



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
MAGISTER EN HORTICULTURA**

**CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DEL DAÑO POR SOL EN
MANZANAS**

Álvaro Iván Sepúlveda León

TESIS DE GRADO

**Presentada a la Universidad de Talca como parte de los requisitos para optar
al grado de**

MAGISTER EN HORTICULTURA

**TALCA-CHILE
2015**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



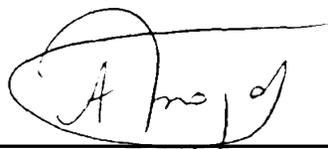
Talca, 2022

APROBACIÓN:



Profesor guía:

Ph.D. Carolina Torres del Campo
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca



Profesor informante:

Dra. M. Alejandra Moya León
Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología
Universidad de Talca

ÍNDICE

I.	Resumen	4
II.	Introducción	8
III.	Capítulo I “Evolución del sistema antioxidante enzimático y no enzimático en piel de manzana durante el desarrollo de daño por sol en el árbol”	13
	Resumen	13
	1. Introducción	15
	2. Materiales y métodos	16
	3. Resultados y discusión	20
	4. Conclusiones	32
	5. Referencias	33
IV.	Capítulo II “Capacidad de ambientación de frutos de manzanos expuestos repentinamente a la radiación solar directa en el árbol”	36
	Resumen	36
	1. Introducción	37
	2. Materiales y métodos	38
	3. Resultados y discusión	39
	4. Conclusiones	49
	5. Referencias	49
V.	Conclusiones finales	52

I. RESUMEN

El daño por sol constituye uno de los principales descartes de las manzanas de exportación chilenas, que en cultivares sensibles como Fuji puede afectar al 40% de la producción. Es causado por exposición del fruto en el huerto a alta radiación solar directa y alta temperatura. La energía solar excedente que incide sobre el tejido desencadena una proliferación de las especies reactivas de oxígeno (estrés foto-oxidativo). Estas pueden reaccionar con componentes celulares, causando muerte del tejido. La planta las enfrenta mediante diversos mecanismos, por un lado a través de la neutralización de las especies reactivas mediante el ciclo de óxido-reducción del ascorbato-glutatión, y por otro, a través de acumulación de compuestos, principalmente fenólicos, que absorben el exceso de radiación. Cambios en los metabolitos, enzimas y demás compuestos involucrados en los sistemas defensivos frente a condiciones de elevada radiación y temperatura, ofrecerían una mejor relación en cuanto al desarrollo del daño, sensibilidad varietal, así como a mejorar su control. Para caracterizar estos cambios, se marcaron frutos de los cultivares Royal Gala y Red Fuji en la temporada 2010/11, en un huerto comercial ubicado en el sector de San Clemente, Chile. Periódicamente, a partir de los 66 días después de plena flor, se recolectó piel con diferente exposición solar directa: expuesto y no expuesto; y diferente nivel de daño por sol: leve, moderado y severo (necrótico). En estas muestras de piel se determinaron los niveles de ascorbato y glutatión, actividad y expresión de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión. Además, se cuantificaron fenoles totales y específicos, clorofilas, carotenos y azúcares específicos. El 44% de los frutos de Gala llegaron con algún nivel de daño por sol a cosecha, y sólo el 2% mostró daño severo. En Fuji, el 75% registró daño por sol a cosecha y el 50% de los frutos tenía daño severo. El contenido de ascorbato total resultó muy variable en ambos cultivares, a través de la temporada. Piel expuesta sin daño de Gala mostró una disminución del contenido de ascorbato total con el crecimiento del fruto, y fue la que registró mayor actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa. En general, las secciones con daño por sol mostraron baja actividad enzimática y los transcritos de las enzimas antioxidantes resultaron mayores en la piel expuesta al sol (sin daño por sol) que en la no expuesta, dando cuenta de la aclimatación y posterior sobrepaso de ROS y daño oxidativo. El nivel de fenoles totales fue mayor en el tejido con daño por sol y en la piel expuesta sin daño que en aquella no expuesta al sol. Los azúcares específicos mostraron una propensión a mayor contenido en piel con daño por sol. Las clorofilas no mostraron una tendencia en relación a la exposición solar de la piel, pero sí a disminuir con el crecimiento del fruto. En Royal Gala se registró un mayor contenido de carotenos en piel con daño por sol en comparación a piel sin daño.

Por otro lado, durante la misma temporada, en dos ocasiones (81 y 114 días después de plena flor), se realizó una exposición repentina a radiación solar directa de frutos del interior del árbol, sin ambientación a condiciones de alta luminosidad. Se midieron los cambios en los mecanismos de protección periódicamente hasta diez días después de la exposición repentina. En Gala, la piel del fruto expuesta repentinamente a estrés foto-oxidativo mostró un aumento del contenido de ascorbato total, luego de la exposición y hasta una semana después. Las clorofilas, en ambos cultivares, registraron una caída en piel expuesta repentinamente. En menor medida, los carotenos. El contenido de las quercetinas

glicosiladas aumentó con la exposición repentina. Sin embargo, este aumento fue más alto en la primera fecha de exposición. Ello también se registró con el contenido de ácido clorogénico, catequina y epicatequina. El sistema antioxidante ascorbato-glutación constituiría una respuesta inmediata a la proliferación de las especies reactivas de oxígeno, que perdería su eficacia con la persistencia de esta carga energética por tiempo prolongado. La acumulación de fenoles, principalmente quercetinas, y carotenos constituirían un mecanismo de protección en el largo plazo o ambientación. Una menor acumulación de fenoles podría potenciar el riesgo por desarrollar daño por sol, a medida que los frutos crecen en la temporada.

Palabras clave: ascorbato, glutación, estrés foto-oxidativo, fenoles, pigmentos, Fuji, Gala.

Abreviaturas:

ADN	=Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	=Análisis de varianza
AO	=Ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3)
APX	=Ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11)
AsA	=Ascorbato reducido
DDPF	=Días después de plena flor
DHA	=Dehidroascorbato
DHAR	=Dehidroascorbato reductasa (EC 1.8.5.1)
DTT	=Ditiotreitol
EAC	=Equivalentes de ácido clorogénico
EDTA	=Ácido etilendiaminotetracético
EXP	=Piel expuesta a radiación solar directa
EXP-R	=Piel expuesta repentinamente a radiación solar directa
GR	=Glutación reductasa (EC 1.6.4.2)
GSH	=Glutación reducido
GSSG	=Glutación oxidado
HEPES	=Ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico
HPLC	=Cromatografía líquida de alta eficacia
HR	=Humedad relativa
MDHA	=Monodehidroascorbato
MDHAR	=Monodehidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4)
Mild	=Daño por sol leve
Mod	=Daño por sol moderado
NADH	=Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	=Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
Non-EXP	=Piel no expuesta a radiación solar directa
No EXP	=Piel no expuesta a radiación solar directa
PCR	=Reacción en cadena de polimerasa
PF	=Peso fresco

PVPP	=Polivinilpirrolidona
Q	=Quercetina
RNA	=Ácido ribonucleico
ROS	=Especies reactivas de oxígeno
Sev	=Daño por sol severo
TSF	=Temperatura de la superficie del fruto
UV-A	=Radiación ultravioleta, longitud de onda entre 315-400 nm
UV-B	=Radiación ultravioleta, longitud de onda entre 280-315 nm

ABSTRACT

Sunburn is a major fruit defect decreasing exportable Chilean apples. In several cultivars, such as Fuji, may affect up to 40% of total production. Sunburn is caused by high solar irradiance and elevated temperature environments. The excess energy in the exposed sections of the fruit causes a proliferation of reactive oxygen species (ROS) or photo-oxidative stress. Those can react with cellular component causing cell death. Plant responses with different anti stress mechanisms in order to neutralize ROS: the ascorbate-glutathione cycle and accumulation of phenolic compounds and pigments. Changes in compounds and enzymes of antioxidant mechanisms when fruit are exposed to high solar radiation and high temperature environment will offer a better understood of sunburn development, varietal sensitive, and its control. To characterize changes in different antioxidant systems, Royal Gala and Red Fuji apples were labeled during 2010/11 growing season, in a commercial orchard (San Clemente, Chile) exposed to sun radiation but without sunburn, no exposed to sunlight; and with different sunburn intensity: mild, moderate and severe sun damage (necrotic peel). Every 10-15 days since 66 days after bloom, fruit peels with different sun exposure were collected. Ascorbate and glutathione as well as, expression and activity of ascorbate-glutathione cycle enzymes, total and specific phenolic compounds, chlorophylls, carotenoids, as well as, specific carbohydrate compounds were determined in peel extracts. Sunburn incidence in Gala was 44%, with only 2% in severe category, and in Fuji, 75% with 50% of total fruits being severe intensity. Ascorbate content was variable for both cultivars throughout the growing season. Total ascorbate on sun exposed peel decreased during the growing season, and ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities were the higher in sun exposed sections. The sunburned sections of the fruit recorded low enzymatic activities. The enzyme transcripts were higher in sun exposed peel without sun damage than unexposed peel. Total phenolic compounds were higher in exposed peel with and without sunburn than unexposed peels. Specific carbohydrates showed an increase as sunburn appeared. Chlorophylls content decreased as the fruit grown, but did not vary among sun exposure. Royal Gala recorded the highest carotenoid level in sunburned peel.

On the other hand, in two times during 2010/11 growing season: 81 and 114 days after bloom, a sudden solar exposure of unexposed fruit was carried out. Every 2-3 days until day 10 after sudden exposure, changes in antioxidants mechanisms were evaluated in peel

samples from sections with different sun exposure. Gala peel showed an increase of total ascorbate content after sudden exposure. Chlorophylls and carotenoid content decreased in both cultivars. In contrast, quercetins, chlorogenic acid, catechin and epicatechin content increased after sudden exposure on sun exposed peel. Ascorbate-glutathione antioxidant system appears to be a short term response mechanism against photo-oxidative stress. On the other hand, phenolic compounds accumulation, lead by quercetins and carotenoids, appears to be a long term protection or key for long term acclimation.

Keywords: ascorbate, glutathione, photo-oxidative stress, phenolic compounds, pigments, Fuji, Gala.

II. INTRODUCCIÓN

En 2012, la producción mundial de manzanas sobrepasó los 76 millones de toneladas, de los cuales más de 8 millones fueron exportados (FAOSTAT, 2014). Chile participó con una producción de 1.6 millones de toneladas, de las que exportó el 48% (752 mil toneladas), situándolo entre los 10 principales productores y entre los cinco mayores exportadores de manzanas. A la industria de procesado se destinaron 680 mil toneladas (44% de la producción), y al mercado interno 125 mil toneladas (8%; González, 2013).

El descarte de manzana chilena para exportación en la línea de embalado varía entre 24-35% (Villarroel, 2000; Frías, 2006). Según estos autores, entre las principales causas de descarte, figuran: daño por impacto y heridas (33-36%), daño por sol (18-25%), falta de color (5-14%), desórdenes fisiológicos (5-17%). El daño por impacto y heridas se producen en el manipuleo de la fruta (cosecha, transporte o proceso y embalado); la falta de color puede atribuirse a la cosecha o a manejos de huertos que tiendan a vigorizar los árboles. Sin embargo, la fruta dañada por sol, tiene su origen en las condiciones climáticas que persistieron durante el crecimiento del fruto, así como en factores productivos que favorecerían la exposición de la fruta a estrés ambiental.

El daño por sol es una alteración fisiológica que afecta la piel del fruto expuesta al sol, cuyos síntomas van desde una decoloración a una pigmentación parda, pudiendo llegar a una necrosis del tejido (Bergh *et al.*, 1980; Wünsche *et al.*, 2001). Es consecuencia del exceso de energía en la piel del fruto, por alta exposición a radiación solar directa (Woolf y Ferguson, 2000). Baja humedad relativa y alto estrés hídrico incrementarían el riesgo a desarrollar este daño (Lakso, 1994; Woolf y Ferguson, 2000; Yuri *et al.*, 2004). Otros factores determinantes son el cultivar y las condiciones productivas: vigor del árbol, orientación de la hilera, carga frutal, entre otros (Wünsche *et al.*, 2001; Yuri *et al.*, 2004). En Fuji, se ha encontrado hasta un 40% de la fruta con síntoma de daño por sol en el huerto (Yuri *et al.*, 2000; Wand *et al.*, 2006).

El daño por sol ocurre frecuentemente en lugares con veranos cálidos y secos, durante la temporada de crecimiento del fruto (Barber y Sharpe, 1971; Rabinowitch *et al.*, 1974; Torres *et al.*, 2006). En dichos ambientes de alta radiación solar y temperatura, el aparato fotosintético no es capaz de disipar el exceso de energía incidente, proliferando la cantidad de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas son formas altamente inestables del oxígeno, con al menos un electrón impar, entre las que se incluyen: superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos ($\cdot OH$). Si bien las ROS se producen en forma normal durante el metabolismo celular y son neutralizadas por mecanismos antioxidantes de la célula, en condiciones de estrés abiótico pueden incrementarse y reaccionar con los componentes celulares causando su muerte (Taiz y Zeiger, 2010; Foyer y Noctor, 2011). Un ambiente de alta radiación solar que favorece el aumento de ROS (estrés foto-oxidativo), lo cual conduciría a la aparición de los síntomas de daño por sol en la piel del fruto (Wünsche *et al.*, 2001; Ma y Cheng, 2003; Torres *et al.*, 2006).

El principal mecanismo de protección frente a las ROS, es el ciclo de óxido-reducción del ascorbato-glutatión, metabolitos utilizados por la planta para neutralizar el poder oxidante de las ROS en una serie de reacciones enzimáticas (Noctor y Foyer, 1998). Las enzimas

involucradas en él son: ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4), dehidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1) y glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2).

Según Noctor y Foyer (1998), el ciclo consiste en la siguiente serie de reacciones de oxidoreducción: Las ROS superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) son reducidas en H_2O , utilizando como sustrato el ascorbato (AsA). En esta reacción se producen los compuestos oxidados de ascorbato: monodehidroascorbato (MDHA) y dehidroascorbato (DHA). En la siguiente reacción, éstos son reducidos a AsA, directamente a partir de MDHA (requiriendo NADPH y mediada por MDHAR), o desde DHA, utilizando glutatión en su forma reducida (GSH) como sustrato (reacción operada por DHAR). En esta última alternativa, se genera glutatión disulfuro, en su forma oxidada (GSSG; Noctor y Foyer, 1998). Por último, el glutatión se convierte en su forma reducida, en una reacción mediada por GR (utilizando NADPH). De esta forma, ascorbato y glutatión son continuamente reutilizados (Noctor y Foyer, 1998).

Metabolitos y enzimas del ciclo ascorbato-glutatión han sido relacionados con daño por sol en frutos de tomate (Torres *et al.*, 2006) y manzanas (Andrews y Johnson, 1996; Ma y Cheng, 2003, 2004). En este sentido, se ha descrito mayores niveles de los metabolitos y de actividad enzimática del ciclo en piel de fruta con daño por sol que en piel sana (Chen *et al.*, 2008). Alto contenido de ascorbato y glutatión, con una alta proporción de sus formas reducidas, y alta actividad de las enzimas del ciclo, han sido reportados en piel de manzanas expuestas al sol, en relación a piel no expuesta (Ma y Cheng, 2003). Frutos que han crecido en la periferia del árbol, con exposición solar permanente, han desarrollado un sistema de protección anti estrés foto-oxidativo más eficiente que aquellos que han crecido al interior del árbol (Ma y Cheng, 2003). Ello evidenciaría una adaptación de la planta para desintoxicarse de la acumulación de ROS en el tejido expuesto al sol (Ma y Cheng, 2003). Por el contrario, el fruto no ambientado a la exposición solar se vuelve muy sensible a desarrollar daño por sol, una vez que es expuesto repentinamente al sol (Wünsche *et al.*, 2001).

Otros mecanismos protectores frente a estrés foto-oxidativo incluyen la acumulación de compuestos fenólicos. Los fenoles son un grupo diverso provenientes de la vía del ácido shikímico y en su estructura contienen un grupo hidroxilo en un anillo aromático (Taiz y Zeiger, 2010). Es discutida la función de fenoles como agentes neutralizadores de radicales libres, pero si es convenida su función foto protectora, al absorber la radiación UV-B y visible (Solovchenko y Merzlyak, 2008). Frutos creciendo en una posición del árbol con alta exposición a la radiación solar, mostraron mayor contenido de fenoles que aquellos del interior del árbol (Awad *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012; González-Talice *et al.*, 2013). La síntesis de compuestos fenólicos ha sido estimulada en frutos expuestos repentinamente a radiación solar directa (Sun *et al.*, 2014). En piel de fruto con daño por sol se ha descrito acumulación de fenoles (Felicetti y Schrader, 2009; Yuri *et al.*, 2010). Entre los fenoles más comunes en frutos de manzanos, se cuentan los flavonoides: quercetinas glicolisadas, catequina y epicatequina, así como antocianinas (Awad *et al.*, 2000).

Otros cambios asociados como respuesta a estrés foto-oxidativo están relacionados a cambios en el contenido de clorofila y carotenos. Se ha reportado pérdida de clorofila en piel con daño por sol (Wünsche *et al.*, 2001; Yuri *et al.*, 2010; Tartachnyk *et al.*, 2012). Así,

se describieron bajos niveles de clorofila *a* y *b*, y antocianinas con el incremento de la intensidad del síntoma de daño por sol en manzanas Fuji (Felicetti y Schrader, 2008). Por otro lado, se ha descrito un aumento del nivel de carotenos en frutos dañados por sol (Wünsche *et al.*, 2001; Ma y Cheng, 2004; Solovchenko *et al.*, 2006).

La degradación de clorofila, debido al daño por sol en manzanas conduce a bajos valores de los parámetros asociados a la fluorescencia, tal como, Fo, Fm, y Fv/Fm (Wünsche *et al.*, 2001; Merzlyak *et al.*, 2002; Wand *et al.*, 2008).

Otros cambios se han observado en la fruta con daño por sol asociados a su calidad, como el aumento de la firmeza y sólidos solubles en la sección con síntoma (Racskó *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2013). Torres *et al.* (2013) vincularon estos cambios, junto a deformación del fruto y producción temprana de etileno, a una respuesta asociada a un estrés hídrico localizado, producto del estrés foto-oxidativo y térmico que sufre la fruta durante el desarrollo del daño por sol.

HIPOTESIS

El daño por sol se desarrolla debido a la pérdida de capacidad antioxidante de los tejidos directamente expuestos al sol en la planta, sometidos a estrés foto-oxidativo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar cambios en el sistema antioxidante de los tejidos durante el desarrollo del daño por sol en manzanas.

