40-41.
73. Mc Kersie B.D., Bowley S.R., Harjanto E., Leprince O. (1996) "Water-deficit tolerance and field performance of transgenic Alfalfa overexpressing superoxide dismutase". *Plant Physiology* 111: 1177-1181.
74. Mc Kersie B.D., Murnaghan J., Jones K.S., Bowley S.R. (2000) "Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance". *Plant Physiology* 122: 1427-1437.

75. Meir S., Kanner K., Akiri B., Philosoph-Hadas S., (1995) "Determination and aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1813-1819.
76. Melgarejo P., Garcia F., Hernandez F., Martinez J.J., Barrows P. (2002) "Kaolin treatments to reduce sunburn in pomegranate". XXVI International Horticultural Congress and Exhibition, Toronto, Canada, 11-17/08/2002. Libro de resúmenes, International Society for Horticultural Science, pp 147.
77. Mishra N., Mishra R, Singhal G. (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 Physiology* 102: 903-910.
78. Mitcham B. (2003) "Fruit physiological disorders: Apples, sunburn". Postharvest Technology Research and Information Center, Universidad de California, Davis. EEUU. [Http://rics.ucdavis.edu/postharvest2/Produce/disorders/apple/pdapsun.shtml](http://rics.ucdavis.edu/postharvest2/Produce/disorders/apple/pdapsun.shtml). Visitada 14/01/03.
79. Mittler R. (2002) "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance". *Trends Plant Science* 7: 405-410.
80. Müller P., Li X., Niyogi K. (2001) "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy". *Plant Physiology* 125: 1558-1566.
81. Naseri L. (2002) "Infrared and ultraviolet light injury of apple fruits". XXVI International Horticultural Congress and Exhibition, Toronto, Canada, 11-17/08/2002. Libro de resúmenes, International Society for Horticultural Science, pp 156.
82. Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Sgherri C. (2002) "Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species". *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 463-470.
83. Noctor G. Foyer C.H. (1998) "Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control". *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:249-279.
84. Palta J. P. (1990) "Stress interactions at the cellular and membrane levels". *HortScience* 25:1377-1381.
85. Panchuk I., Volkov A., Schöffl F. (2002) "Heat stress and heat shock transcription factor-depend expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis". *Plant Physiology* 129:838-853.
86. Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. (1986) "A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts". *Analytical biochemistry* 154: 536-541.

87. Parchomchuk P., Meheriuk M. (1996) "Orchard cooling with pulsed overtree irrigation to prevent solar injury and improve fruit quality of 'Jonagold' apples". *HortScience* 31: 802-804.
88. Pastori G., Foyer Ch. H. (2002) "Common components, network and pathways of crosstolerance to stress. The central role of redox and abscisic acid-mediated control. *Plant physiology* 129: 460-468.
89. 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 of Horticultural Science* 127: 355-357.
90. Polle A. (2001) "Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulation as a step towards flux analysis. *Plant physiology* 126: 445-462.
91. Potter G., De Gara L., Asard H., Horemans N. (2002) "Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?". *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 537-548.
92. Prado E. (3 de Febrero 2003) "Caolín: uso en frutales". Diario El Mercurio, Chile.
93. Rabinowitch H.D., Sklan D. (1980) "Superoxide dismutase: a possible protective agent against sunscald in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.)". *Planta* 148:162-67.
94. Rao M. V., Hale B. A., Ormrod D. P. (1995) "Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide". *Plant Physiology* 109: 421-432.
95. Ritenour M., Kochkar S., Schrader L., Hsu T., Ku M. (2001) "Characterization of heat shock protein expression in apple peel under field and laboratory conditions". *Journal of the American Society of Horticultural Science* 126(5): 564-570.
96. Rizhsky L., Liang H., Mittler R. (2002) "The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco". *Plant Physiology* 130: 1143-1151.
97. Rogiers S. Y., Kumar G.N., Knowles N.R. (1998) "Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. Are accompanied by increasing oxidative stress". *Annals of Botany* 81: 203-211.
98. Salisbury F. B., Ross C.W. (2000) "Fisiología de las Plantas". Paraninfos, Thomson editores. Madrid, España, pag. 987.
99. Schaedle M., Bassham J.A. (1977) "Chloroplast Glutathione Reductase". *Plant Physiology* 59: 1011-1012.
100. Schrader L. (1997) "Sunburn is a hot topic in orchards of Washington". *Good Fruit*

Growers August: 22-23.

