

**Universidad Nacional del Comahue**  
**Facultad de Ciencias Agrarias**



**Efecto de la inhibición del etileno en el  
metabolismo oxidativo de manzanas con síntomas  
de estrés por alta radiación solar durante la  
poscosecha**

**Trabajo de tesis para optar por el título de magister en ciencias agrarias y  
biotecnología**

**Ing. Agr. Michay Manuel Mantegna**

**Directora: Ing. Agr. Mg. Graciela Maria Colavita**

**Codirectora: Ing. Agr. Dra. Gabriela Calvo**

**2019**



---

## AGRADECIMIENTOS

En la presente sección, quiero agradecer a las personas que me han acompañado y ayudado a través de las diversas etapas que tuvo este proceso de cursar y realizar la tesis de la maestría de Ciencias Agrarias y Biotecnología. También quisiera destacar el orgullo de haber podido realizado este posgrado en el lugar que considero mi segunda casa, la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue. Además de lo académico, este espacio me permitió conocer a excelentes personas, algunas de las cuales se han convertido al día de hoy en muy buenos amigos.

Por todo esto quisiera agradecer:

Con enorme cariño a Graciela Colavita, quien no solo fue mi directora, sino que también es una gran amiga y consejera que me ayudó en cada momento.

A mi amiga Laura Vita, con quien realizamos numerosos trabajos durante el cursado y ha sido siempre un ejemplo para mí, a quien admiro mucho como profesional de la agronomía.

Por su invaluable ayuda a todo el equipo de la cátedra de Fisiología Vegetal integrado por Nidia González, Dolores Del Brío, Nazarena Spera, Valeria Blackhall y Ximena Mondaca.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue y a todo su equipo que participo en esta Maestría.

A Christian López, quien organizó e hizo posible la realización de este posgrado internacional en nuestra facultad.

A todos los docentes de la maestría por su dedicación y vocación para transmitir sus conocimientos.

Al Consejo Profesional de Ingenieros Agrónomos (CPIA) por becarme para poder llevar adelante esta maestría.

Al INTA, especialmente a Gabriela Calvo, Teo Gomila y Vanesa Ascencio, quienes fueron sumamente importantes para ayudarme a evaluar varios parámetros de mi tesis.

A Pablo Reeb, quien me ayudo con el análisis estadístico de los datos.

---

A Pablo Cervi por suministrarme materiales como cajas y bandejas para la conservación de los frutos.

A la empresa Tres Ases por aportarme la fruta de sus chacras para mis estudios.

A Leandro Pisano, quien me ayudo con la aplicación del 1-MCP y la conservación de la fruta.

A todos mis compañeros que hicieron del cursado una experiencia muy amena.

Por último, quiero agradecer a mi familia y a mi novia, quienes siempre me han dado su enorme cariño y me han apoyado en todo.

**Ing. Agr. M.Sc. Graciela M. Colavita**

**Ing. Agr. Dra. Gabriela Calvo**

---

**Certifican que:**

El maestrando Michay Manuel Mantegna ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis cuyo título es "*Efecto de la inhibición del etileno en el metabolismo oxidativo de manzanas con síntomas de estrés por alta radiación solar durante la poscosecha*" la cual se encuentra finalizada y en condiciones de ser presentada.

Y para que conste a todos los efectos del interesado se expide el presente certificado en Cinco Saltos a los 7 días de mes de Febrero del año 2019.