Objetivos Específicos

1. Determinar los cambios en los mecanismos antioxidantes en tejido de fruta expuesta y no expuesta directamente a la radiación solar, en los cultivares Gala y Fuji.
2. Determinar la capacidad de ambientación bioquímica antioxidante de frutos expuestos repentinamente a la radiación solar directa en el árbol en los cvs. Gala y Fuji.

REFERENCIAS

- Awad, M.A., de Jager, A., van Westing, L.M. 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in Apple fruit: characterisation of variation. *Sciemntia Horticulturae* 83: 249-263.
- Awad, M.A., Wagenmakers, P.S., de Jager, A. 2001. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. *Scientia Horticulturae* 88: 289-298.

Barber, H.N., Sharpe, P.J.H. 1971. Genetics and physiology of sunscald of fruits. *Agricultural Meteorology* 8: 175-191.

Bergh, O., Franken, J. van Zyl, E.J., Kloppers, F., Dempers, A. 1980. Sunburn in apple: Preliminary results of an investigation conducted during 1978/1979 season. *Deciduous Fruit Grower* 30: 8-22.

Chen, L-S., Li, P., Cheng, L. 2008. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta* 228:745-756.

Felicetti, D.A., Schrader, L.E. 2008. Changes in pigment concentration associated with the degree of sunburn browning of 'Fuji' apple. *Journal of American Society of Horticultural Science* 133: 27-34.

Felicetti, D.A., Schrader, L.E. 2009. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. II. Phenolics. *Plant Science* 176: 84-89.

Foyer, C.H., Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155: 2-18.

Frías, M. Aspectos relevantes para el éxito productivo en huertos de manzanos en el 2006. Seminario Pomáceas, ASOEX, 11 y 12 de octubre de 2006, Santiago de Chile.

González, C. 2013. Chile: Producción y proyecciones de la oferta de duraznos, manzana, uva, pera y berries. Encuentro 2013 Industria de las Conservas ChileAlimentos, 5 de septiembre de 2013, Santiago de Chile.

González-Talice, J., Yuri, J.A., del Pozo, A. 2013. Relations among pigments, color and phenolic concentrations in the peel of two Gala Apple strains according to canopy position and light environment. *Scientia Horticulturae* 151: 83-89.

Hernandez, O., Torres, C.A., Moya-León, M.A., Opazo, M.C., Razmilic, I. 2014. Roles of the ascorbate-glutathione cycle, pigments and phenolics in postharvest 'sunscald' development on 'Granny Smith' apples (*Malus domestica* Borkh.). *Postharvest Biology and Technology* 87: 79-87.

Lakso, A.N. 1994. Apple. pp 3-42. En: *Handbook of Environmental Physiology of Fruits Crops*. Vol. 1, Temperate Crops. B. Schaffer y P.C. Andersen (eds). CRC Press, Inc. 358 p.

Li, P., Ma, F., Cheng, L. 2012. Primary and secondary metabolism in the sun-exposed peel and shaded peel of apple fruit. *Physiologia Plantarum* 148: 9-24.

Ma, F., Cheng, L. 2003. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophylls cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Science* 165: 819-827.

Ma, F., Cheng, L. 2004. Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophylls cycle and the ascorbate-glutathione cycle. *Plant Science* 166: 1479-1486.

Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E., Chivkunova, O.B. 2002. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 679-684.

Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:249-79.

Rabinowitch, H.D., Kedar, N., Budowski, P. 1974. Induction of sunscald damage in tomatoes under natural and controlled conditions. *Scientia Horticulturae* 2: 265-272.

- Racskó, J., Szabó, Z., Nyéki, J. 2005. Importance of the supraoptimal radiance supply and sunburn effects on apple fruit quality. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 111-114.
- Solovchenko, A.E., Avertcheva, O.V., Merzlyak, M.N. 2006. Elevated sunlight promotes ripening-associated pigment changes in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 40: 183-189.
- Solovchenko, A.E., Merzlyak, M.N. 2008. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 719-737.
- Sun, S., Xin, L., Gao, H., Wang, J., Li, P. 2014. Response of phenolic compounds in 'Golden Delicious' and 'Red Delicious' apple peel to fruit bagging and subsequent sunlight re-exposure. *Scientia Horticulturae* 168: 161-167.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 782 p.
- Tartachnyk, I., Kuckenberger, J., Yuri, J.A., Noga, G. 2012. Identifying fruit characteristics for non-invasive detection of sunburn in apple. *Scientia Horticulturae* 134: 108-113.
- Torres, C.A., Andrews, P.K., Davies, N.M. 2006. Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *Journal of Experimental Botany* 57: 1933-1947.
- Torres, C.A., Sepulveda, A., Gonzalez-Talice, J., Yuri, J.A., Razmilic, I. 2013. Fruit water relations and osmoregulation on apples (*Malus domestica* Borkh.) with different sun exposures and sun-injury levels on the tree. *Scientia Horticulturae* 161: 143-152.
- Villarreal, M.C. 2000. Evaluación de los principales problemas de pre y post cosecha que afectan a las manzanas en Chile: Estudio de casos. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Chile. 37 p.
- Wand, S.J.E., Theron, K.I., Ackerman, J., Marais, S.J.S. 2006. Harvest and post-harvest apple fruit quality following applications of kaolin particle film in South African orchards. *Scientia Horticulturae* 107: 271-276.
- Wand, S.J.E., van der Dool, K., Smit, A., Steyn, W.J. 2008. Heat injury thresholds in apple measured using chlorophyll fluorescence are influenced by orchard heat reduction technologies. *Acta Horticulturae* 772: 273-277.
- Woolf, A.B., Ferguson, I.B. 2000. Postharvest responses to high fruit temperatures in the field. *Postharvest Biology and Technology* 21: 7-20.
- Wünsche, J.N., Greer, D.H., Palmer, J.W., Lang, A., McGhie, T. 2001. Sunburn—The cost of a high light environment. *Acta Horticulturae* 557: 349-356.
- Yuri, J.A., Torres, C., Vásquez, J. 2000. Golpe de sol en manzanas. I. Evaluación del daño y métodos de control. *AgroCiencia* 16: 13-21.
- Yuri, J.A., Lepe, V., Moggia, C., Bastías, R., Bertschinger, L. 2004. Sonnenbrand beim apfel. *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau* 8: 7-10.
- Yuri, J.A., Neira, A., Quilodran, A., Razmilic, I., Motomura, Y., Torres, C., Palomo, I. 2010. Sunburn on apples is associated with increases in phenolic compounds and antioxidant activity as a function of the cultivar and areas of the fruit. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8: 920-925.
- Yuri, J.A. 2010. Daño por sol en manzanas. *Revista de Fruticultura* 8: 4-15.

III. CAPITULO I

Evolución del sistema antioxidante enzimático y no enzimático en piel de manzana durante el desarrollo de daño por sol en el árbol.

RESUMEN

El daño por sol es una de las principales causas de descarte de exportación de las manzanas chilenas y es causado por veranos con alta radiación solar y temperatura. Este ambiente induce la proliferación de especies reactivas de oxígeno, que reaccionan con componentes celulares causando muerte celular. El principal mecanismo de protección frente a ello es el ciclo antioxidante ascorbato-glutación. Éste comprende una serie de reacciones enzimáticas de óxido-reducción que neutralizan el poder oxidativo de las especies reactivas de oxígeno. Otros mecanismos defensivos involucran la acumulación de pigmentos y fenoles, compuestos que absorben radiación UV y visible. Para caracterizar los cambios metabólicos en estos sistemas protectores, se marcaron frutos de manzanos Royal Gala y Red Fuji creciendo en condiciones favorables para desarrollo de daño por sol durante la temporada 2010/11, en San Clemente, Chile. A partir de los 66 días después de plena flor, cada 15 días se registró el porcentaje de frutos con daño leve, moderado y severo (necrótico). Así también, se recolectó piel de fruto con daño por sol (leve, moderado y severo), expuesta a luz solar directa sin daño y no expuesta. En éstas se determinó el contenido de ácido ascórbico, glutación, actividad de las enzimas del ciclo (APX, DHAR, MDHAR y GR). Por otro lado, se le determinaron fenoles totales y específicos (ácido clorogénico, catequina, epicatequina y quercetinas glicosiladas), azúcares totales y específicos (sorbitol, fructosa, glucosa y sacarosa), clorofilas y carotenoides. El 44% de los frutos de Royal Gala llegaron con algún nivel de daño por sol a cosecha y el 2% mostró daño severo. En Fuji, el 75% registró daño por sol a cosecha y el 50% de los frutos tenía daño severo. El contenido de ácido ascórbico y ascorbato total fue muy variable en ambos cultivares. El contenido de este último en piel expuesta al sol sin daño de Gala disminuyó con el desarrollo del fruto hasta su cosecha. En la piel de Gala con daño por sol se registró una mínima cantidad de estos metabolitos. En Red Fuji, la piel expuesta registró un contenido mayor a las otras secciones en los últimas fechas de muestreo (157 y 171 días después de plena flor). Por otro lado, los niveles de glutación fueron muy fluctuantes. En relación a las enzimas del ciclo, en la piel expuesta sin daño de Royal Gala se registró mayor contenido de APX y GR a los 109 días después de plena flor. Las secciones con daño por sol mostraron baja actividad enzimática. Los transcritos de las enzimas, en general fueron mayores en la piel expuesta al sol (sin daño por sol) que en la no expuesta. La piel con daño por sol mostró mayor expresión de DHAR en ambos cultivares. El nivel de fenoles totales fue mayor en la piel de las secciones con daño por sol, como en la piel expuesta sin daño en relación a la piel no expuesta a radiación solar. El contenido de los fenoles específicos: ácido clorogénico, catequina, epicatequina y quercetinas glicosiladas, no mostraron una tendencia determinada en Fuji, pero fueron mayores en las secciones con daño por sol de Gala. Los azúcares específicos mostraron propensión a mayor contenido en piel con daño por sol en ambos cultivares. Las clorofilas

a y *b* no mostraron una tendencia en relación a la exposición solar de la piel, pero sí a disminuir con el crecimiento del fruto. En cuanto a los carotenos α y β , se registró mayor contenido en piel con daño severo de Royal Gala, lo que podría evidenciar un atributo varietal frente al estrés foto-oxidativo. El sistema antioxidante ascorbato-glutación constituiría una respuesta inmediata a la proliferación de las especies reactivas de oxígeno, que perdería su eficacia con la persistencia de esta carga energética por tiempo prolongado. El aumento de los fenoles totales y carotenos constituirían un mecanismo de protección en el largo plazo.

Palabras clave: ascorbato, glutación, estrés foto-oxidativo, fenoles, pigmentos, Fuji, Gala.

1. INTRODUCCIÓN

Entre las causas de descarte de exportación de las manzanas chilenas en la línea de embalaje, un 18-25% corresponde a fruta con daño por sol (Villarreal, 2000; Frías, 2006). Factores determinantes son el cultivar y las condiciones productivas (Wünsche *et al.*, 2001; Yuri *et al.*, 2004). En Fuji, es posible encontrar hasta un 40% de la fruta con síntoma de daño por sol en el huerto (Yuri *et al.*, 2000a; Wand *et al.*, 2006).

El daño por sol es una alteración fisiológica que afecta la piel del lado del fruto expuesto al sol, cuyos síntomas van desde una decoloración a una pigmentación parda, e incluso puede llegar a un colapso y necrosis del tejido (Bergh *et al.*, 1980; Wünsche *et al.*, 2001).

El daño por sol tiene sus causas en una exposición del fruto, o una sección de éste, a radiación solar directa en un ambiente de elevada temperatura (T°), como ocurre en aquellos lugares de climas templados con estación seca durante la temporada de crecimiento (Barber y Sharpe, 1971; Rabinowitch *et al.*, 1974; Torres *et al.*, 2006).

En dichos ambientes de alta radiación solar y T° , el aparato fotosintético no es capaz de conducir o disipar el exceso de energía incidente, reaccionando con el oxígeno, proliferando así la cantidad de las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Éstas pueden causar daño oxidativo a los componentes celulares (Taiz y Zeiger, 2010; Foyer y Noctor, 2011). El estrés oxidativo, producto de un ambiente de alta radiación solar (foto-oxidativo) y térmico, conduce a la aparición de los síntomas de daño por sol en el fruto (Wünsche *et al.*, 2001; Ma y Cheng, 2003; Torres *et al.*, 2006).

La planta enfrenta el poder oxidante de los ROS con diferentes mecanismos de defensa antioxidante. El principal es el ciclo de óxido-reducción del ascorbato-glutatión, metabolitos usados por la planta para neutralizar los ROS en una serie de reacciones enzimáticas (Noctor y Foyer, 1998). Las enzimas involucradas en él son: ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4), dehidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1) y glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2).

Los ROS superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) son reducidos en H_2O , utilizando como sustrato el ascorbato (AsA), produciendo los compuestos oxidados de éste: monodehidroascorbato (MDHA) y dehidroascorbato (DHA). Éstos, son reducidos a AsA, directamente desde MDHA, requiriendo NADPH (reacción mediada por MDHAR), o desde DHA, utilizando glutatión en su forma reducida (GSH) como sustrato (reacción operada por DHAR), generando glutatión disulfuro, en su forma oxidada (GSSG; Noctor y Foyer, 1998). Por último, el glutatión vuelve a su forma reducida, utilizando NADPH, reacción mediada por GR. De esta forma, ascorbato y glutatión son continuamente reutilizados (Noctor y Foyer, 1998).

Alto contenido de ascorbato y glutatión, con una alta proporción de sus formas reducidas, y alta actividad de las enzimas del ciclo, han sido reportados en piel de manzanas expuestas al sol, en relación a piel no expuesta (Ma y Cheng, 2003). Ello evidenciaría una ambientación de la planta para desintoxicarse de la alta generación de ROS en el tejido expuesto al sol. Del mismo modo, se han encontrado mayores niveles de estos metabolitos y actividad enzimática en piel con daño por sol que en piel sana (Chen *et al.*, 2008).

Por otro lado, en piel del fruto con daño por sol se ha descrito acumulación de fenoles, compuestos que absorben radiación UV-B, inductora de mutaciones del ADN y estrés

oxidativo (Felicetti y Schrader, 2008; Yuri *et al.*, 2010), así como se ha reportado pérdida de clorofila en ella (Wünsche *et al.*, 2001; Yuri *et al.*, 2010; Tartachnyk *et al.*, 2012).

Se han observado otros cambios en la fruta con daño por sol asociados a su calidad, como el aumento de la firmeza y sólidos solubles en la sección con síntoma (Racskó *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2013). Torres *et al.* (2013) vincularon estos cambios, junto a deformación del fruto y producción temprana de etileno, a una respuesta asociada a estrés hídrico localizado, producto del estrés foto-oxidativo y térmico que sufre la fruta durante el desarrollo del daño por sol.

Dimensionar los cambios metabólicos del fruto expuesto a estrés foto-oxidativo durante su crecimiento en el árbol, podría ayudar a entender la regulación del mecanismo de defensa y la aclimatación del fruto, así como brindar nuevas alternativas para el control del daño por sol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Material vegetal*

En la temporada 2010/2011, se marcaron frutos en manzanos (*Malus domestica* Borkh.), cultivares Royal Gala y Red Fuji, plantados en 1992 y conducidos en Solaxe, en un huerto comercial de la zona de San Clemente, Región del Maule, Chile (35° 30' L.S.; 71° 28' L.O.; 200 m.s.n.m.). La fecha de plena flor ocurrió el 4 de octubre de 2010 para ambos cultivares. Se seleccionaron frutos en la periferia del árbol, con exposición poniente, la más propensa al desarrollo del daño. Periódicamente (≈ 15 días), a partir de los 66 días después de plena flor (DDPF), y hasta los 133 DDPF en Gala y 171 DDPF en Fuji, se muestreó tejido para las determinaciones bioquímicas. Éste correspondió a piel de fruto con diferentes exposiciones a la radiación solar directa: lado expuesto al sol (EXP), lado no expuesto (Non-EXP), expuesto con daño por sol leve (Mild), moderado (Mod) y severo (Sev). Estas tres últimas categorías se recolectaron a partir de su aparición durante la temporada de crecimiento del fruto. El muestreo se realizó al mediodía y consideró entre 5-10 frutos por repetición y cinco repeticiones por condición.

2. *Evolución del daño por sol*

En el huerto se marcaron 45 frutos por cultivar y en cada fecha de muestreo se evaluó en ellos la incidencia y severidad de daño por sol, a partir de los 66 DDPF hasta los 133 DDPF en Gala y 171 DDPF en Fuji. La incidencia se cuantificó a través del porcentaje de frutos con daño por sol con respecto al total, y la severidad, como el porcentaje según categoría del daño por sol (Figura 1), por el total de frutos. Las categorías Leve y Moderado no involucran necrosis del tejido y la distinción entre ambas obedeció a criterios comerciales, según el cual la fruta con daño por sol moderado se considera descarte de exportación. El daño severo, también descarte, involucró la aparición de síntoma necrótico.



Figura 1. Categorías de daño por sol en Royal Gala (A) y Red Fuji (B), de izquierda a derecha: expuesto al sol sin síntoma (EXP), daño por sol leve (Mild), moderado (Mod) y severo (Sev).

3. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

En el huerto, una vez recolectado el fruto se extrajeron muestras de piel con ayuda de un escarpelo, siendo congeladas inmediatamente en N_2 líquido y luego almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Previo a las determinaciones bioquímicas, el tejido muestreado fue molido y pesado en frío.

3.1. Determinación de ascorbato y glutatión

Para las determinaciones de ascorbato y glutatión, 400 mg de tejido fresco congelado fue macerado con 1 mg PVPP y 3 mL 1 M $HClO_4$ y centrifugado a 12900 g por 10 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. En el sobrenadante obtenido se determinó ascorbato y glutatión. Para la determinación de ascorbato, a 400 μL de sobrenadante se le agregó 200 μL de buffer HEPES/KOH (pH 7.0) y K_2CO_3 hasta ajustar a pH 4-5. Para la determinación de glutatión, a 200 μL de sobrenadante se le agregó 100 μL de buffer HEPES/KOH (pH 7.0) y K_2CO_3 hasta ajustar a pH 6-7.

AsA y DHA fueron determinados por espectrofotometría en reacción cinética a 265 nm, con la adición de 1 unidad de ascorbato oxidasa (AO; EC 1.10.3.3; Sigma-Aldrich, US; Torres *et al.*, 2006). Para la determinación de DHA, 100 μL de extracto se incubó por 5 minutos en hielo con 50 mM DTT en buffer 0.1 M Na_2HPO_4 pH 7.5 previo a las determinaciones. GSH y GSSG fueron determinados por espectrofotometría, por medio de reacción cinética a 412 nm, con adición de 1 unidad de GR (Sigma-Aldrich, US; Torres *et al.*, 2006).