101. Schrader L., Zhang J., Sun J. (2002) "Environmental stresses that cause sunburn of apple". XXVI International Horticultural Congress and Exhibition, Toronto, Canada, 11-17/08/2002. Libro de resúmenes, International Society for Horticultural Science, pp 156.
102. Schrader, L., Zhang, J. and Sun, J. (2003) "Environmental stresses that cause sunburn of apple". *Acta Horticulturae* 618: 397-405.
103. Schupp J.R., Fallahi E., Chun I (2002) "Effect of particle film on fruit sunburn, maturity and quality of 'Fuji' and 'Honeycrisp' apples". *HortTechnology* 12: 87-90.
104. Secretaría de Estado de Fruticultura de la Provincia de Río Negro, Argentina (2001) "Censo agroindustrial, frigoríficos-empaques" .
105. Serradell M. A., Rozenfeld P.A., Martínez G.A., Civello P.M., Chaves A.R., Añon M.C. (2000) "Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1421-1427.
106. Shewfelt R. L., Purvis A. C. (1995) "Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders". *HortScience* 30: 213-218.
107. Shigenaga T., Yamauchi N., Funamoto Y., Shigyo M. (2005) "Effects of heat treatment on an ascorbate–glutathione cycle in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.) florets". *Postharvest Biology and Technology* 38: 152-159.
108. Shiu C.T. y Lee T.M. (2005) "Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*". *Journal of Experimental Botany* 56:2851-65.
109. Slesak I., Miszalski Z., Karpinska B., Niewiadomska E., Ratajczak R., Karpinski S. (2002) "Redox control of oxidative stress responses in the C3 -CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*". *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 669-677.
110. Smillie R.M. "Calvin cycle activity in fruit and the effect of heat stress". *Scientia Horticulturae*,51(2):83-95.
111. Song J., Fan L., Forney C.F., Jordan M.A. (2001) "Using volatile emissions and chlorophyll fluorescence as indicators of heat injury in apples". *Journal of American Society of Horticultural Science* 126(6): 771-777.
112. Strid A. (1993) "Alteration an expression of defence genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation". *Plant Cell Physiology* 34: 949-953.

113. Tang L., Kwon S.Y., Kim S.H., Kim J.S., Choi J.S., Cho K.Y., Sung C.K., Kwak S.S. Lee HS (2006) "Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature". *Plant Cell Rep.* 25(12):1380-6.
114. Teeri J.A., Adaptation of kinetic properties of enzymes to temperatures variability, in: N.C. Turner, P.J. Kramer (Eds.), *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, Wiley-Interscience, New York, 1980, pp. 251–260.
115. Toivonen P. (2004) "Postharvest storage procedures and oxidative stress". *HostScience* 39(5):938-942.
116. Torres R., Valentines M. C., Usall J., Viñas I., Larrigaudiere C. (2003) "Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit". *Postharvest Biology and Technology Volume* 27(3): 235-242
117. Tsang E., Bowler C., Herouart D., Van Camp W., Villaroel R., Genetello C., Van Montagu., Inze D. (1991) "Differential regulation of superoxide dismutase in plants exposed to environmental stress". *The Plant Cell* 3:783-792.
118. Vacca R.A., De Pinto M.C., Valenti D., Passarella S., Marra E., De Gara L. (2004) "Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells". *Plant Physiology* 134: 1100-1112.
119. Vasquez J, (1998) "Evaluación y control de golpe de sol en manzanos". Tesis Ing. Agr. Universidad de Talca, Talca, Chile 62 p.
120. Venturino A., Anguiano O.L., Gauna L., Cocca C., Bergoc R.M., Pechen de D' Angelo A.M. (2001) "Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130: 191-198.
121. Vicente A.R., Martínez G.A., Chavesa A.R., Civello P.M. (2006) "Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage". *Postharvest Biology and Technology* 40(2):116-122.
122. Vitor R., Lidon F., Carvalho C. (1999) "Dark stained tissues of the epicarp of Encore Mandarin: interactions with the production of hydroxyl radicals". *Free Radical Research* 31: 163-169.
123. Vranová E., Atichartpongkul S., Villaroel R., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (2002) "Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress". *Proceeding of the National Academy of Science* 99: 10870-10875.
124. Wade N., Kabanagh E., Tan S. (1993) "Sunscald and ultraviolet light injury of banana