**Directora**

**Ing. Agr. M.Sc. Graciela M. Colavita**

**Co-Directora**

**Ing. Agr. Dra. Gabriela Calvo**

---

## RESUMEN

La variedad de manzana Granny Smith ocupa el segundo lugar a nivel productivo en la región del Alto Valle de Río Negro. Esta variedad se caracteriza por ser de larga conservación y el uso de inhibidores de etileno constituye una tecnología de manejo habitual. Sus frutos son susceptibles a desarrollar en las caras expuestas la fisiopatía daño de sol causada por la exposición a elevada radiación solar. Este factor ambiental frecuentemente alcanza niveles estresantes durante el desarrollo de los frutos. En estas condiciones, la producción de especies reactivas de oxígeno en los tejidos vegetales no puede ser neutralizada por los sistemas de defensa antioxidante, originando el daño en la piel de los frutos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto que tiene la inhibición del etileno en los procesos oxidativos durante la conservación refrigerada de frutos de manzanas Granny Smith, que presentan síntomas de estrés por alta radiación solar. Durante la cosecha comercial, se seleccionaron frutos sanos (S-N) y frutos que presentaron un sector de piel con daño de sol leve (DS1-N). Luego, en frutos de ambas categorías, se inhibió la acción del etileno a través de la aplicación de 800 ppb de 1-MCP generando los tratamientos: sano con etileno inhibido (S-I) y daño de sol leve con etileno inhibido (DS1-I). En los cuatro tratamientos se evaluó la producción de etileno, el metabolismo oxidativo y la calidad de los frutos a cosecha, y después de 90 y 180 días de conservación en cámara frigorífica de atmósfera convencional (0 °C +/- 1°C y 95% de humedad relativa). La aplicación de 1-MCP provocó la inhibición de la producción de etileno en frutos sanos y con daño de sol hasta los 180 días de conservación refrigerada y su efecto permaneció luego de ser expuestos por 23 días a temperatura ambiente. La respuesta en el metabolismo oxidativo de los frutos DS1-N y DS1-I fue similar durante su conservación. La capacidad antioxidante y la actividad de la enzima SOD en los tejidos con daño de sol (DS1-N y DS1-I) fue mayor que en los sanos (S-N y S-I) tanto a cosecha como en conservación. La inhibición del etileno (DS1-I y S-I) condicionó la concentración de alfa-farnesenos generando menor sustrato disponible para la oxidación a trienos conjugados. La calidad de los frutos fue afectada tanto por el nivel de daño de sol, como por la inhibición del etileno. Los frutos DS1-N y DS1-I presentaron mayor firmeza de pulpa y contenido de sólidos solubles con respecto a los sanos. Los frutos DS1-I presentaron más temprano y con mayor intensidad la fisiopatía escaldado de sol durante la conservación refrigerada. Los resultados obtenidos en esta tesis generan antecedentes que permitirán profundizar el estudio de la influencia del etileno durante la conservación refrigerada en el metabolismo oxidativo de frutos de manzana desarrollados bajo situaciones de estrés por alta radiación solar.

---

## ABSTRACT

Granny Smith occupies the second place of Río Negro Upper Valley apple production. This variety has a long storage capability, and ethylene inhibitors application is an usual management technology during this process. Granny Smith's apples are susceptible to develop sunburn; caused by the exposure of fruits to high solar radiation. This environmental factor frequently reaches stressful levels during fruit development and, in such conditions, the production of reactive oxygen species of plant's tissues cannot be neutralized by its antioxidant defense systems, which result on fruit's skin damage. The objective of the present work was to study the effect of ethylene inhibition within oxidative processes that occurs during refrigerated conservation of Granny Smith apples with symptoms of high solar radiation stress. During commercial harvest, healthy fruits (S-N) and mild sunburn (DS1-N), were selected. Then, in both categories fruits, ethylene action was inhibited by 800 ppb of 1-MCP; resulting the treatments: healthy fruit with inhibited ethylene action (S-I) and mild sunburn with inhibited ethylene action (DS1-I). On these treatments were evaluated: ethylene production, oxidative metabolism and fruit quality at harvest, and after 90 and 180 days of cold storage under conventional atmosphere conditions (0 °C +/- 1 °C and 95% RH). 1-MCP application inhibited ethylene production, in healthy and sunburn fruits up to 180 days in cold storage. This inhibition stayed even after room temperature expose during 23 days. Oxidative metabolism response of DS1-N and DS1-I fruits was similar during conservation, while the antioxidant capacity and SOD activity in sunburn tissues (DS1-N and DS1-I) was higher than in healthy fruits (S-N and S-I) at harvest and during conservation. Ethylene inhibition (DS1-I and S-I) conditioned alpha-farnesenes concentration reducing substrate to be oxidized to conjugated trienes. Fruit quality was affected by sun damage level and ethylene inhibition. DS1-N and DS1-I fruits showed higher pulp firmness and soluble solids content. The DS1-I fruits during their refrigerated storage presented the physiopathy known as sunscald in an earlier and more intense manner. The results obtained from this thesis generate precedents that we hope will allow to deepen the study of ethylene influence on oxidative metabolism that occurs during refrigerated conservation of apples developed under stress conditions by exposure to high solar radiation.