3.2. Actividad de enzimas antioxidantes

La extracción de las enzimas APX, DHAR, MDHAR y GR se realizó a partir de 0.5 g de piel y buffer 50 mM MES/KOH pH 6.0, 40 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, y 1 mM L-AsA. Se centrifugó a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos con 12900 g .

Para la determinación de APX, se preparó una mezcla de 10 μL con buffer 50 mM KH_2PO_4 pH 7.0, 250 μM L-AsA, y 10 μL de extracto. Se agregó 5 mM H_2O_2 para iniciar la reacción. Se monitorearon los cambios en la absorbancia en los 290 nm. La actividad fue calculada desde la tasa de reacción con un coeficiente de extinción de 2.8 mM^{-1} (Torres *et al.*, 2006).

Para la cuantificación de MDHAR, se preparó una mezcla de buffer 100 mM HEPES pH 7.6, 2.5 mM L-AsA, 250 μ M NADH, y 10 μ L de extracto. Se inició la reacción con 0.4 unidades de AO (Torres *et al.*, 2006).

DHAR. Se preparó una mezcla con buffer 50 mM HEPES pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM GSH, y 10 μ L de extracto. Se agregaron 0.2 mM DHA para iniciar la reacción. Se monitoreó la absorbancia por 3 minutos en los 340 o 265 nm. La actividad fue calculada en base a la tasa de reacción con un coeficiente de extinción de 3.3 mM^{-1} y 7.0 mM^{-1} para MDHAR y DHAR, respectivamente (Torres *et al.*, 2006).

GR. La mezcla a reaccionar incluyó buffer 50 mM HEPES pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 250 μ M NADPH y 10 μ L de extracto. Con 500 μ M GSSG se inició la reacción (Foyer y Halliwell, 1976). Se monitoreó la absorbancia en los 340 nm por 3 minutos. La actividad enzimática se calculó restando la tasa de reacción no enzimática a la tasa de actividad específica de GR con un coeficiente de 6.22 mM^{-1} .

3.3. Cuantificación de los transcritos de las enzimas antioxidantes mediante Real-Time PCR

Las muestras de piel en N_2 líquido fueron utilizadas para estas determinaciones. RNA total fue extraído de muestras de piel congelada (1-4 g), de acuerdo al método descrito por Gasic *et al.* (2004). La primera hebra de cDNA fue sintetizada de acuerdo a especificaciones del *kit* Fermentas. Para cada muestra biológica (condición de la piel o categoría de daño), se prepararon tres extracciones independientes de RNA. Para el análisis de *Real-Time* PCR de APX, DHA y DHAR se utilizaron los *primers* específicos descritos previamente por Zubini *et al.* (2007). Se utilizaron como normalizadores los genes EIF-4A (Eukaryotic initiation factor-4A) y EF-1 (Elongation factor 1). La reacción de amplificación fue realizada en un equipo Stratagene Mx3000P (Aligent Technologies). Los niveles de transcritos fueron calculados de acuerdo al método de Pfaffl (2001), y expresados en unidades arbitrarias \pm error estándar.

4. Determinación de fenoles totales y flavonoides específicos

Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método Folin-Ciocalteu (Cosetang y Lee, 1987), modificado por Yuri *et al.* (2010). Extractos de 0.1 mL de muestra en etanol (80%), fueron diluidos y mezclados con el reactivo Folin-Ciocalteu (0.5 mL). La mezcla se incubó por 5 minutos (20 °C), luego se le agregó Na_2CO_3 (10% w/v), e incubó nuevamente por 15 minutos (20 °C). Se midió absorbancia a 640 nm. La concentración de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido clorogénico ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF).

La determinación de los flavonoides específicos: catequina, epicatequina y quercetinas glicosiladas (Q-glucosido, xilosa, rutinósido, galactósido, ramnósido), se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para esto, se utilizó un extracto de 0.1 g de muestra en N_2 líquido en 1.0 mL etanol 80%. Luego, la muestra fue filtrada (20 μ L) e inyectada al sistema Smartline HPLC-PDA (Knauer, Berlín, DE), equipado con una columna Kromasil 100-5 C18 (250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m), y con detector de arreglo de fotodiodo (Hernandez *et al.*, 2014).

La fase móvil estuvo compuesta por ácido fórmico 1% en H_2O (solvente A), acetonitrilo 40% en H_2O (B), y acetonitrilo 100% (C). El gradiente de elución usado fue: 0-10 minutos: A (70%), B (30%), C (0%) a 1.0 mL minutos $^{-1}$; 45 minutos: A (25%), B (75%), C (0%) a 0.5 mL minutos $^{-1}$.

¹; 46 minutos: A (5%), B (75%), C (20%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 50 minutos: A (0%), B (70%), C (30%) a 0.5 mL minutos⁻¹; 52 minutos: A (0%), B (50%), C (50%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 55 minutos: A (70%), B (30%), C (0%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 58 minutos: A (70%), B (30%), C (0%) a 0.5 mL minutos⁻¹. Los flavonoides específicos fueron medidos a 256 nm, identificados según el estándar Merck (Darmstadt, DE) y expresados como $\mu\text{g g}^{-1}$ PF.

5. Determinación de azúcares

Las determinaciones de los carbohidratos específicos sorbitol, fructosa, glucosa y sacarosa se realizaron mediante HPLC, según un procedimiento modificado de Muir *et al.* (2009), utilizado por Torres *et al.* (2013). En resumen: las muestras fueron extraídas con agua (1:0.1). Luego de que fueran filtrados (tamaño de poro: 0.2 μm) fueron inyectados en un equipo Hitachi HPLC (Hitachi Inc., Tokio), con una bomba LaChrom Elite L-2130, un horno LaChrom Elite L-2300, y un detector Sedex 85, Sedere a 55 °C y 4 bares. La integración se realizó usando el programa Jasco LC-Net II/ADC (Jasco Co., Tokio). La separación fue perfeccionada por una columna LiChroCart 250-4,6 Purospher Star NH₂ (5 μm) a 13 °C usando los siguientes gradientes: (A) 0-10 min, acetonitrilo:agua (85/15 v/v) a una tasa de flujo de 1.0 ml min⁻¹. (B) 10-20 min, acetonitrilo:agua (80/20 v/v) a una tasa de flujo de 1.0 ml min⁻¹. (C) 20-22 min, acetonitrilo:agua (70/30 v/v) a una tasa de flujo de 1.5 ml min⁻¹. (D) 22-29 min, acetonitrilo:agua (70/30 v/v) a una tasa de flujo de 1.0 ml min⁻¹. (E) 29-32 min, acetonitrilo:agua (85/15 v/v) a una tasa de flujo de 1.0 ml min⁻¹. Estándares (Merck) para sorbitol, fructosa, glucosa y sacarosa fueron utilizados para su cuantificación.

6. Determinación de clorofilas y carotenoides

Las clorofilas y carotenoides totales fueron estimados utilizando las ecuaciones de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Aproximadamente 0.1 g de piel fue extraída en 2 mL de acetona 100% e incubada a 4 °C durante 12-18 h. Las muestras fueron centrifugadas por tres minutos (14000 g) y recolectado el sobrenadante. Los sobrenadantes o extractos fueron combinados y leídos espectrofotométricamente a 470, 645 y 662 nm.

Para clorofilas y carotenoides específicos, los extractos fueron filtrados (40 μL) e inyectados en un sistema Smartline HPLC-PDA (Knauer, Berlín, DE), equipado con una columna 100-5 C18 Kromasil de 250 mm \times 4.6mm \times 5 μm , con una precolumna de similares características. Los cromatogramas fueron monitoreados a 430, 450 y 470 nm. Para la fase móvil se utilizó acetonitrilo: metanol (90%:10%; Solvente A); etilacetato (90%:10%; B) y metanol (100%; C). El gradiente usado fue: 0-10 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 0.7 mL minutos⁻¹; 10-11 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 0.1 mL minutos⁻¹; 40 minutos: A (15%), B (85%), C (0%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 40-41 minutos: A (15%), B (15%), C (70%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 44 minutos: A (15%), B (15%), C (70%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 45 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 47 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 0.7 mL minutos⁻¹; 50 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 0.7 mL minutos⁻¹. Los resultados fueron expresados en mg por kg de muestra (PF). Los estándares para la identificación de los compuestos fueron provistos por Merck (Darmstadt, DE) y Extrasynthese (Lyon, FR).

7. Análisis estadístico

El muestreo de los frutos se realizó en el marco de un diseño completamente al azar. Considerando 3-5 repeticiones por condición de exposición. El efecto de la exposición (EXP, Non-EXP, Leve, Mod y Sev), sobre las variables medidas, se realizó mediante ANDEVA (SAS v9, SAS Institute, NC), en cada fecha de muestreo. En caso de existir diferencias estadísticas se procedió a realizar una separación de medias de acuerdo al *test* de Tukey ($p \leq 0.05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Evolución del daño por sol

Las condiciones ambientales que causan el desarrollo de daño por sol: temperatura máxima y radiación solar durante el desarrollo del ensayo, se muestran diariamente en la Figura 2. En ella, se indican con flechas las fechas de muestreo del tejido y evaluación de daño por sol, en términos de días después de plena flor (DDPF). La fecha de plena flor se registró el 4 de octubre de 2010, para ambos cultivares. La cosecha de Royal Gala ocurrió a los 133 DDPF y la de Red Fuji a los 171 DDPF. Durante el ensayo (66 a 171 DDPF), se registraron los siguientes valores promedio: temperatura máxima de 27.9 °C; radiación solar total de 24.1 MJ m⁻²; y humedad relativa (HR) mínima de 32.7%. Hubo 39 días con temperatura máxima (Tmax) igual o mayor a 30 °C, es decir el 39% de los días.

Yuri *et al.* (2000b), reprodujeron los síntomas de daño por sol con exposición de radiación infrarroja por cinco horas sobre fruta que alcanzó 42 °C. Así, en huertos de la zona central de Chile, con veranos cálidos y secos, se propuso que el daño aparecería cuando la temperatura de la superficie del fruto (TSF), excediera los 37 °C por cinco horas continuas, puesto que la exposición prolongada a alta radiación solar aceleraría los síntomas (Yuri, 2010).

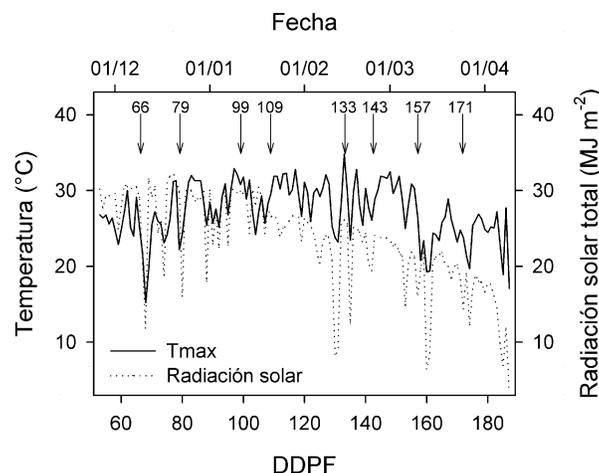


Figura 2. Temperatura máxima (Tmax) y radiación solar incidente diaria durante el verano 2010/11. Flechas indican fechas de muestreo del ensayo en días después de plena flor (DDPF).

La evolución de la aparición del daño por sol en los frutos marcados se muestra en la Figura 3. En Royal Gala, más del 80% de los frutos con exposición disponible para desarrollar daño

por sol, se mantuvo sin síntomas hasta los 99 DDPF (Figura 3A). A partir de los 109 DDPF, aumentó la proporción de frutos con daño, hasta la cosecha (133 DDPF), momento en que el 44% de la fruta mostró algún nivel de daño (Figura 3A). La incidencia de daño por sol en Fuji se incrementó linealmente, desde un 15% en los 66 DDPF a un 75% en los 109 DDPF, manteniéndose este nivel hasta la cosecha (171 DDPF; Figura 3B).

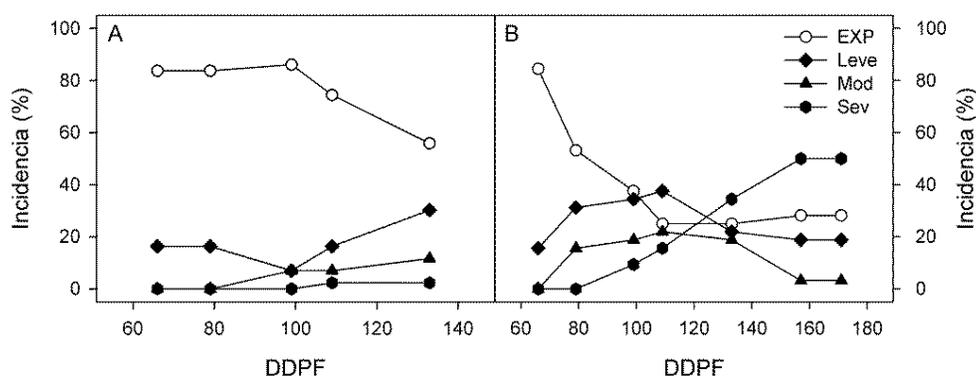


Figura 3. Evolución del síntoma de daño por sol en Royal Gala (A) y Red Fuji (B) en secciones del fruto con diferente exposición: expuesta sin daño (EXP), daño leve, moderado (Mod) y severo (Sev).

La cantidad de frutos con daño severo (Sev) de Red Fuji, fue aumentando a partir de los 79 DDPF, hasta afectar al 50% de los frutos monitoreados, a los 157 DDPF (Figura 3B). Este aumento progresivo en el tiempo de la cantidad de frutos Fuji con daño severo fue lineal, y se asoció directamente con la T° del aire (número días con más de 5 horas con T° mayor a 29 °C; Yuri *et al.*, 2000b; Schrader *et al.*, 2001):

$$N^{\circ} \text{ frutos con daño severo} = (3.074 \times N^{\circ} h \text{ con } T^{\circ} > 29^{\circ} C) - 2.698 \quad R^2=0.99$$

Por otro lado, los frutos Fuji con daño leve alcanzaron un máximo de 40% de incidencia, a los 109 DDPF, que luego disminuyó a un 20%, mientras se incrementaba la severidad del daño. A los 109 DDPF se marcó el punto en que se estabilizó la incidencia del daño en Fuji (75%), y comenzó a aumentar la severidad del síntoma.

2. Antioxidantes no enzimáticos: ascorbato y glutatión

El contenido de ácido ascórbico (AsA) y ascorbato total (AsA+DHA), medido a partir de los 66 DDPF, fue muy variable hasta la cosecha para ambos cultivares (Figura 4). Sin embargo, en Gala, el contenido de AsA+DHA de la piel expuesta al sol (EXP), disminuyó sostenidamente con el desarrollo del fruto, hasta su cosecha, en los 133 DDPF (Figura 4A). En general, en las secciones dañadas existió menores niveles de ascorbato total y AsA comparado con las sin daño (expuesta sin daño y no expuesta). Sólo a los 99 DDPF se registraron diferencias estadísticas en el contenido de AsA y AsA+DHA, según la exposición del tejido (Figura 4A, C). Por otro lado, se registró una mínima presencia de AsA y AsA+DHA en las secciones con daño por sol en Royal Gala (Figura 4A, C).

En Red Fuji, si bien el contenido de AsA+DHA de la sección EXP fue nulo a los 99 DDPF, en el resto de la temporada fluctuó entre 1 y 3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF (Figura 4B). La sección EXP de Fuji,

15 días antes de cosecha (157 DDPF), mostró mayor nivel de AsA+DHA que las secciones con daño por sol, y a los 171 DDPF, fue mayor, además, al registrado en la sección Non-EXP (Figura 4B). En el período entre 80 y 140 DDPF, la piel expuesta (EXP) de Fuji registró menos de $0.05 \mu\text{mol g}^{-1}$ de AsA (Figura 4D). En piel de Fuji, Felicetti y Mattheis (2010), encontraron una concentración variable de ácido ascórbico durante el desarrollo del fruto, con una sima entre los 90 y 130 DDPF, momento en que la concentración fluctuó bajo los $0.5 \mu\text{mol g}^{-1}$. Los tres cultivares estudiados por estos autores, Red Delicious, Golden y Fuji, mostraron un alza de AsA previo a la cosecha. Una alta relación AsA/DHA se ha encontrado en piel de fruto Gala expuesto al sol (Ma y Cheng, 2003). En el ensayo se observó mayor niveles de AsA+DHA, en la sección expuesta de Fuji desde los 15 días antes de cosecha (157 y 171 DDPF), en relación a las otras secciones (Figura 4B). Sin embargo, no así con AsA (Figura 4D).

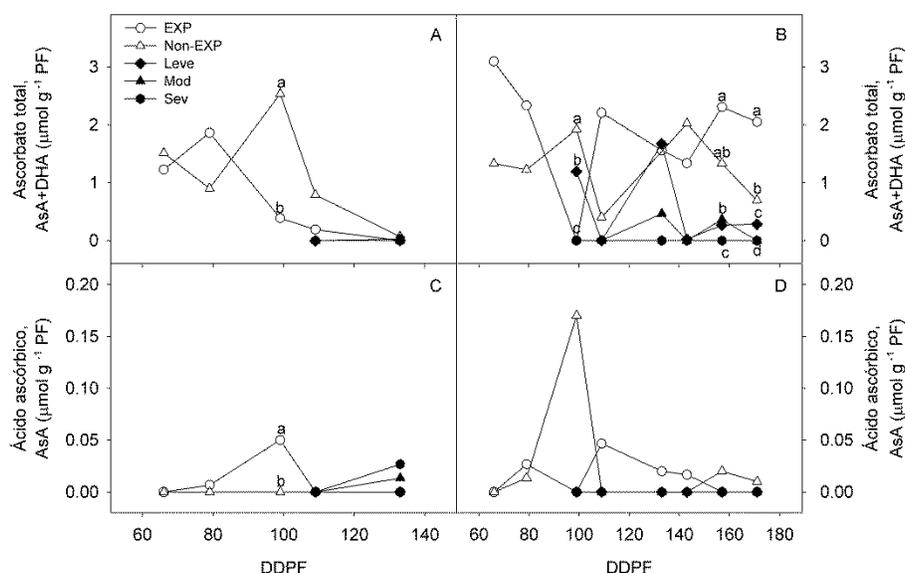


Figura 4. Contenido de ascorbato total (AsA+DHA; A, B) y ácido ascórbico (AsA; C, D), en piel de fruto Royal Gala (A, C) y Red Fuji (B, D), con diferente daño por sol: expuesto sin daño (EXP), no expuesto (Non-EXP), daño leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

El contenido de glutatión, en sus formas reducido (GSH) y oxidado (GSSG), mostró mínimo contenido en Gala y una alta dispersión en Fuji, sin diferencias estadísticas entre exposición o nivel de daño por sol (Figura 5). En Red Fuji, al igual que para el contenido de ascorbato total, se registró mayor nivel de GSH en la sección EXP en las dos últimas fechas de muestreo, y nulo contenido en las secciones con síntoma de daño por sol (Figura 5D). El alza del GSH al final de la temporada en la sección EXP de Fuji podría estar asociado a una disminución del estrés ambiental al inicio del otoño (Figura 2). Ello, concordaría con una menor relación GSH/GSSG en hojas sometidas a estrés térmico sostenido (Ma *et al.*, 2008). Podría indicar una ambientación del lado del fruto expuesto (sin síntomas de daño por sol), puesto que una alta proporción GSH/GSSG ha sido descrita en piel de fruta expuesta al sol, en relación al lado no expuesto (Ma y Cheng, 2003).