- fruits". *Journal of Horticultural Science* 68: 409-419.
125. Wang Y., Wisniewski M., Meilan R., Fuchigami L. (2002-a) "Stress tolerance in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings that overexpress Mn-superoxide dismutase. XXVI International Horticultural Congress and Exhibition, Toronto, Canada, 11-17/08/2002. Libro de resúmenes, International Society for Horticultural Science, pp 137-138.
 126. Wang Y., Wisniewski M., Meilan R., Fuchigami L., Webb R. (2002-b) "Improved tolerance to salinity and heat temperature in transgenic tomato overexpressing ascorbate peroxidase (APX)". XXVI International Horticultural Congress and Exhibition, Toronto, Canada, 11-17/08/2002. Libro de resúmenes, International Society for Horticultural Science, pp 139.
 127. Werblow S. (1999) "Favorable film". *Oregon Farmer-Stockman* Abril: 8-10.
 128. Westwood M.N. (1982) "Fruticultura de zonas templadas". Ed. Española, ED. Mundi-Prensa, Madrid, España, pag. 461.
 129. Williams K. (1993) "Use of evaporative cooling for enhancing apple fruit quality". *Good Fruit Grower*, August: 23-27.
 130. Wilton, J. (1994) "Managing the sunburn problem". *The Orchardist*, Noviembre:19-21.
 131. Wisniewski M., Fuchigami L., Wang Y., Srinivasan CH., Norelli J. (2002) "Overexpression of a cytosolic ascorbate peroxidase gene in apple improves resistance to heat stress". XXVI International Horticultural Congress and Exhibition, Toronto, Canada, 11-17/08/2002. Libro de resúmenes, International Society for Horticultural Science, pp 147.
 132. Woolf A., Wexler A., Prusky D., Kobilier E., Lurie S. (2000) "Direct sunlight influences postharvest temperature responses and ripening of five avocado cultivars". *Journal of the American Society of Horticultural Science* 125: 370-376.
 133. Wünsche J.N., Greer D.H., Palmer J.W., Lang A., McGhie T. (2001) "SUNBURN – THE COST OF A HIGH LIGHT ENVIRONMENT". *Acta Horticulturae* (ISHS) 557:349-356.
 134. Wünsche J.N., Lombardini L., Greer D.H., Palmer J.W., Wolf A. B. (2002) "Surround particle film applications-effects on whole canopy physiology of apple". 26th International Horticultural Congress (IHC2002), International Society for Horticultural Science, American Society for Horticultural Science. Toronto, Canadá, 11-17 August, 2002. On-site Program: 372-373.
 135. Wünsche J.N., Palmer J.W. (1997) " Portable Through-flow Cuvette System for Measuring Whole-canopy Gas Exchange of Apple Trees in the Field". *HortScience*

32: 653-658.

136. Xiaozhong L., Bingru H. (2000) "Heat Stress Injury in Relation to Membrane Lipid Peroxidation in Creeping Bentgrass". *Crop Science* 40:503-510
137. Xu Q. y Huang B., (2004) "Antioxidant metabolism associated with summer leaf senescence and turf quality for creeping bentgrass". *Crop Science* 44: 553-560.
138. Yuri J.A., Vásquez J., Vásquez J.L., Torres C. (1996) "Golpe de sol – la experiencia chilena". En: Coloquio en Pomaceas, Centro de Pomaceas, Universidad de Talca, Chile. 75-101.
139. Yuri J.A., Torres C., Bastías R., Neira A. (2000-a) "Golpe de sol en manzanas. Factores inductores y respuestas bioquímicas". *AgroCiencia* 16(1): 23-32.
140. Yuri J.A., Torres C., Vásquez J. (2000-b) "Golpe de sol en manzanas. Evaluación del daño y métodos de control". *AgroCiencia* 16(1): 13-21.
141. Zhang X., Schmidt R.E. (2000) "Application of trinexapac-ethyl and propiconazole enhances superoxide dismutase and photochemical activity in creeping bentgrass". *Journal of the American Society of Horticultural Science* 125: 47-51.
142. Zhao H., Dai T., Jing Q., C. (2007) "Leaf senescence and grain filling affected by post-anthesis high temperature in two different wheat cultivars". *Plant Growth Regulation* 51(2). Published online, Springer Science+Business Media B.V.2006