---

## RÉSUMÉ

La variété de pomme Granny Smith se classe deuxième au niveau de la production dans L'Alto Valle de Rio Negro. Cette variété se caractérise par une longue conservation et l'utilisation d'inhibiteurs d'éthylène il est une technologie de manipulation habituelle. Ses fruits sont susceptibles de développer sur les faces exposées les dommages physiopathiques du soleil causés par une exposition à un rayonnement solaire élevé. Ce facteur environnemental atteint fréquemment des niveaux de stress au cours du développement des fruits. Dans ces conditions, la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les tissus végétaux ne peut pas être neutralisé par les systèmes de défense anti-oxydants, ce qui pourrait endommager la peau des fruits. L'objectif du présent travail était d'étudier l'effet de l'inhibition de l'éthylène dans les processus d'oxydation lors de la conservation réfrigérée de pommes Granny Smith, qui présentent des symptômes de stress dû à un rayonnement solaire élevé. Au cours de la récolte commerciale, des fruits sains (S-N) et des fruits présentant un secteur cutané légèrement endommagé par le soleil (DS1-N) ont été sélectionnés. Ensuite, dans les fruits des deux catégories, l'action de l'éthylène a été inhibée par l'application de 800 ppb de 1-MCP générant les traitements: sain avec éthylène inhibé (SI) et dommages causés par le soleil avec éthylène inhibé (DS1-I). Dans les quatre traitements, la production d'éthylène, le métabolisme oxydatif et la qualité des fruits à la récolte, 90 et 180 de stockage dans une chambre froide d'atmosphère conventionnelle (0°C +/- 1°C et 95% HR). L'application de 1-MCP a provoqué l'inhibition de la production d'éthylène dans les fruits sains et avec dommages causés par le soleil jusqu'à 180 jours de stockage au réfrigérateur. Son effet est resté après 23 jours d'exposition à la température ambiante. La réponse dans le métabolisme oxydatif du fruit DS1-N et DS1-I était similaire au cours de sa conservation. La capacité antioxydante et l'activité de l'enzyme SOD dans les tissus endommagés par le soleil (DS1-N et DS1-I) étaient supérieures à celles des tissus sains (S-N et S-I), à la récolte comme à la conservation. L'inhibition de l'éthylène (DS1-I et S-I) conditionnait la concentration d'alpha-farnésène générant moins de substrat disponible pour l'oxydation en triènes conjugués. La qualité des fruits a été affectée à la fois par le niveau de dommages causés par le soleil et par l'inhibition de l'éthylène. Les fruits DS1-N et DS1-I ont présenté une plus grande fermeté de la pulpe et une plus grande teneur en solides solubles. Les fruits DS1-I pendant la réfrigération ont présenté la physiopath blanchit au soleil plus tôt et avec une intensité plus grande. Les résultats obtenus dans cette thèse génèrent des précédents qui permettront d'approfondir l'étude de l'influence de l'éthylène lors de la conservation réfrigérée sur le métabolisme oxydatif

---

des pommes développées dans des situations de stress dû à un rayonnement solaire élevé.