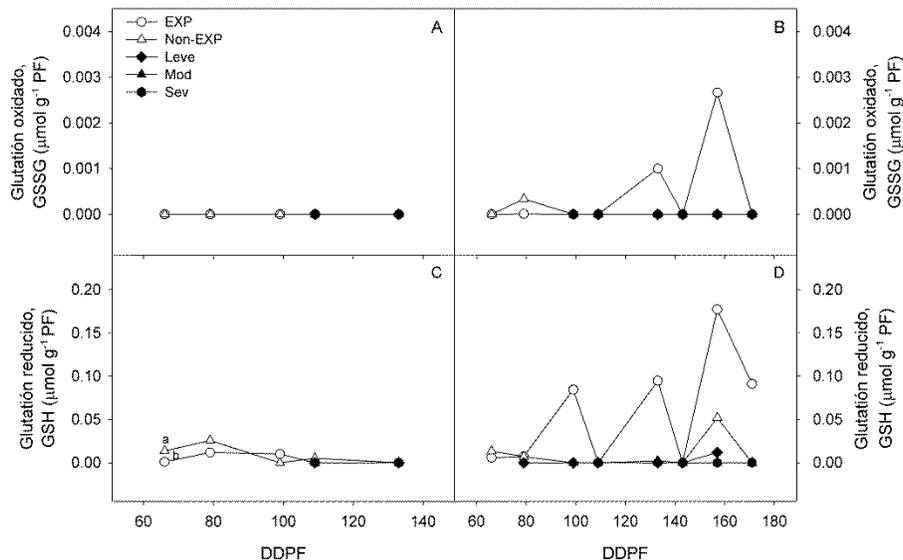


Figura 5. Contenido de glutatión oxidado (GSSG; A, B) y glutatión reducido (GSH; C, D), en piel de fruto de Royal Gala (A, C) y Red Fuji (B, D) con diferente daño por sol: expuesto sin daño (EXP), no expuesto (Non-EXP), daño leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

Las variaciones en las condiciones ambientales de un ensayo de campo podrían explicar los cambiantes niveles de los metabolitos antioxidantes encontrados (Figuras 4 y 5). En hojas de manzano, Ma *et al.* (2008), encontraron un alza de AsA, AsA+DHA, GSH y glutatión total (GSH+GSSG), cuando aplicaron alta temperatura (40 °C), con respecto a los niveles del control (28 °C), en las primeras dos horas de exposición. Luego, cayeron sostenidamente al aumentar el tiempo de exposición. En el presente estudio, que las cantidades de metabolitos antioxidantes y la actividad de enzimas asociadas hayan resultado diferentes en un momento determinado podría asociarse a una más alta variación de la TSF en huerto que en laboratorio. Por ello, los cambios metabólicos podrían producirse como una respuesta inmediata a las variaciones ambientales. Ma y Cheng (2004), observaron que la piel de fruto a la sombra, una vez expuesta al sol, en 10 días alcanzó los niveles de ascorbato y glutatión de la fruta que creció expuesta. En cuanto al desarrollo de daño por sol, Wünsche *et al.* (2001), ya señalaban una mayor sensibilidad en tejido con exposición repentina a alta luz y temperatura. Los cambios metabólicos de frutos que desarrollan daño por sol rápidamente al exponerlos repentinamente al sol, es materia que debería encargarse un futuro estudio.

Ma *et al.* (2008), encontraron que exposición a alta T° (40 °C con 50-60% de HR y 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa), produjo una reducción sostenida de la relación AsA/DHA y GSH/GSSG en hojas. Ello concordaría con los bajos niveles de AsA encontrados en este estudio, en las secciones sin daño por sol (EXP y Non-EXP) en fruta de ambos cultivares. Ello, debido a las condiciones ambientales en el huerto al momento de los muestreos (valores promedio: radiación solar máxima de 917 W m^{-2} ; T_{max} de 28.4 °C; y HR mínima de 31.9%). Estas condiciones, típicas del verano en la zona central de Chile,

producirían una reducción de AsA, sobre todo cuanto se trata de piel de fruto con suficiente tamaño para incrementar su TSF, por su menor capacidad de disipación térmica en relación a hojas (Palmer *et al.*, 2003). Torres *et al.* (2006), atribuyeron a condiciones de alta luminosidad y temperatura una disminución de AsA y DHA. Así también, en Chile, Hernandez *et al.* (2014) reportaron mayor cantidad de ascorbato al momento de cosecha en el lado expuesto de manzanas Granny Smith que en aquellas con daño por sol. Sin embargo, Chen *et al.* (2008) encontraron alto nivel de ascorbato total, glutatión y glutatión reducido (GSH) en piel de Gala con daño por sol. Esta discrepancia podría explicarse de igual forma por una caída de los metabolitos con condiciones persistentes de alta radiación y temperatura.

Así, en este estudio, las secciones con daño por sol, sin trazas de los metabolitos antioxidantes, evidenciarían un colapso del sistema antioxidante (ciclo ascorbato-glutatión), ante las extremas condiciones al momento del muestreo: alta radiación solar, alta T° y baja HR. En piel expuesta (ambientada), no habría daño porque los sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos), fueron capaces de neutralizar eficientemente los ROS que se van generando en la piel del fruto, producto de las condiciones ambientales disponibles para daño por sol (Racsco y Schrader, 2012).

3. Enzimas antioxidantes

Se registró una alta variabilidad en la actividad enzimática en el período de registro (66 DDPF a cosecha), en ambos cultivares (Figura 6). Ello, podría encontrar las causas en las mismas que los erráticos registros de ascorbato y glutatión (Figuras 4 y 5). Si bien esta variabilidad, se encontró muy baja actividad de las enzimas antioxidantes en las secciones con daño por sol (Figura 6). Similar tendencia fue señalada por Hernandez *et al.* (2014), aunque sólo encontraron diferencia estadística de una menor actividad en DHAR de Granny Smith con daño por sol en relación a manzanas sin daño, y en el mismo sentido, en DHAR y GR de Fuji.

En Royal Gala, a partir de los 109 DDPF aparecen los primeros signos de fruta dañada. Se aprecia que fruta expuesta sin daño y no expuesta presentaron niveles superiores de actividad de APX y GR respecto de fruta dañada (Figura 6). En Red Fuji, no existieron marcadas diferencias en la actividad enzimática de fruta dañada y aquella sin daño. Esta situación podría estar asociada a una mayor protección de Royal Gala por sobre Fuji. En hojas, Ma *et al.* (2008), encontraron un aumento de la actividad de las enzimas del ciclo antioxidante hasta 4 horas de exposición a 40 °C, luego declinó. En los frutos de este estudio, esta declinación podría haber ocurrido más rápido.

Ma y Cheng (2003), encontraron alta actividad de estas enzimas (APX, MDHAR, DHAR y GR) en piel expuesta al sol (sin síntomas de daño por sol). En este estudio, en la sección expuesta sin daño por sol (EXP), solamente pudo verse alta actividad de APX y GR en Gala a los 109 DDPF (Figura 6).

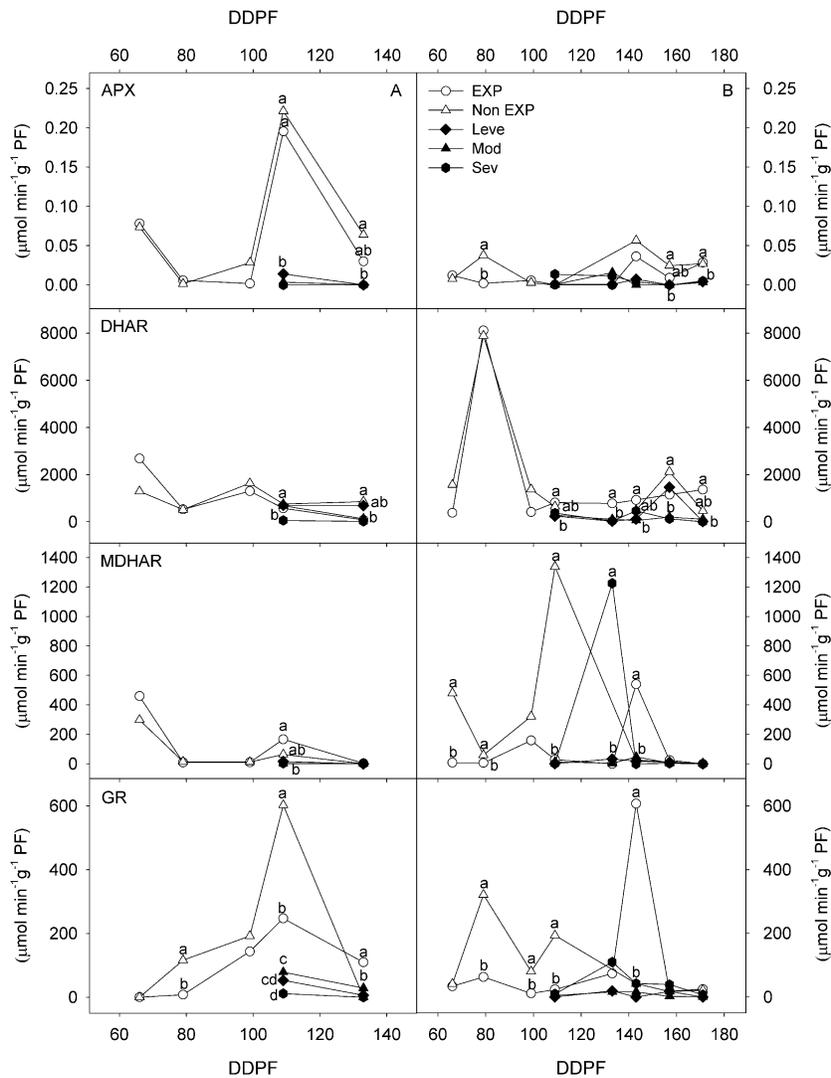


Figura 6. Actividad enzimática en piel de frutos de Royal Gala (A) y Red Fuji (B), con diferente exposición: expuesto (EXP), no expuesto (Non EXP), y con daño por sol leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

Los niveles de transcritos, a diferencia de la determinación de la actividad enzimática, constituye un registro en tiempo real de la demanda de enzimas por la planta. En términos de expresión relativa, las enzimas del sistema antioxidante no mostraron una tendencia, excepto una mayor expresión en la sección expuesta en relación al lado no expuesto del fruto, en ambos cultivares, consistentemente en las primeras fechas de muestreo, sólo en MDHAR (Figura 7). Los tejidos con síntoma de daño por sol mostraron expresión de DHAR en las fechas medidas (109 y 133 DDPF), en ambos cultivares. Por otro lado, casi no se registró expresión de GR en secciones con daño por sol (Figura 7). Se esperaba un efecto de los compuestos antioxidantes sobre la expresión de las enzimas asociadas. Ma *et al.* (2008), registraron un patrón similar entre la expresión génica y la actividad de las enzimas involucradas en el ciclo ascorbato-glutatión, en hojas de manzano al aplicarles temperatura.

Bajo estrés abiótico, aumentó la expresión de éstas, es decir, se induciría la síntesis de enzimas del sistema de respuesta defensivo (Torres *et al.*, 2006).

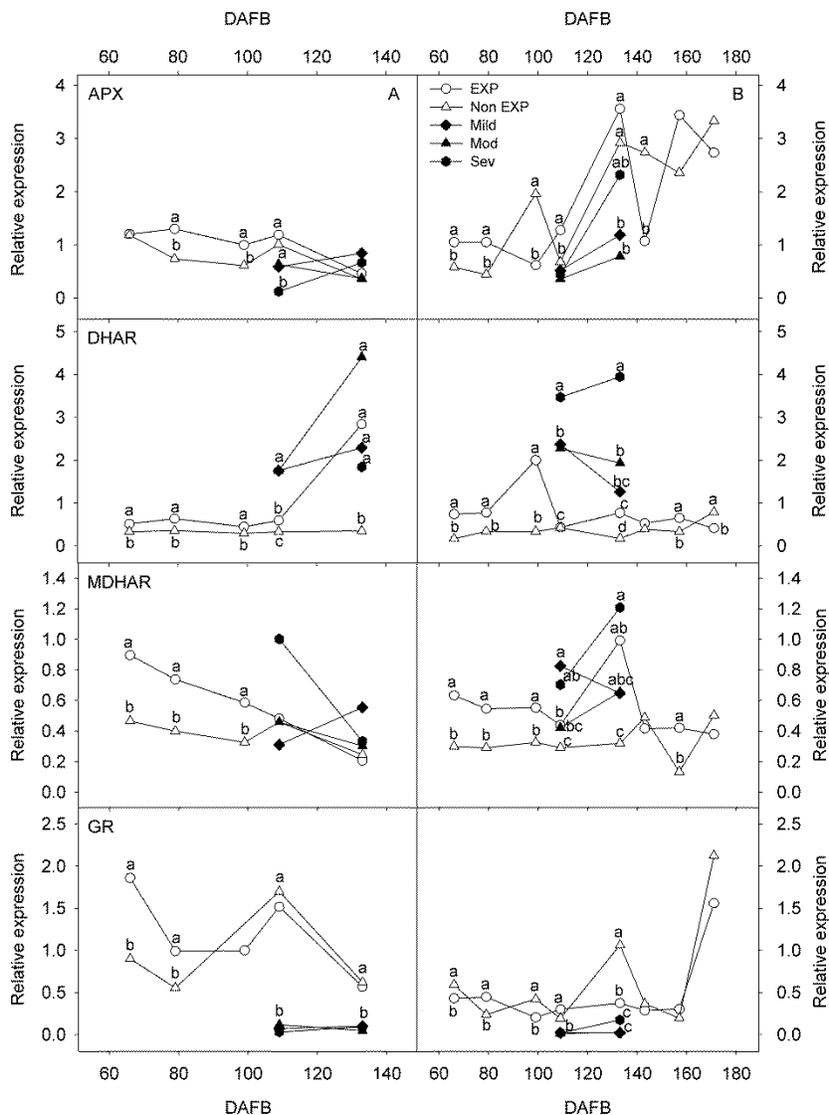


Figura 7. Expresión relativa de enzimas antioxidantes en piel de frutos de Royal Gala (A) y Red Fuji (B), con diferente exposición: expuesto (EXP), no expuesto (Non EXP), y con daño por sol leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

4. Polifenoles totales y específicos

Los polifenoles totales, en términos de equivalentes de ácido clorogénico (EAC), fueron mayores en la sección expuesta en relación a la no expuesta a lo largo de la temporada en ambos cultivares (Figura 8). La excepción ocurrió en la primera fecha en Gala (66 DDPF) y en la segunda en Fuji (79 DDPF), debido a la dispersión de las muestras (Figura 8). En cuanto a los frutos con daño por sol, éstos mostraron un EAC mayor que la sección expuesta, en ambos cultivares (Figura 8). La acumulación de fenoles totales en piel con daño por sol ha sido reportada como parte de las respuestas no enzimáticas al estrés foto-oxidativo (Yuri *et*

al., 2010; Hernandez *et al.*, 2014). Como los fenoles absorben radiación UV-B, su síntesis constituiría una respuesta adaptativa frente al exceso de ésta (Solovchenko y Merzlyak, 2008).

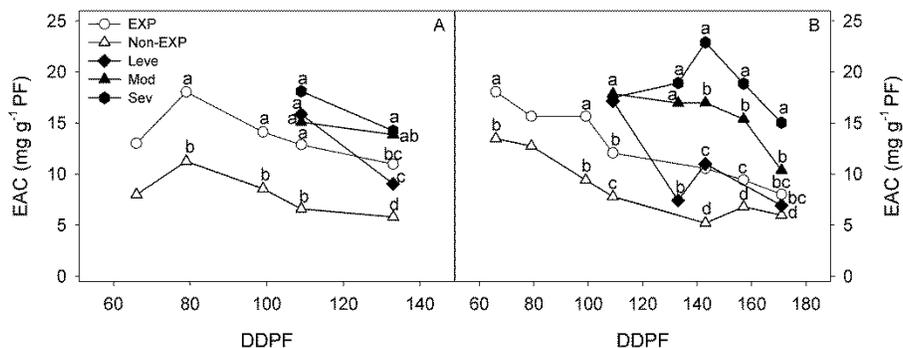


Figura 8. Contenido de fenoles totales en términos de equivalentes de ácido clorogénico (EAC) en piel de manzanas Royal Gala (A) y Red Fuji (B), con diferente exposición: expuesta sin daño (EXP), no expuesta (Non EXP), con daño por sol leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

Los cambios en los fenoles específicos: ácido clorogénico, catequinas y epicatequinas (Figura 9), así como de quercetinas (Q) glicosiladas (Figura 10), no mostraron una tendencia tan clara como los fenoles totales (Figura 8). Ello podría deberse a una alta dispersión de datos; en las secciones con daño por sol ésta podría estar asociada a una disminución de estos flavonoides en tejido con avanzado daño celular (Wünsche *et al.*, 2001). A pesar de ello, en manzanas Royal Gala, se encontró mayor contenido de ácido clorogénico, catequina y epicatequina en tejidos con daño por sol moderado, en los 109 DDPF (Figura 9A). Wünsche *et al.* (2001), Felicetti y Schrader (2008; 2009), reportaron una relación positiva entre el contenido de ácido clorogénico y la categoría de daño por sol. Por otro lado, en las primeras dos fechas de muestreo de Fuji (66 y 79 DDPF), la sección EXP mostró mayor nivel de ácido clorogénico que la Non-EXP (Figura 9B). Lancaster *et al.* (2000), no encontraron diferencias en concentración de ácido clorogénico entre el lado expuesto y no expuesto al sol de la fruta, e indujeron síntesis de ácido clorogénico con irradiación UV-B, con un mayor incremento en la sección sombra con alta temperatura (20 °C versus 10 °C).

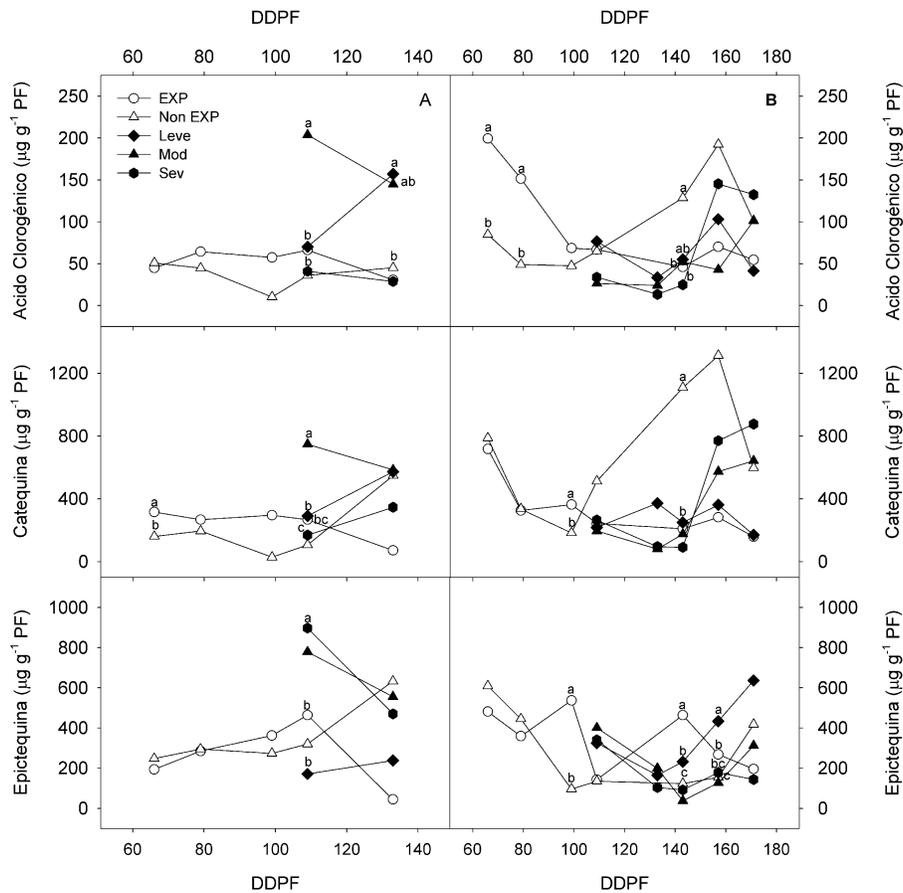


Figura 9. Contenido de ácido clorogénico, catequina y epicatequina en piel de manzanas Royal Gala (A) y Red Fuji (B), con diferente exposición: expuesta sin daño (EXP), no expuesta (Non EXP), con daño por sol leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

Si bien, el contenido de Q glicosiladas no mostró una tendencia asociada al desarrollo del fruto, si hubo un mayor contenido en los frutos Fuji con daño por sol a cosecha (171 DDPF), excepto de Q-ram (Figura 10). Situación similar se ve en Gala, con mayor contenido en piel con daño por sol moderado de Q-rut, Q-gal, Q-ara y Q-xyl (Figura 10A). Reay y Lancaster (2001), reportaron una caída de Q glicosiladas durante la temporada en manzanas Gala, y mayor cantidad en el lado expuesto que en el no expuesto al sol. Un incremento de Q glicosiladas se han descrito en tejido con daño por sol, con mayor abundancia de Q-galactosido (Felicetti y Schrader, 2008; Yuri *et al.*, 2010). Merzlyak *et al.* (2005), sugirieron que estos flavonoles filtran el exceso de radiación, tanto UV-A como en el rango corto de la radiación visible, donde absorben clorofila y carotenos.

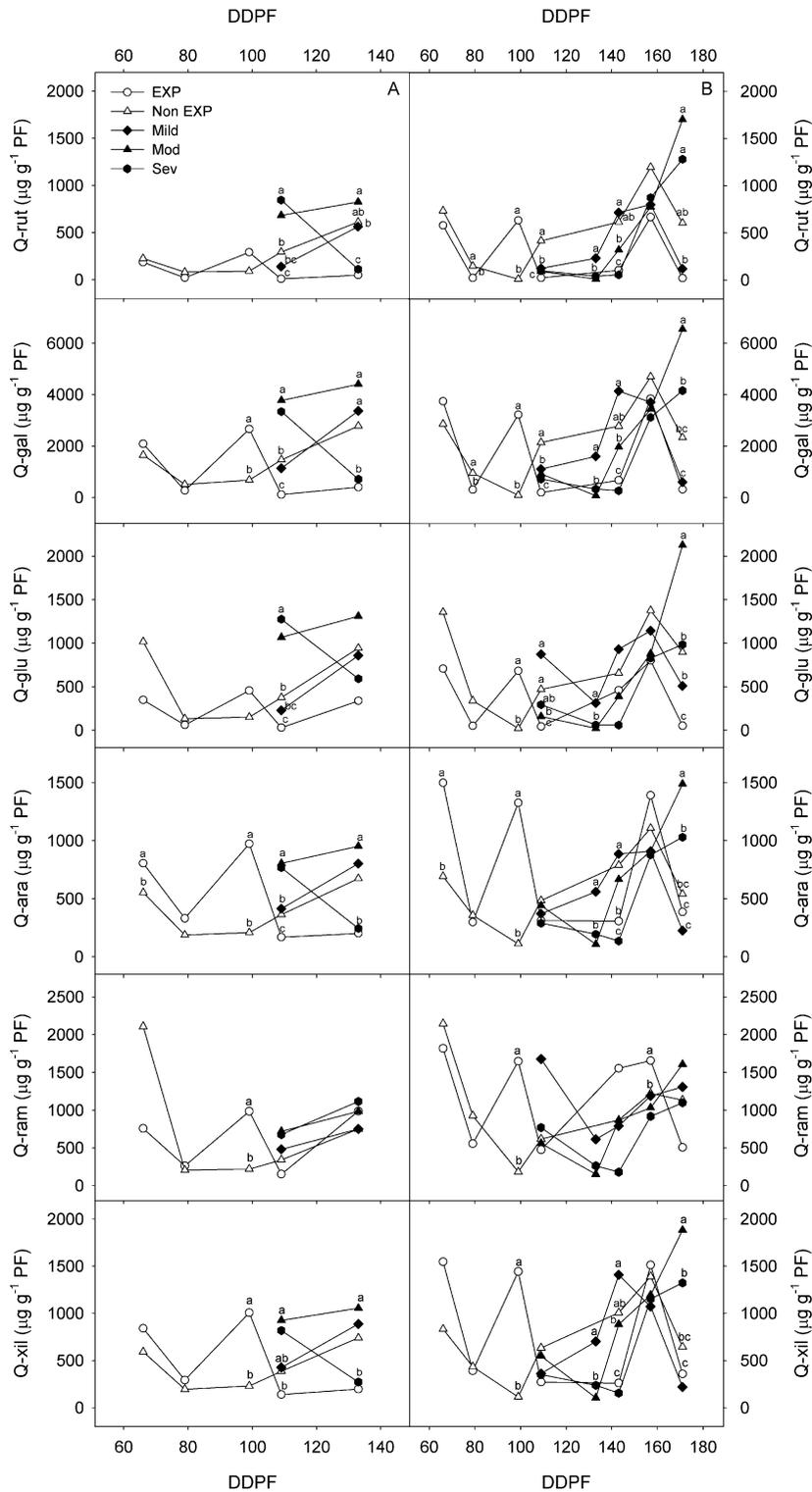


Figura 10. Quercetinas (Q) glicosiladas en piel de manzanas Royal Gala (A) y Red Fuji (B), con diferente exposición: expuesta sin daño (EXP), no expuesta (Non EXP), con daño por sol leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

5. Azúcares totales y específicos

El contenido de azúcares mostró mayor tendencia en la acumulación en tejido con daño por sol en ambos cultivares, para cada fecha de muestreo, aunque sin diferencias significativas (Figura 11). Se observó un menor contenido de sorbitol y glucosa en frutos sin daño respecto de frutos dañados. Esto coincide con lo reportado por Li *et al.* (2012), en manzanas y Torres *et al.* (2013), en tomate.

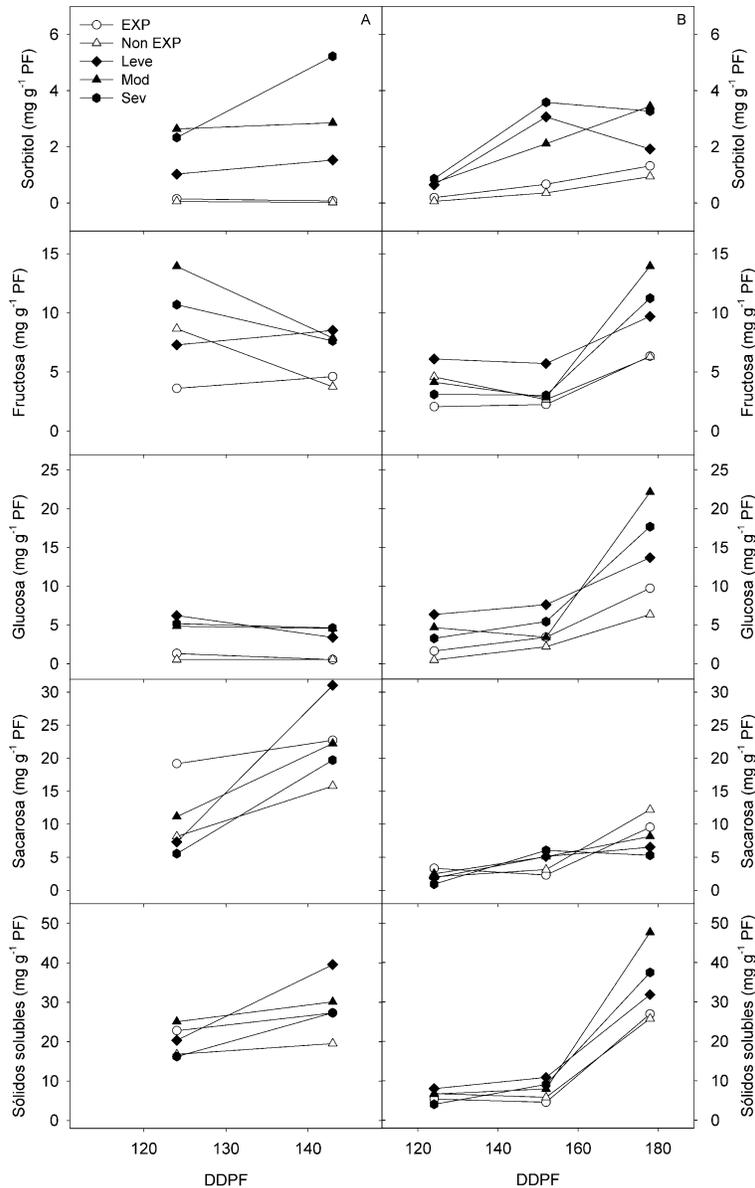


Figura 11. Azúcares en piel de manzanas Royal Gala (A) y Red Fuji (B), con diferente exposición: expuesta sin daño (EXP), no expuesta (Non EXP), con daño por sol leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

6. Pigmentos

No se observaron diferencias estadísticas en el contenido de clorofila *a* o *b* entre tejido dañado por sol en relación a piel sin daño (Figura 12). Cambios en estos pigmentos han sido reportados en fruto con daño por sol (Wünsche *et al.*, 2001; Merzlyak *et al.*, 2002; Felicetti y Schrader, 2008; Tartachnyk *et al.*, 2012). El contenido de clorofila *a* y *b* disminuyó con el aumento de severidad del daño por sol en Fuji (Felicetti y Schrader, 2008). Wünsche *et al.* (2001), describieron degradación de clorofila junto con caída de fluorescencia de clorofila. Tartachnyk *et al.* (2012), notaron que en fruta con daño por sol, la fluorescencia de la clorofila mostró una tasa de caída mayor que el contenido del pigmento. En este trabajo, la tendencia de disminución del contenido de clorofila *a* y *b* en el tiempo, a medida que avanza la maduración de la fruta de ambos cultivares, concuerda con la descrita por Merzlyak *et al.* (2002).

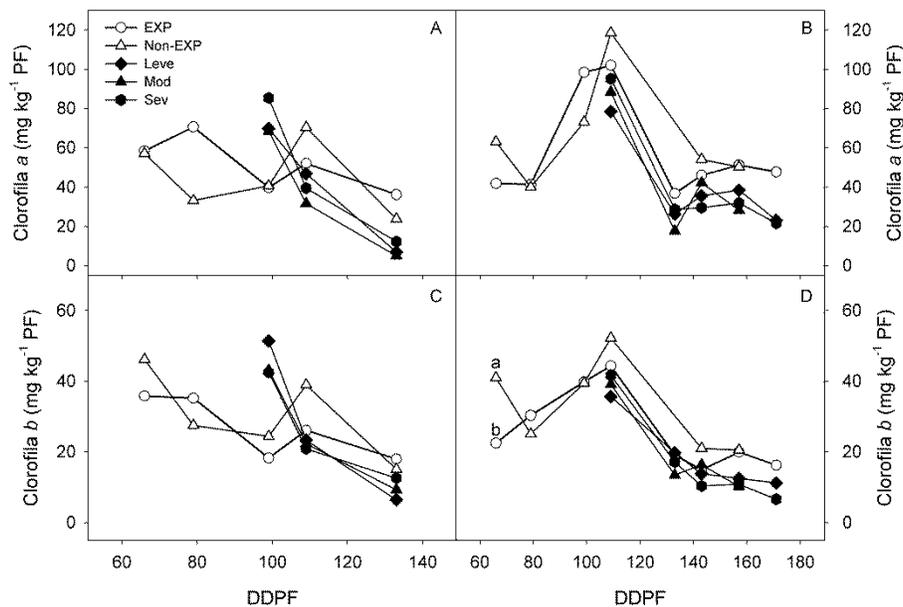


Figura 12. Contenido de clorofila *a* en piel de manzanas Royal Gala (A) y Red Fuji (B), y clorofila *b* en piel de manzanas Royal Gala (C) y Red Fuji (D), con diferente exposición: expuesta sin daño (EXP), no expuesta (Non EXP), con daño por sol leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

Además de la pérdida de clorofila, Merzlyak *et al.* (2002), encontraron un menor contenido de carotenos en cultivares verdes con daño por sol. Sin embargo, alza del contenido de β -caroteno ha sido reportada en piel de fruta con el aumento del nivel de daño por sol en Braeburn (Wünsche *et al.*, 2001) y Fuji (Felicetti y Schrader, 2008). En el presente estudio, sólo a los 157 DDPF, Fuji con daño severo mostró mayor cantidad de β -caroteno, en relación a las muestras con otra exposición (Figura 13 D). En Gala, en cambio, la piel con daño severo fue la que registró mayor contenido, tanto de α como β -caroteno (Figura 13). Esta mayor acumulación de carotenos en piel con daño por sol en Gala podría ser una característica varietal asociada a una más efectiva protección frente a condiciones foto estresantes

(Wünsche *et al.*, 2001). Estos autores señalan que junto al ácido clorogénico, considerando su capacidad de neutralización de ROS y su alta concentración en tejido dañado, serían un mecanismo de control de daño por sol. Sin embargo, la acumulación de estos compuestos estaría sujeta a un tiempo de ambientación, situación que podría estar relacionada con la rápida manifestación de daño por sol en frutos expuestos repentinamente. Frutos sin esta ambientación (expuestos repentinamente a alta radiación y temperatura), rápidamente se dañarían, puesto que el sistema ascorbato-glutación sería superado por la persistencia de condiciones estresantes por varias horas.

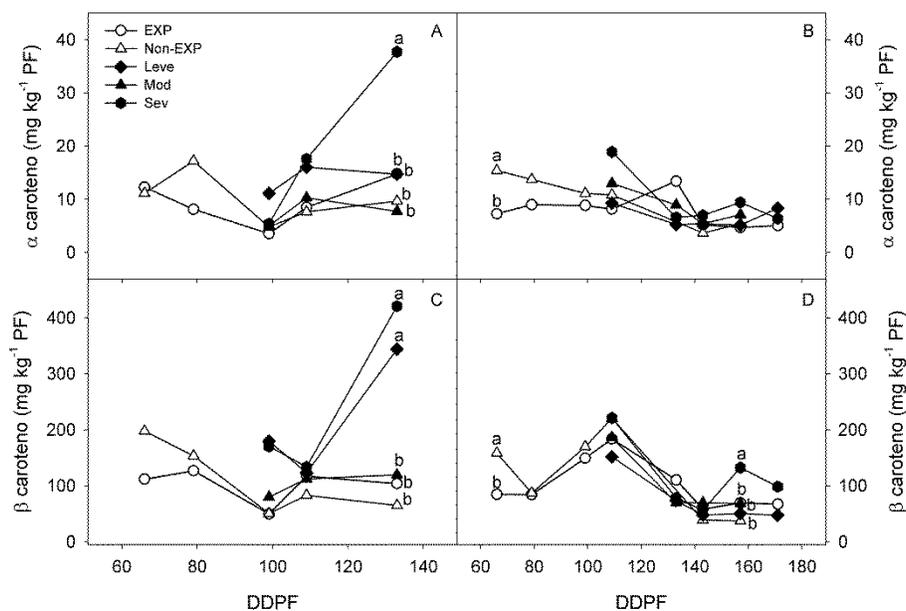


Figura 13. Contenido de α caroteno en piel de manzanas Royal Gala (A) y Red Fuji (B), y β -caroteno en piel de manzanas Royal Gala (C) y Red Fuji (D), con diferente exposición: expuesta sin daño (EXP), no expuesta (Non EXP), con daño por sol leve, moderado (Mod) y severo (Sev). DDPF: días después de plena flor. Diferentes letras en la misma fecha indican diferencias estadísticas (Tukey, valor $p < 0.05$).

4. CONCLUSIONES

Los cambios en el metabolismo antioxidante ascorbato-glutación constituirían una respuesta inmediata a la carga excesiva de energía a la cual está sometida la piel del fruto. Por lo mismo, sería poco eficiente en neutralizar la proliferación de los ROS cuando este embate energético se mantiene la mayor parte del día y por todo el verano.

El aumento en el contenido de fenoles totales y carotenos, tanto en la piel expuesta como en aquella con daño por sol, constituiría un mecanismo defensivo de largo plazo. La diferencia en el contenido de carotenos a favor de Gala, podría evidenciar un aspecto varietal en la respuesta al estrés foto-oxidativo.