---

Algunos de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se publicaron parcialmente en la siguiente reunión científica:

Colavita Graciela, Mantegna Michay, Vita Laura, Calvo Gabriela. Efecto de 1-MCP en la conservación de frutos de manzana con daño por sol. VII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha. La Plata 28-30 de mayo de 2014.

---

## ABREVIATURAS

1-MCP	1-metoxiciclopropeno
ACC	Ácido 1-aminociclopropil 1-carboxílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	$\alpha$ -Farnesenos
AFS	$\alpha$ -Farneseno sintasa
APX	Ascorbato peroxidasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CAT	Catalasa.
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2, difenil-2-picril-hidrazil
FST	Temperatura de la superficie del fruto
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HNE	4-hidroxi-2 nonenal
HO-	Radical hidroxilo
HSP	Proteínas de choque térmico
MDA	Malondialdehido
O <sub>2</sub> -	Radical superóxido
O <sub>2</sub> <sup>1</sup>	Oxígeno singlete
PF	Peso fresco de tejido
PS II	Fotosistema 2
PSI	Fotosistema 1
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAM	S-adenosilmetionina
S-N	Frutos sanos y etileno normal
S-I	Frutos sanos y etileno inhibido
SOD	Superóxido dismutasa.
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TC	Trienos conjugados
TCA	Ácido tricloro acético
UV	Ultravioleta

---

## INDICE

INDICE .....	1
1 INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 El cultivo de la manzana Granny Smith en la Norpatagonia .....	3
1.1.1 Caracterización regional .....	3
1.1.2 Descripción de la variedad Granny Smith .....	4
1.1.3 Caracterización climática regional.....	5
1.2 Estrés fotooxidativo en las plantas .....	7
1.2.1 Formación de especies reactivas de oxígeno .....	7
1.2.2 Mecanismos de defensa antioxidantes en las plantas.....	8
1.2.3 Daño oxidativo de las ROS a las biomoléculas .....	10
1.3 Fisiopatía daño de sol en manzana.....	11
1.3.1 Importancia económica de la fisiopatía daño de sol .....	12
1.3.2 Clasificación de la fisiopatía daño por sol.....	12
1.3.3 Factores que afectan la inducción del daño por sol.....	15
1.3.4 Respuesta de los frutos a la radiación solar excesiva .....	18
1.3.5 Desórdenes fisiológicos asociados al daño de sol .....	19
1.4 Etileno .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.4.1 Efectos fisiológicos del etileno .....	21
1.4.2 Síntesis y degradación.....	22
1.4.3 Mecanismos de acción.....	23
1.4.4 Inhibidores y antagonistas a la acción del etileno.....	24
1.4.5 Mecanismo de acción del 1-metilciclopropeno .....	25
1.4.6 Efectos de la aplicación de 1-metilciclopropeno en frutos de manzana.....	26
2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	28
3 HIPÓTESIS.....	29
4 OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo general .....	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1 Material vegetal .....	31
5.2 Tratamiento de inhibición de la producción de etileno .....	31
5.3 Acondicionamiento de los frutos y período de evaluaciones.....	32
5.4 Evaluación de parámetros de madurez .....	32