5. REFERENCIAS

- Barber, H.N., Sharpe, P.J.H. 1971. Genetics and physiology of sunscald of fruits. *Agricultural Meteorology* 8: 175-191.
- Bergh, O., Franken, J. van Zyl, E.J., Kloppers, F., Dempers, A. 1980. Sunburn in apple: Preliminary results of an investigation conducted during 1978/1979 season. *Deciduous Fruit Grower* 30: 8-22.
- Cosetang, M., Lee, C. 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science* 52: 986-989.
- Chen, L-S., Li, P., Cheng, L. 2008. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta* 228:745-756.
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E. 2008. Changes in pigment concentration associated with the degree of sunburn browning of 'Fuji' apple. *Journal of American Society of Horticultural Science* 133: 27-34.
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E. 2009. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. II. Phenolics. *Plant Science* 176: 84-89.
- Felicetti, E., Mattheis, J.P. 2010. Quantification and histochemical localization of ascorbic acid in 'Delicious,' 'Golden Delicious,' and 'Fuji' apple fruit during on-tree development and cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 56: 56-63.
- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Foyer, C.H., Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155: 2-18.
- Frías, M. Aspectos relevantes para el éxito productivo en huertos de manzanos en el 2006. Seminario Pomáceas, ASOEX, 11 y 12 de octubre de 2006, Santiago de Chile.
- Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S.S. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 437a-437g.
- Hernandez, O., Torres, C.A., Moya-León, M.A., Opazo, M.C., Razmilic, I. 2014. Roles of the ascorbate-glutathione cycle, pigments and phenolics in postharvest 'sunscald' development on 'Granny Smith' apples (*Malus domestica* Borkh.). *Postharvest Biology and Technology* 87: 79-87.
- Lancaster, J.E., Reay, P.F., Norris, J., Butler, R.C. 2000. Induction of flavonoids and phenolic acids in apple by UV-B and temperature. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 75: 142-148.
- Li, P., Ma, F., Cheng, L. 2012. Primary and secondary metabolism in the sun-exposed peel and shaded peel of apple fruit. *Physiologia Plantarum* 148: 9-24.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 603: 591-592.
- Ma, F., Cheng, L. 2003. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophylls cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Science* 165: 819-827.

- Ma, F., Cheng, L. 2004. Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophylls cycle and the ascorbate-glutathion cycle. *Plant Science* 166: 1479-1486.
- Ma, Y-H., Ma, F-W., Zhang, J-K., Li, M-J., Wang, Y-H., Liang, D. 2008. Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle in apple leaves. *Plant Science* 175: 761-766.
- Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E., Chivkunova, O.B. 2002. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 679-684.
- Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E., Smagin, A.I., Gitelson, A.A. 2005. Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: Spectral features and technique for non-destructive assessment. *Journal of Plant Physiology* 151-160.
- Muir, J.G., Rose, R., Rosella, O., Liels, K., Barrett, J.S., Shepherd, S.J., Gibson, P.R. 2009. Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 554-565.
- Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:249-79.
- Palmer, J. W., Privé, J. P., Tustin, D. S. 2003. Temperature. pp. 217-236. En *Apples: Botany, Production and Uses*. D. C. Ferree y I. J. Warrington (eds). CAB International. 660 p.
- Pfaffl, MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Rabinowitch, H.D., Kedar, N., Budowski, P. 1974. Induction of sunscald damage in tomatoes under natural and controlled conditions. *Scientia Horticulturae* 2: 265-272.
- Racskó, J., Szabó, Z., Nyéki, J. 2005. Importance of the supraoptimal radiance supply and sunburn effects on apple fruit quality. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 111-114.
- Racsko, J., Schrader, L.E. 2012. Sunburn of apple fruit: Historical background, recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31: 455-504.
- Reay, P.F., Lancaster, J.E. 2001. Accumulation of anthocyanins and quercetin glycosides in 'Gala' and 'Royal Gala' apple fruit skin with UV-B-Visible irradiation: Modifying effects of fruit maturity, fruit side, and temperature. *Scientia Horticulturae* 90: 57-68.
- Schrader, L.E., Zhang, J., Duplaga, W.K. 2001. Two types of sunburn in apple caused by high fruit surface (peel) temperature. *Plant Health Progress*. Jun. 2012. <<https://www.plantmanagementnetwork.org>>.
- Solovchenko, A.E., Merzlyak, M.N. 2008. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 719-737.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 782 p.
- Tartachnyk, I., Kuckenber, J., Yuri, J.A., Noga, G. 2012. Identifying fruit characteristics for non-invasive detection of sunburn in apple. *Scientia Horticulturae* 134: 108-113.
- Torres, C.A., Andrews, P.K., Davies, N.M. 2006. Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *Journal of Experimental Botany* 57: 1933-1947.

- Torres, C.A., Sepulveda, A., Gonzalez-Talice, J., Yuri, J.A., Razmilic, I. 2013. Fruit water relations and osmoregulation on apples (*Malus domestica* Borkh.) with different sun exposures and sun-injury levels on the tree. *Scientia Horticulturae* 161: 143-152.
- Villarroel, M.C. 2000. Evaluación de los principales problemas de pre y post cosecha que afectan a las manzanas en Chile: Estudio de casos. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Chile. 37 p.
- Wand, S.J.E., Theron, K.I., Ackerman, J., Marais, S.J.S. 2006. Harvest and post-harvest apple fruit quality following applications of kaolin particle film in South African orchards. *Scientia Horticulturae* 107: 271–276.
- Wünsche, J.N., Greer, D.H., Palmer, J.W., Lang, A., McGhie, T. 2001. Sunburn—The cost of a high light environment. *Acta Horticulturae* 557: 349-356.
- Yuri, J.A., Torres, C., Vásquez, J. 2000 a. Golpe de sol en manzanas. I. Evaluación del daño y métodos de control. *AgroCiencia* 16: 13-21.
- Yuri, J.A., Torres, C., Bastias, R., Neira, A. 2000 b. Golpe de sol en manzanas. II. Factores inductores y respuestas bioquímicas. *AgroCiencia* 16: 23-32.
- Yuri, J.A., Lepe, V., Moggia, C., Bastías, R., Bertschinger, L. 2004. Sonnenbrand beim apfel. *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau* 8: 7-10.
- Yuri, J.A., Neira, A., Quilodran, A., Razmilic, I., Motomura, Y., Torres, C., Palomo, I. 2010. Sunburn on apples is associated with increases in phenolic compounds and antioxidant activity as a function of the cultivar and areas of the fruit. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8: 920-925.
- Yuri, J.A. 2010. Daño por sol en manzanas. *Revista de Fruticultura* 8: 4-15.
- Zubini, P., Baraldi, E., de Santis, A., Bertolini, P. Mari, M. 2007. Expression of anti-oxidant enzyme genes in scald-resistan 'Belfort' and scald-susceptible 'Granny Smith' apples during cold storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 82: 149-155.

IV. CAPITULO II

Capacidad de ambientación de frutos de manzanos expuestos repentinamente a la radiación solar directa en el árbol.

RESUMEN

El daño por sol es causado por exposición de los frutos a alta radiación solar y temperatura. El exceso de energía radiativa promueve la proliferación de especies reactivas de oxígeno que generan oxidación y muerte de los componentes celulares. La planta neutraliza esta carga foto-oxidativa mediante el sistema antioxidante ascorbato-glutación, así como con la presencia de pigmentos y compuestos fenólicos, que filtran la radiación UV y visible. Los cambios en estos compuestos, en frutos de manzano expuestos repentinamente a alta radiación solar, entregarían claves acerca de los mecanismos de defensa de la planta, y con ello, del control del daño por sol. En un huerto comercial ubicado en San Clemente (Maule, Chile), se realizó la exposición repentina de frutos de manzano Royal Gala y Red Fuji, en dos momentos en la temporada 2010/11 (81 y 114 días después de plena flor). Cada dos días (aproximadamente), post exposición, se extrajo y congelaron en N₂ líquido muestras de piel de los frutos expuestos repentinamente (EXP-R), creciendo con exposición solar directa (EXP) y del interior del árbol, sin exposición directa (No EXP). Así mismo, se muestreó piel EXP-R que manifestó daño por sol (EXP-R daño). Se cuantificó ascorbato y glutación total, pigmentos específicos (clorofilas *a* y *b*, α y β -caroteno), y fenoles específicos (ácido clorogénico, catequina, epicatequina y quercetinas glicosiladas), desde el momento de la exposición repentina hasta 10 días post exposición. EXP-R de Royal Gala mostró un aumento del ascorbato total post exposición repentina. EXP-R de ambos cultivares registraron una caída de clorofila, recuperando los niveles del tejido EXP a los 10 días post exposición. Los carotenos no mostraron un cambio tan marcado como la clorofila. Por otro lado, el contenido de quercetinas glicosiladas aumentó en la piel EXP-R a partir del primer muestreo post exposición repentina. Además, se registró un alto contenido en EXP-R daño y EXP, y el menor contenido se observó en piel No EXP. Hubo una notoria baja en la respuesta de las quercetinas glicosiladas en la segunda fecha de exposición. Ello también se registró en ácido clorogénico, catequina y epicatequina en Fuji. La ambientación del fruto a alta radiación solar, estaría dada básicamente por acumulación de pigmentos (carotenos) y flavonoles (quercetinas). El aumento en la concentración de quercetinas glicosiladas durante la exposición repentina del fruto, indicaría que éstas son parte importante del sistema defensivo no enzimático en respuesta a estrés foto-oxidativo en frutos de manzano. Un menor contenido y respuesta en la síntesis de fenoles podría potenciar el riesgo por desarrollar daño por sol, a medida que los frutos crecen en la temporada.

Palabras clave: ascorbato, estrés foto-oxidativo, fenoles, pigmentos, Fuji, Gala.

1. INTRODUCCIÓN

Veranos secos, con alta temperatura y baja humedad relativa, son condiciones conducentes al desarrollo de daño por sol (Barber y Sharpe, 1971; Rabinowitch *et al.*, 1974; Torres *et al.*, 2006), principal descarte de exportación de manzanas a nivel de huerto en Chile (Yuri, 2010). En Fuji, es posible encontrar hasta un 40% de fruta con daño por sol en el huerto (Yuri *et al.*, 2000).

Alta radiación solar y temperatura conducen a la proliferación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las que pueden causar daño oxidativo a componentes celulares (Taiz y Zeiger, 2010; Foyer y Noctor, 2011). Este estrés foto-oxidativo conduciría a la aparición de los síntomas de daño por sol en el fruto (Wünsche *et al.*, 2001; Ma y Cheng, 2003; Torres *et al.*, 2006).

El principal sistema de protección frente a los ROS, es el ciclo de óxido-reducción del ascorbato-glutatión, metabolitos usados para neutralizarlos en una serie de reacciones enzimáticas (Noctor y Foyer, 1998). En piel expuesta al sol se ha reportado alto contenido de ascorbato y glutatión, así como alta actividad de las enzimas del ciclo en relación a piel no expuesta (Ma y Cheng, 2003). Así mismo, piel con daño por sol ha mostrado altos niveles de estos metabolitos (Chen *et al.*, 2008).

Frutos que han crecido en la periferia del árbol, con exposición solar permanente, han desarrollado un sistema de protección anti estrés foto-oxidativo más eficiente que aquellos que han crecido al interior del árbol (Ma y Cheng, 2003). Ello produce que el fruto no ambientado a exposición solar sea muy sensible a desarrollar daño por sol, una vez que es expuesto repentinamente al sol (Wünsche *et al.*, 2001).

En piel de frutos expuestos a luz solar previamente cubiertos con bolsas, se encontró rápida proliferación de ROS, así como, capacidad de foto protección, tanto en aquella con y sin daño por sol (Zhang *et al.*, 2015). Piel expuesta repentinamente a la luz solar fue incrementando el contenido de sus antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del sistema ascorbato-glutatión, hasta los 10 días, cuando alcanzó el mismo nivel que piel ambientada a radiación solar (Ma y Cheng, 2004).

Por otro lado, la síntesis de compuestos fenólicos fue estimulada por exposición a radiación solar directa en frutos previamente cubiertos con bolsa (Sun *et al.*, 2014). Frutos creciendo en un ambiente de alta exposición a la radiación solar (por su posición en el árbol), mostraron mayor contenido de cianidina-3-galactosido y quercetina-3-glicosido (Awad *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012). Sin embargo, Awad *et al.* (2001), encontraron un mismo nivel de catequinas y ácido clorogénico en frutos creciendo en diferentes posiciones en el árbol.

Pérdida de clorofila y aumento de carotenos se ha descrito en tejido dañado por sol (Wünsche *et al.*, 2001; Solovchenko *et al.*, 2006; Yuri *et al.*, 2010). Así mismo, piel de manzana expuesta repentinamente a luz solar, a los tres días post exposición mostró una reducción en su contenido de clorofila (Zhang *et al.*, 2015).

Conocer los cambios que se desencadenan en la piel expuesta repentinamente a condiciones conducentes a daño por sol, permitiría mejorar el entendimiento acerca de los mecanismos de respuesta al estrés foto-oxidativo y con ello al control del daño por sol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Material vegetal*

El ensayo se realizó en frutos en manzanos (*Malus domestica* Borkh.), cultivares Royal Gala y Red Fuji, plantados en 1992 y conducidos en Solaxe, en un huerto comercial de la zona de San Clemente, Región del Maule, Chile (35° 30' L.S.; 71° 28' L.O. 200 m.s.n.m.).

Se expusieron repentinamente a radiación solar directa frutos desde el interior del árbol, en dos momentos durante la temporada 2010/11. Además, se marcaron frutos creciendo en la periferia del árbol con exposición solar poniente. Los momentos de exposición fueron a los 81 y 114 días después de plena flor (DDPF). La plena flor ocurrió el 04 de octubre de 2010, para ambos cultivares. Las condiciones ambientales promedio durante el ensayo (80 a 125 DDPF), fueron: temperatura media de 20.0 °C, máxima de 29.3 °C y mínima de 11.4 °C; radiación solar total de 26.7 MJ m⁻²; y humedad relativa mínima de 30.3%. Hubo 21 días con temperatura máxima igual o mayor a 30 °C, es decir el 46% de los días.

Se muestreó piel al momento de exponer los frutos, y cada dos días, hasta una semana después. Para ello, se extrajeron muestras de piel con ayuda de un escarpelo, de la sección del fruto con diferente exposición a la radiación solar: lado expuesto al sol (EXP), lado no expuesto (No EXP), expuesto repentino (EXP-R), y se identificó separadamente el tejido expuesto repentino que mostró daño por sol (EXP-R daño).

La piel extraída se congeló en nitrógeno líquido inmediatamente después de recolectar la fruta y se almacenó a -80 °C, para su posterior análisis. Se consideraron 5 a 10 frutos por repetición y cinco repeticiones por condición. El tejido congelado en N₂ líquido fue molido y pesado en frío. Con él se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas.

2. *Determinación de ascorbato y glutatión*

Para las determinaciones de ascorbato y glutatión, 400 mg de tejido fresco congelado fue macerado con 1 mg PVPP y 3 mL 1 M HClO₄ y centrifugado a 12900 g por 10 minutos a 4 °C. En el sobrenadante obtenido se determinó ascorbato y glutatión. Para la determinación de ascorbato, a 400 µL de sobrenadante se le agregó 200 µL de buffer HEPES/KOH (pH 7.0) y K₂CO₃ hasta ajustar a pH 4-5. Para la determinación de glutatión, a 200 µL de sobrenadante se le agregó 100 µL de buffer HEPES/KOH (pH 7.0) y K₂CO₃ hasta ajustar a pH 6-7.

AsA y DHA fueron determinados por espectrofotometría en reacción cinética a 265 nm, con la adición de 1 unidad de ascorbato oxidasa (AO; Sigma-Aldrich, US; Torres *et al.*, 2006). Para la determinación de DHA, 100 µL de extracto se incubó por 5 minutos en hielo con 50 mM DTT en buffer 0.1 M Na₂HPO₄ pH 7.5. GSH y GSSG fueron determinados por espectrofotometría, por medio de reacción cinética a 412 nm, con adición de 1 unidad de GR (Sigma-Aldrich, US; Torres *et al.*, 2006).

3. *Determinación de clorofilas y carotenoides específicos*

Aproximadamente 0.1 g de piel fue extraída en 2 mL de acetona 100% e incubada a 4 °C durante 12-18 h. Las muestras fueron centrifugadas por tres minutos (14000 g) y recolectado el sobrenadante. Al resto de la muestra se le repitió el procedimiento anterior. Los sobrenadantes o extractos fueron combinados y luego filtrados (40 µL) e inyectados en un sistema Smartline HPLC-PDA (Knauer, Berlín, DE), equipado con una columna 100-5 C18

Kromasil de 250 mm×4.6mm×5µm, con una precolumna de similares características. Los cromatogramas fueron monitoreados a 430, 450 y 470 nm. Para la fase móvil se utilizó acetonitrilo: metanol (90%:10%; Solvente A); etiloacetato (90%:10%; B) y metanol (100%; C). El gradiente usado fue: 0-10 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 0.7 mL minutos⁻¹; 10-11 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 0.1 mL minutos⁻¹; 40 minutos: A (15%), B (85%), C (0%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 40-41 minutos: A (15%), B (15%), C (70%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 44 minutos: A (15%), B (15%), C (70%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 45 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 47 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 0.7 mL minutos⁻¹; 50 minutos: A (93%), B (7%), C (0%) a 0.7 mL minutos⁻¹. Los resultados fueron expresados en mg por kg de muestra (PF). Los estándares para la identificación de los compuestos fueron provistos por Merck (Darmstadt, DE) y Extrasynthese (Lyon, FR).

4. Determinación de fenoles específicos

La determinación de los flavonoides específicos: catequina, epicatequina y quercetinas glicosiladas (Q-glucosido, xilosa, rutinósido, galactósido, ramnósido), se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para esto, se utilizó un extracto de 0.1 g de muestra en N₂ líquido en 1.0 mL etanol 80%. Luego, la muestra fue filtrada (20 µL) e inyectada al sistema Smartline HPLC-PDA (Knauer, Berlín, DE), equipado con una columna Kromasil 100-5 C18 (250 mm×4.6 mm×5 µm), y con detector de arreglo de fotodiodo (Hernandez *et al.*, 2014).

La fase móvil estuvo compuesta por ácido fórmico (1%) en H₂O (solvente A), acetonitrilo (40%) en H₂O (B), y acetonitrilo (100%; C). El gradiente de elución usado fue: 0-10 minutos: A (70%), B (30%), C (0%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 45 minutos: A (25%), B (75%), C (0%) a 0.5 mL minutos⁻¹; 46 minutos: A (5%), B (75%), C (20%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 50 minutos: A (0%), B (70%), C (30%) a 0.5 mL minutos⁻¹; 52 minutos: A (0%), B (50%), C (50%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 55 minutos: A (70%), B (30%), C (0%) a 1.0 mL minutos⁻¹; 58 minutos: A (70%), B (30%), C (0%) a 0.5 mL minutos⁻¹. Los flavonoides específicos fueron medidos a 256 nm, identificados según el estándar Merck (Darmstadt, DE) y expresados como µg g⁻¹ PF.

5. Diseño estadístico

El muestreo de los frutos se realizó en el marco de un diseño completamente al azar. Se consideraron 3-5 repeticiones por condición de exposición. Para comparar el efecto de la exposición (EXP, No-EXP, EXP-R, EXP-R daño) sobre las variables medidas, se calculó el error estándar, en cada fecha de muestreo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Antioxidantes no enzimáticos: ascorbato y glutati6n

El contenido de ascorbato total (AsA+DHA) mostr6 la tendencia m6s clara entre los metabolitos estudiados y se muestra en la Figura 1. En la primera fecha de exposici6n (81 DDPF), el contenido de AsA+DHA en la piel con exposici6n repentina (EXP-R), de ambos cultivares mostr6 un alza a los 7 d6as despu6s de la exposici6n (Figura 1). En Royal Gala, tanto en la primera fecha de exposici6n (81 DDPF) como en la segunda (114 DDPF), la piel

EXP-R registró los valores más altos de AsA+DHA, por sobre la expuesta (EXP) y la no expuesta (No EXP), aunque su evolución fue similar a la de éstas (Figura 1). En el caso de Fuji, en la segunda fecha de exposición, EXP-R mostró una caída del contenido de AsA+DHA luego del día 3 post exposición, y el mayor nivel de estos metabolitos se registró en piel EXP durante el día 6 (Figura 1).

En la segunda fecha de exposición repentina, se registró síntoma de daño por sol en los frutos expuestos repentinamente (EXP-R daño), y en ambos cultivares el contenido de ascorbato total en este tejido dañado disminuyó entre el día 6 y 8 post exposición (Figura 1). En relación al contenido de glutatión, éste no se logró detectar vía espectrofotometría. El aumento del contenido de AsA+DHA registrado en el tejido EXP-R concuerda con Zhang *et al.* (2015), quienes encontraron un aumento de AsA+DHA en frutos de Fuji embolsados, luego de tres días de re-exposición a radiación solar. La proliferación de ROS en el tejido expuesto repentinamente a luz solar (Zhang *et al.*, 2015), estimularía la síntesis de metabolitos antioxidantes. Sin embargo, prevaleciendo condiciones de alta radiación y temperatura, los metabolitos antioxidantes se reducirían (Torres *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015), y los ROS acumulados en exceso causarían el daño foto-oxidativo (Chen *et al.*, 2008).

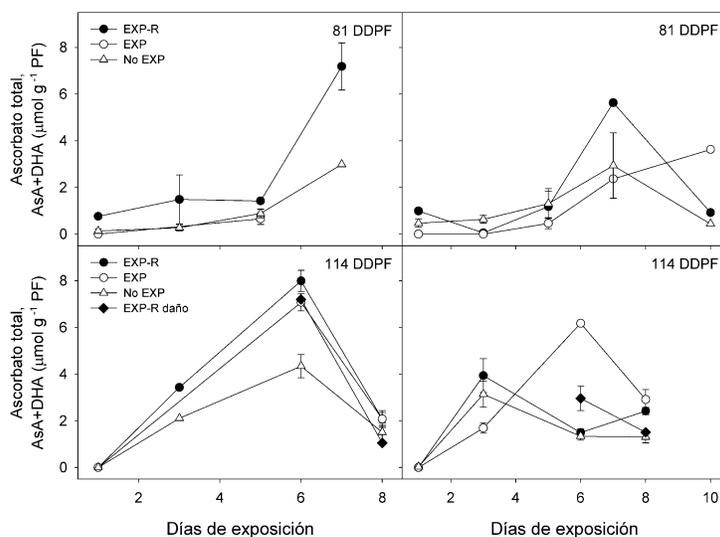


Figura 1. Contenido de ascorbato total: ácido ascórbico (AsA)+dehidroxiascorbato (DHA), en piel de frutos Royal Gala (izquierda) y Red Fuji (derecha), expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP), no expuesto (No EXP) y expuesto repentinamente con daño por sol leve (EXP-R daño). Barras indican error estándar.

2. Clorofilas y carotenoides específicos

En la primera fecha de exposición repentina (81 DDPF), los pigmentos clorofila *a* y *b* observaron una caída en su concentración en la piel EXP-R de frutos Royal Gala, si bien mostraron un aumento a los 10 días después de la exposición (Figuras 2 y 3). En Fuji, el tejido EXP-R mostró una caída inicial de clorofila, para luego llegar al nivel del resto de los tratamientos.

El contenido de carotenos (α y β), se comportó de manera similar a la clorofila (Figuras 4 y 5). En la primera fecha de exposición (81 DDPF), tanto en Royal Gala como en Fuji, la tendencia fue un bajo contenido de carotenos en la piel EXP-R y a diferencia de la clorofila, sin cambios post exposición (Figuras 4 y 5). Una situación similar se registró en la segunda fecha de exposición (114 DDPF) en Red Fuji (Figuras 4 y 5). El contenido de carotenos fue muy variable en los tejidos ambientados (EXP y No EXP), sin embargo, mostró menos variación en la piel EXP-R (Figuras 4 y 5). En Royal Gala fue más clara esta situación, sobre todo a los 81 DDPF, cuando los niveles de carotenos cayeron y se mantuvieron por debajo de los otros tejidos en los primeros 10 después de la exposición (Figuras 4 y 5).

Son numerosos los reportes que describen una caída de clorofila y un aumento de la concentración de β -caroteno en tejido con daño por sol (Wünsche *et al.*, 2001; Solovchenko *et al.*, 2006; Felicetti y Schrader, 2009a; Yuri *et al.*, 2010). Yuri *et al.* (2010), reportaron una caída de la relación clorofila/carotenos en piel de manzanos, a medida que aumentaba el daño por sol, dado por una rápida degradación de la clorofila comparada con los carotenos durante el *photobleaching* (Wünsche *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2006; Yuri *et al.*, 2010). Por otro lado, Zhang *et al.* (2015), encontraron una disminución de clorofila a los tres días después de re-exponer frutos Fuji embolsados a radiación solar.

Se podría señalar que piel repentinamente expuesta a un nivel de estrés foto-oxidativo moderado, tal que pueda recuperar su concentración de clorofila y manteniendo o aumentando la de caroteno, aquella no alcanzaría a desarrollar síntomas de daño por sol. Monitoreo del contenido de clorofila por medios no destructivos podría convertirse en una herramienta de predicción del desarrollo de daño por sol, con el uso de técnicas como fluorescencia de la clorofila (Wünsche *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2006; Wand *et al.*, 2008; Tartachnyk *et al.*, 2012), o reflectancia espectral (Merzlyak *et al.*, 2002; 2005).

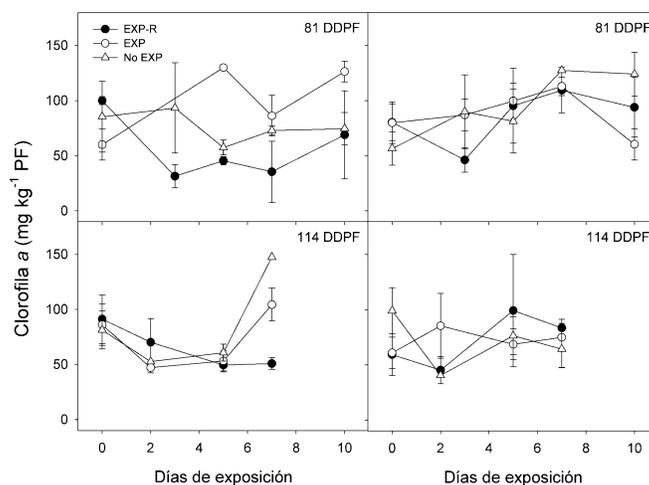


Figura 2. Contenido de Clorofila *a* en piel de frutos Royal Gala (izquierda) y Red Fuji (derecha), expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP) y no expuesto (No EXP). Barras indican error estándar.

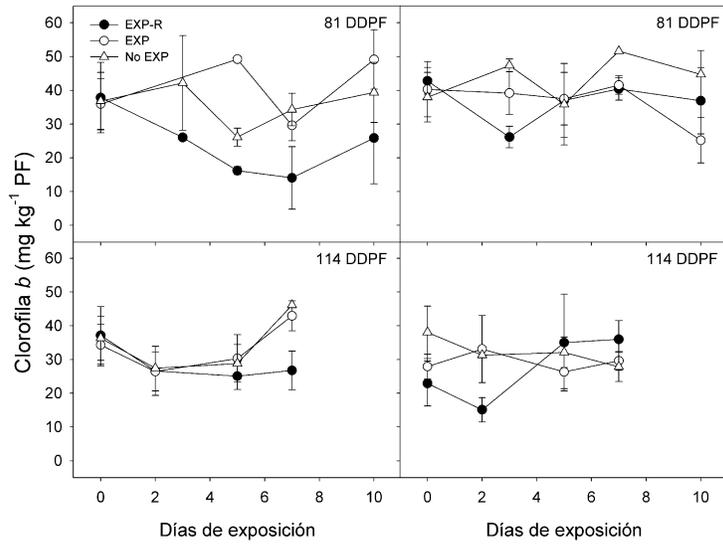


Figura 3. Contenido de Clorofila *b* en piel de frutos Royal Gala (izquierda) y Red Fuji (derecha), expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP) y no expuesto (No EXP). Barras indican error estándar.

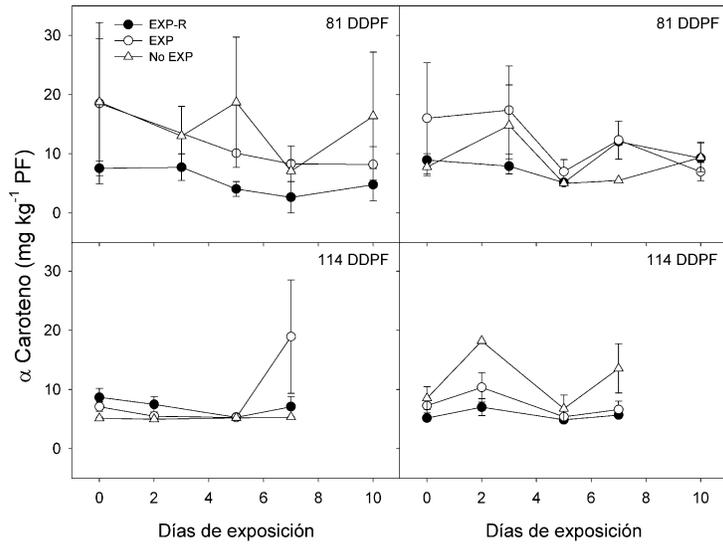


Figura 4. Contenido de α Caroteno en piel de frutos Royal Gala (izquierda) y Red Fuji (derecha), expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP) y no expuesto (No EXP). Barras indican error estándar.

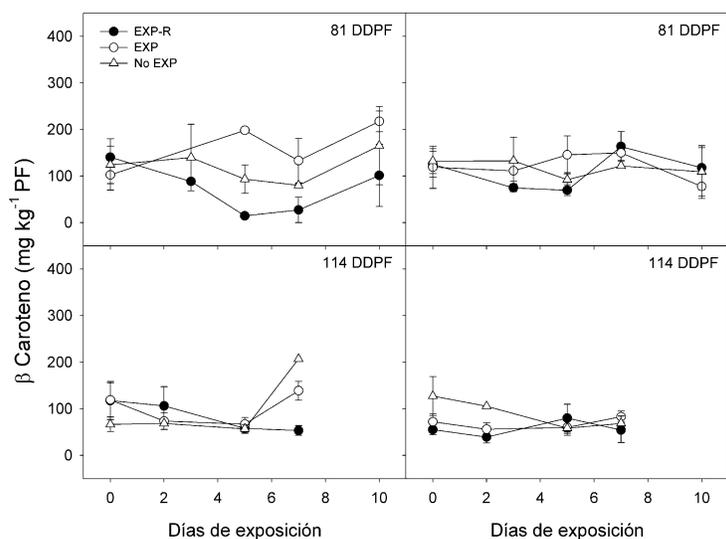


Figura 5. Contenido de β Caroteno en piel de frutos Royal Gala (izquierda) y Red Fuji (derecha), expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP) y no expuesto (No EXP). Barras indican error estándar.

3. Fenoles específicos

El contenido de ácido clorogénico fue errático en Royal Gala. En la primera fecha de exposición repentina (81 DDPF), se incluyeron los frutos expuestos repentinamente (EXP-R) que desarrollaron daño por sol leve (EXP-R daño). El ácido clorogénico fue alto en este tejido dañado (Figura 6), mayor que en EXP-R y similar al que se encontraba ambientado a luz solar (EXP). En la segunda fecha de exposición (114 DDPF), el contenido de ácido clorogénico mostró la tendencia a ser mayor en EXP que en EXP-R.

En Fuji, durante la primera fecha de exposición el contenido de ácido clorogénico fue mayor en la piel ya expuesta (EXP), con excepción de lo registrado en el día 10 después de la exposición (Figura 6). En la segunda fecha de exposición repentina, el contenido de ácido clorogénico fue menor que la fecha anterior de exposición, y no mostró cambios con el transcurso de los días post exposición (Figura 6).

El alto contenido de ácido clorogénico en el tejido dañado por sol, concuerda con lo encontrado por Wünsche *et al.* (2001), Felicetti y Schrader (2009b) y Zupan *et al.* (2014). Estos autores describieron un mayor contenido de ácido clorogénico, a medida que aumentó la severidad del daño.

Lancaster *et al.* (2000), con irradiación UV-B indujeron una mayor síntesis de ácido clorogénico en piel de fruto creciendo a la sombra que en piel ambientada a luz solar. Por otro lado, Sun *et al.* (2014), encontraron que el contenido de ácido clorogénico varió de acuerdo al cultivar, en respuesta a exposición repentina a radiación solar. Sin embargo, en el presente estudio no se observó una respuesta clara a la exposición repentina, en el contenido de ácido clorogénico. Por otro lado, el reducido contenido de ácido clorogénico mostrado por Fuji podría indicar una menor protección sobre el estrés foto-oxidativo (Wünsche *et al.*, 2001). Li *et al.* (2012) y Sun *et al.* (2014), describieron una disminución de la concentración de fenoles a medida que madura el fruto, consecuente con el registro de

menor contenido de ácido clorogénico y catequina en la segunda fecha de exposición (Figura 6). La síntesis de polifenoles que estaría regulada por alta irradiación (Awad *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012), disminuiría junto con la radiación solar incidente luego del solsticio de verano.

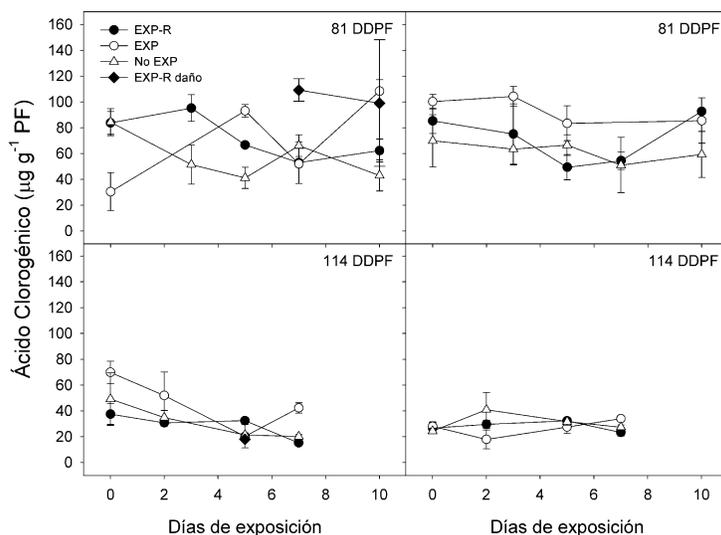


Figura 6. Contenido de ácido clorogénico en piel de frutos Royal Gala (izquierda) y Red Fuji (derecha), expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP), no expuesto (No EXP) y expuesto repentinamente con daño por sol leve (EXP-R daño). Barras indican error estándar.

El contenido de catequinas mostró una tendencia similar al ácido clorogénico (Figura 7). Durante la primera fecha de exposición (81 DDPF), se observó una disminución en los días post exposición en aquella piel expuesta repentinamente (EXP-R). Se registró el valor más alto en tejido dañado de Royal Gala (Figura 7).

En relación al contenido de epicatequinas, se observó un aumento de estos compuestos en el tejido EXP-R, así como en el dañado (EXP-R daño), durante la primera fecha de exposición repentina (Figura 8). Sin embargo, en Red Fuji, el tejido sin exposición (No EXP), también mostró un aumento del contenido de sus epicatequinas a los 7 días después de la exposición. En efecto, en esta fecha de exposición, la piel No EXP mostró valores más altos de epicatequina que la EXP.

Si bien es reconocido un rol foto protector de los fenoles sobre la radiación UV (Lancaster *et al.*, 2000; Solovchenko y Merzlyak, 2008), los estudios que han incluido catequina y epicatequina, han reportado resultados diversos (Awad *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014; Zupan *et al.*, 2014). Zupan *et al.* (2014), encontraron similar contenido de estos flavanoles en tejido con diferente exposición solar, incluidos aquellos con daño por sol, en manzanas Braeburn. En cambio, en Golden Delicious, encontraron un menor nivel sólo en fruto del interior del árbol. Awad *et al.* (2001), reportaron que la acumulación de flavanoles fue independiente de la radiación solar incidente. Así también, Sun *et al.* (2014), registraron

un leve aumento del contenido de catequina y nulo del de epicatequina, como respuesta a exposición repentina a luz solar. En base a lo encontrado en este estudio, no se debería descartar la acumulación, sobre todo de epicatequina, como respuesta protectora al exceso de radiación solar. Por otro lado, hay que notar la baja respuesta en EXP-R, así como el bajo contenido en el resto de los tejidos de Fuji, de ácido clorogénico, catequina y epicatequina, durante la segunda fecha de exposición repentina (Figuras 6, 7 y 8). Ello podría indicar un aspecto varietal vinculado al estado fenológico que limitaría la acumulación de fenoles en respuesta a alta radiación. Asunto necesario de ser abordado por próximos estudios.