---

5.5 Determinaciones fisiológicas y bioquímicas.....	33
5.5.1 Producción de etileno .....	33
5.5.2 Integridad de membrana.....	33
5.5.3 Peroxidación de lípidos .....	34
5.5.4 Capacidad antioxidante.....	34
5.5.5 Contenido de la clorofila.....	35
5.5.6 Determinación alfa-farnesenos y trienos conjugados .....	35
5.6 Determinaciones enzimáticas.....	36
5.6.1 Preparación del extracto proteico.....	36
5.6.2 Actividad de Superóxido dismutasa (SOD) .....	36
5.6.3 Actividad de Ascorbato peróxidasa (APX).....	37
5.7 Evaluación de escaldado de sol durante la conservación en frío .....	38
5.8 Análisis estadístico.....	38
6 RESULTADOS .....	40
6.1 Producción de etileno .....	40
6.2 Metabolismo oxidativo .....	43
6.3 Parámetros de calidad.....	50
7 DISCUSIÓN.....	55
7.1 Evolución del etileno en frutos de manzana con síntomas de estrés por alta radiación solar y tratados con 1-MCP durante la conservación refrigerada .....	55
7.2 Efecto de la inhibición del etileno sobre el sistema antioxidante en frutos de manzana con síntomas de estrés por alta radiación solar durante la poscosecha...	58
7.3 Efecto de la inhibición del etileno en la calidad de frutos de manzana sanos y con daño de sol durante la poscosecha .....	65
8 CONCLUSIONES .....	69
9 FUTURAS LÍNEAS DE AVANCE .....	70
10 BIBLIOGRAFÍA.....	71

---

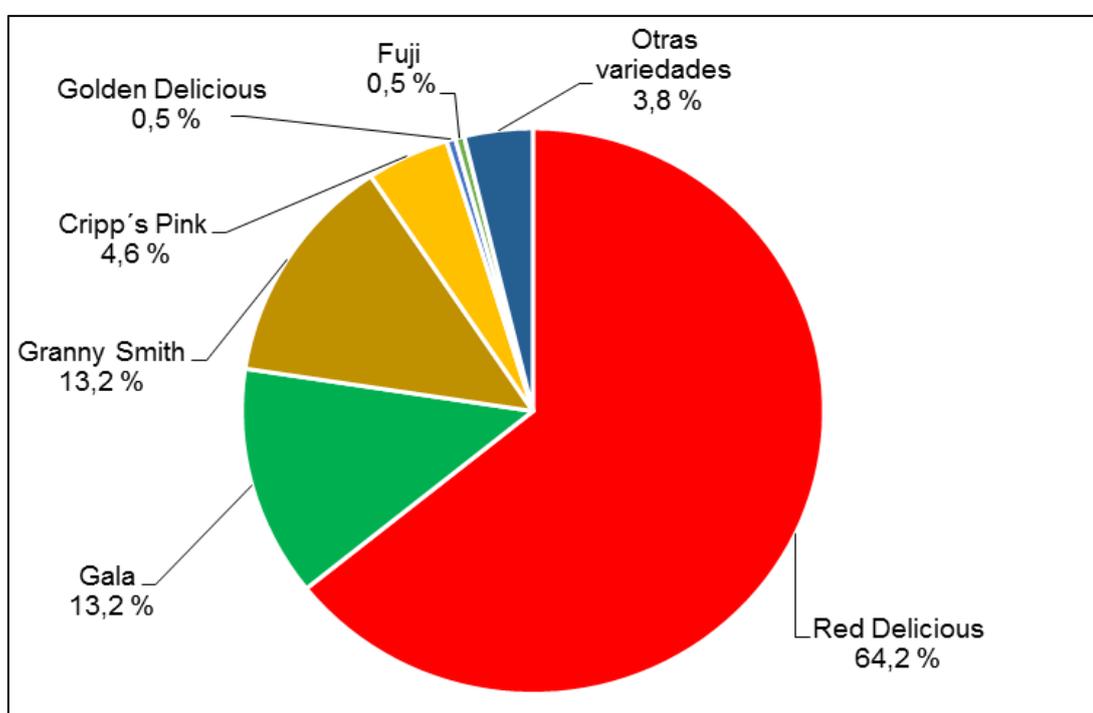
# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 El cultivo de la manzana Granny Smith en la Norpatagonia

### 1.1.1 Caracterización regional

Argentina produce en promedio 1,8 millones de toneladas anuales de fruta de pepita, distribuidas casi por partes iguales entre manzana y pera según lo informado por el Ministerio de Agroindustria (2016). El 85% de la producción de manzana y el 75% de pera se concentran en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén y en el Valle Medio de Río Negro (Colamarino, 2010).