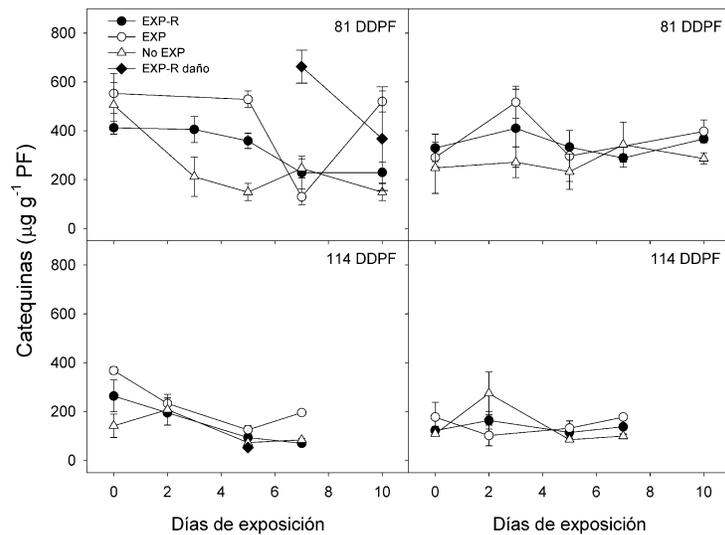


Figura 7. Contenido de catequinas en piel de frutos Royal Gala (izquierda) y Red Fuji (derecha), expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP), no expuesto (No EXP) y expuesto repentinamente con daño por sol leve (EXP-R daño). Barras indican error estándar.

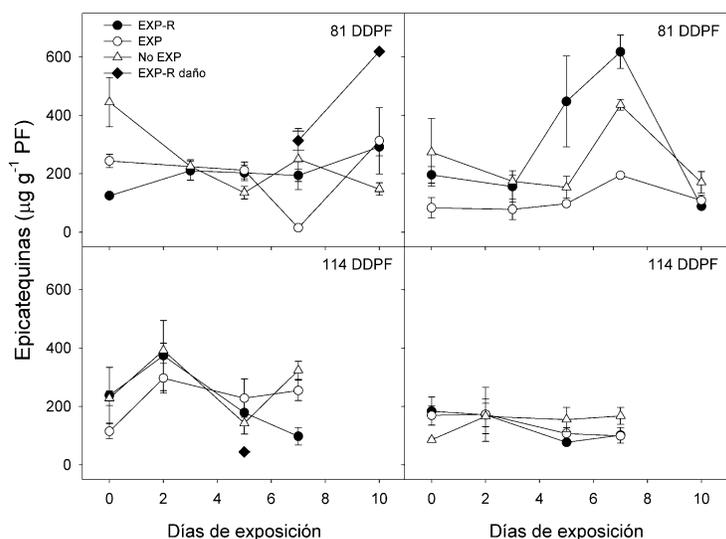


Figura 8. Contenido de epicatequinas en piel de frutos Royal Gala (izquierda) y Red Fuji (derecha), expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP), no expuesto (No EXP) y expuesto repentinamente con daño por sol leve (EXP-R daño). Barras indican error estándar.

En el caso de las quercetinas (Q) glicosiladas, en Royal Gala se observó un mayor contenido en la piel expuesta (EXP), seguido por el tejido expuesto repentinamente (EXP-R), y con menor contenido de estos fenoles se encontró el tejido no expuesto (No EXP; Figura 9). Se advirtió un aumento de los niveles de Q glicosiladas en la piel EXP-R, luego de ser expuesta a radiación en forma repentina; sin embargo, este alza pareció disminuir y estabilizarse en el tiempo (Figura 9). Este aumento fue más evidente en la primera fecha de exposición (81 DDPF), que a los 114 DDPF (Figura 9). En la primera fecha de exposición repentina, se registró daño en la piel EXP-R de Royal Gala (EXP-R daño), la que mostró un alto contenido de estos compuestos fenólicos (Figura 9).

En Fuji se registró una tendencia similar a Royal Gala, en el contenido de las Q glicosiladas; es decir, mayor contenido en EXP, seguido por EXP-R, que mostró un incremento en el tiempo post exposición, y el menor contenido se cuantificó en el tejido No EXP (Figura 10). Sin embargo, en este cultivar se observó una caída en el contenido de todas las Q glicosiladas en el día 7 después de la primera exposición (Figura 10).

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Sun *et al.* (2014), quienes encontraron un aumento de Q glicosiladas específicas como respuesta a exposición solar repentina, en frutos desembolsados por 9 días. Estos autores describieron una disminución en el contenido de estos compuestos a través de la temporada, lo que podría explicar las menores cantidades registradas en la segunda fecha de exposición (114 DDPF; Figuras 9 y 10). Alto contenido de quercetina asociado a daño por sol se ha descrito ampliamente en manzano (Wünsche *et al.*, 2001; Felicetti y Schrader, 2009b; Yuri *et al.*, 2010). Zhang *et al.* (2015), después de tres días de exposición a luz solar de frutos previamente embolsados Fuji, encontraron en ellos un incremento de flavonoides (Cianidina-3-glicosido y quercetina-3-glicosido). Awad *et al.*

(2001) y González-Talice *et al.* (2013), han descrito alto contenido de flavonoides en frutos creciendo en posición con alta exposición solar en el árbol.

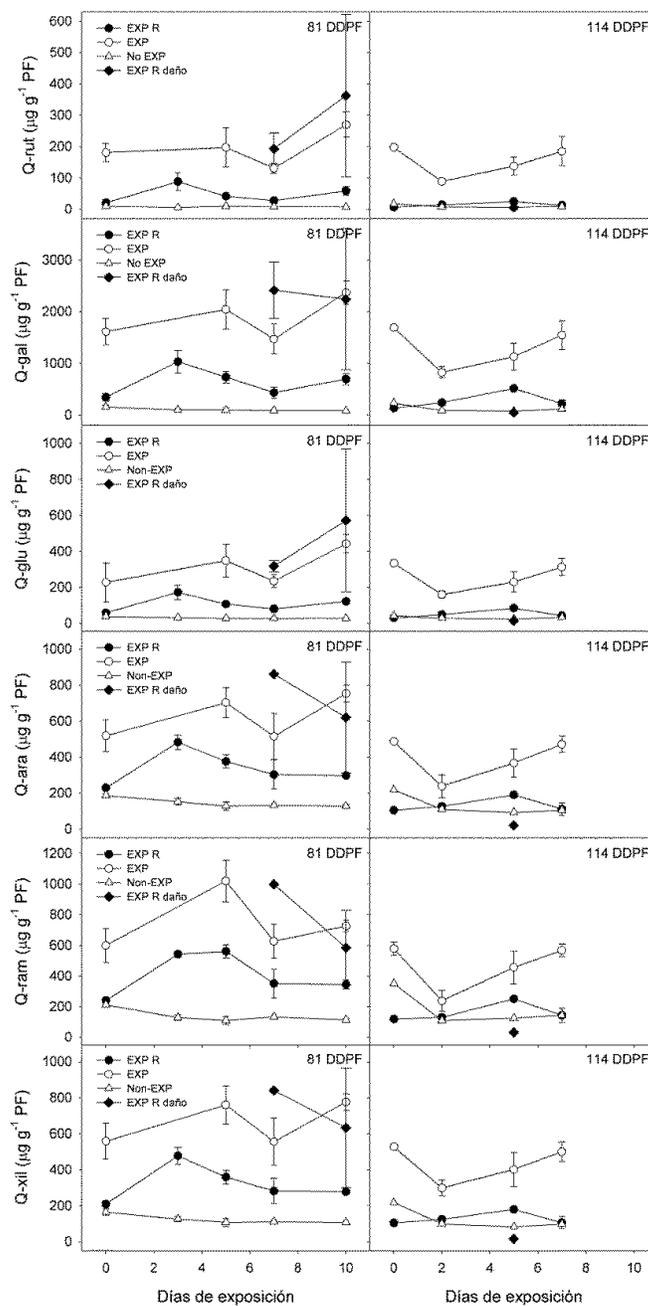


Figura 9. Quercetinas (Q) glicosiladas en piel de frutos Royal Gala expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP), no expuesto (No EXP) y expuesto repentinamente con daño por sol leve (EXP-R daño). Barras indican error estándar.

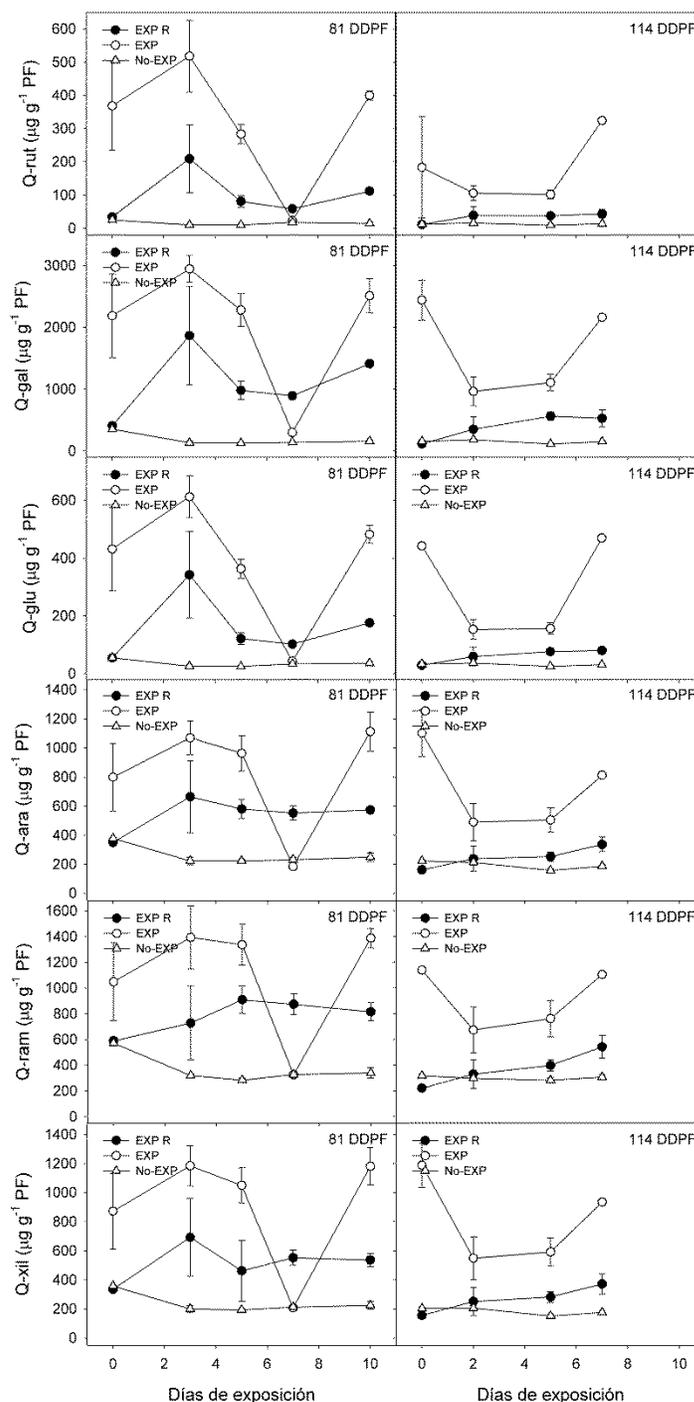


Figura 10. Quercetinas (Q) glicosiladas en piel de frutos Red Fuji expuestos repentinamente a radiación solar directa, a los 81 y 114 DDPF. Secciones del fruto con diferente exposición: expuesto repentinamente (EXP-R), expuesto (EXP) y no expuesto (No EXP). Barras indican error estándar.

Este aumento de las Q glicosiladas en respuesta a la radiación solar, constituiría parte importante del mecanismo no enzimático defensivo frente el estrés foto-oxidativo,

concordando con Felicetti y Schrader (2009b) y Yuri *et al.* (2010). El mayor alza de estos flavonoles en la primera fecha de exposición repentina indicaría una efectiva respuesta a la radiación UV incidente, puesto que estos compuestos muestran una absorción máxima en este rango del espectro (Solovchenko y Merzlyak, 2008). Ello conduciría a un mayor nivel de protección contra el estrés foto-oxidativo. Así también, la menor respuesta en la segunda fecha de exposición repentina, podría evidenciar la síntesis de otros compuestos, tal como antocianinas.

4. CONCLUSIONES

La ambientación del fruto a la alta carga radiativa del verano, estaría constituida principalmente por flavonoles (quercetinas). El aumento en la concentración de quercetinas glicosiladas durante la exposición repentina del fruto, indicaría que éstas constituyen un componente principal del sistema defensivo no enzimático en respuesta a estrés foto-oxidativo en manzanos.

Un menor contenido y respuesta en la síntesis de fenoles podría potenciar el riesgo por desarrollar daño por sol a medida que los frutos crecen en la temporada.

5. REFERENCIAS

- Awad, M.A., Wagenmakers, P.S., de Jager, A. 2001. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. *Scientia Horticulturae* 88: 289-298.
- Barber, H.N., Sharpe, P.J.H. 1971. Genetics and physiology of sunscald of fruits. *Agricultural Meteorology* 8: 175-191.
- Chen, L-S., Li, P., Cheng, L. 2008. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta* 228:745-756.
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E. 2009a. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. I. Chlorophylls and carotenoids. *Plant Science* 176: 78-83.
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E. 2009b. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. II. Phenolics. *Plant Science* 176: 84-89.
- Foyer, C.H., Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155: 2-18.
- González-Talice, J., Yuri, J.A., del Pozo, A. 2013. Relations among pigments, color and phenolic concentrations in the peel of two Gala Apple strains according to canopy position and light environment. *Scientia Horticulturae* 151: 83-89.
- Hernandez, O., Torres, C.A., Moya-León, M.A., Opazo, M.C., Razmilic, I. 2014. Roles of the ascorbate-glutathione cycle, pigments and phenolics in postharvest 'sunscald' development on 'Granny Smith' apples (*Malus domestica* Borkh.). *Postharvest Biology and Technology* 87: 79-87.

- Lancaster, J.E., Reay, P.F., Norris, J., Butler, R.C. 2000. Induction of flavonoids and phenolic acids in apple by UV-B and temperature. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 75: 142-148.
- Li, P., Ma, F., Cheng, L. 2012. Primary and secondary metabolism in the sun-exposed peel and shaded peel of apple fruit. *Physiologia Plantarum* 148: 9-24.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 603: 591-592.
- Ma, F., Cheng, L. 2003. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophylls cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Science* 165: 819-827.
- Ma, F., Cheng, L. 2004. Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophylls cycle and the ascorbate-glutathione cycle. *Plant Science* 166: 1479-1486.
- Ma, Y-H., Ma, F-W., Zhang, J-K., Li, M-J., Wang, Y-H., Liang, D. 2008. Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle in apple leaves. *Plant Science* 175: 761-766.
- Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E., Chivkunova, O.B. 2002. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 679-684.
- Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E., Smagin, A.I., Gitelson, A.A. 2005. Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: Spectral features and technique for non-destructive assessment. *Journal of Plant Physiology* 151-160.
- Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:249-79.
- Rabinowitch, H.D., Kedar, N., Budowski, P. 1974. Induction of sunscald damage in tomatoes under natural and controlled conditions. *Scientia Horticulturae* 2: 265-272.
- Solovchenko, A.E., Avertcheva, O.V., Merzlyak, M.N. 2006. Elevated sunlight promotes ripening-associated pigment changes in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 40: 183-189.
- Solovchenko, A.E., Merzlyak, M.N. 2008. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 719-737.
- Sun, S., Xin, L., Gao, H., Wang, J., Li, P. 2014. Response of phenolic compounds in 'Golden Delicious' and 'Red Delicious' apple peel to fruit bagging and subsequent sunlight re-exposure. *Scientia Horticulturae* 168: 161-167.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 782 p.
- Tartachnyk, I., Kuckenber, J., Yuri, J.A., Noga, G. 2012. Identifying fruit characteristics for non-invasive detection of sunburn in apple. *Scientia Horticulturae* 134: 108-113.
- Torres, C.A., Andrews, P.K., Davies, N.M. 2006. Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *Journal of Experimental Botany* 57: 1933-1947.

- Wand, S.J.E., Theron, K.I., Ackerman, J., Marais, S.J.S. 2006. Harvest and post-harvest apple fruit quality following applications of kaolin particle film in South African orchards. *Scientia Horticulturae* 107: 271–276.
- Wand, S.J.E., van der Dool, K., Smit, A., Steyn, W.J. 2008. Heat injury thresholds in apple measured using chlorophyll fluorescence are influenced by orchard heat reduction technologies. *Acta Horticulturae* 772: 273-277.
- Wünsche, J.N., Greer, D.H., Palmer, J.W., Lang, A., McGhie, T. 2001. Sunburn—The cost of a high light environment. *Acta Horticulturae* 557: 349-356.
- Yuri, J.A., Torres, C., Vásquez, J. 2000. Golpe de sol en manzanas. I. Evaluación del daño y métodos de control. *AgroCiencia* 16: 13-21.
- Yuri, J.A., Neira, A., Quilodran, A., Razmilic, I., Motomura, Y., Torres, C., Palomo, I. 2010. Sunburn on apples is associated with increases in phenolic compounds and antioxidant activity as a function of the cultivar and areas of the fruit. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8: 920-925.
- Yuri, J.A. 2010. Daño por sol en manzanas. *Revista de Fruticultura* 8: 4-15.
- Zhang, J., Niu, J., Duan, Y., Zhang, M., Liu, Z., Li, P., Ma, F. 2015. Photoprotection mechanism in the 'Fuji' apple peel at different levels of photooxidative sunburn. *Physiologia Plantarum* 154: 54-65.
- Zupan, A., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Verberic, R. 2014. Individual phenolic response and peroxidase activity in peel of differently sun-exposed apple in the period favorable for sunburn occurrence. *Journal of Plant Physiology* 171: 1706-1712.

IV. CONCLUSIONES FINALES

El sistema antioxidante ascorbato-glutatión constituiría una respuesta inmediata a la proliferación de las especies reactivas de oxígeno. Este mecanismo perdería eficacia con la persistencia de la alta carga energética radiativa por tiempo prolongado, lo que sucedería en veranos secos y con alta temperatura, como son habituales en la zona central de Chile.

La acumulación de fenoles, principalmente quercetinas, y carotenos en tejido dañado, así como en aquel expuesto repentinamente a radiación solar directa, constituiría un mecanismo de protección en el largo plazo o ambientación del fruto a condiciones de estrés foto-oxidativo.

Una baja acumulación de fenoles podría potenciar el riesgo por desarrollar daño por sol, a medida que los frutos crecen en la temporada. Ello podría influir en el mayor daño por sol registrado en cultivares tardíos, como Fuji.

Frutos sin ambientación, con bajo contenido fenólico, al exponerlos repentinamente a alta radiación solar y temperatura, rápidamente se dañarían, puesto que el sistema ascorbato-glutatión sería superado por la persistencia de condiciones estresantes por varias horas.

La diferencia en el contenido de carotenos en favor de Gala, podría evidenciar un aspecto varietal en la respuesta al estrés foto-oxidativo.