La actividad frutícola de la región incluye 2.042 productores de pepita y carozo con 3.787 establecimientos que ocupan 43.541 ha, de las cuales 19.496 ha corresponden al cultivo de manzana. En dicha superficie se encuentran distribuidas diferentes cultivares según se indica en la Figura 1. Red Delicious y sus clones es el cultivar con mayor superficie en la región, seguido conjuntamente por Granny Smith con Gala y sus clones y en menor proporción Cripp's Pink y otros cultivares de menor relevancia (SENASA, 2017).



**Figura 1.** Superficie implantada de manzana por cultivar en Patagonia Norte. Fuente: SENASA (2017).

---

### 1.1.2 Descripción de la variedad Granny Smith

Granny Smith es una variedad de manzana creada artificialmente, proveniente de la hibridación entre las especies *Malus doméstica* y *Malus sylvestris*. La primera vez que se tiene conocimiento de ella, es en Australia en 1868, después de que María Ann Smith Sherwood, de quien viene el nombre de "Granny Smith", creara el primer injerto. Más tarde se introdujeron en el Reino Unido, alrededor del año 1935, y en los Estados Unidos en 1972 (Warrington, 1998).

Es una variedad productiva; parcialmente autoincompatible, puede ser polinizada por Akane, Red Delicious, Fuji, Gala, Golden Delicious, Ozark Gold y Reinettas, entre otras. En nuestra región florece de 4 a 6 días antes que Golden, es decir entre el 18 y el 26 de septiembre (Benítez, 2001).

El fruto es tronco-cónico, regular y homogéneo, mediano a grande, de 190 a 210 gramos de peso y 75 a 80 milímetros de calibre, con pedúnculo mediano (Foto 1).



**Foto 1.** Fruto de manzana variedad Granny Smith

La epidermis es untuosa al tacto, de color verde intenso, con lenticelas blancas bien visibles. A veces puede aparecer un color rojizo sobre la cara expuesta pero, en general, ocurre en frutos sobre árboles debilitados y/o con poco follaje o bien con problemas de portainjerto, especialmente cuando se han utilizado filtros o sobre plantas reinjertadas; también se lo ha observado en regiones de alta insolación o con amplitud térmica muy marcada. En cambio, en climas muy fríos, la epidermis de los frutos que se encuentra

---

en las zonas internas del árbol tiende a volverse blanquecina. La pulpa es blanco verdosa, firme, crocante, jugosa, marcadamente ácida y poco perfumada (Benítez, 2001).

Pese a ser un fruto climatérico, es una manzana de larga conservación, posiblemente por su baja producción de etileno comparada a otros cultivares (Warrington, 1998). Es muy susceptible al escaldado superficial, particularmente si se cosecha muy temprano y al daño por sol y escaldado por sol. Puede desarrollar también bitter pit y corazón acuoso si se cosecha muy tarde (Calvo y Candan, 2011).

### 1.1.3 Caracterización climática regional

La región del Alto Valle se caracteriza por tener una temperatura media anual de 15°C siendo enero el mes más caluroso con temperaturas medias de 23,6°C y máximas medias de 31,1°C. Durante el mes de julio la temperatura media es de 8,6°C con una máxima media de 13,1°C. La región tiene una marcada amplitud térmica propia de su carácter continental. Las necesidades de frío invernal de los frutales de hoja caduca son normalmente satisfechas, alcanzando valores superiores a 1200 horas. El periodo medio libre de heladas es de 174 días (Rodríguez y Muñoz, 2006).

Se registra una precipitación media anual de 197,7 mm (Rodríguez y Muñoz, 2006) y heladas primaverales que frecuentemente afectan los cultivos de pepita y carozo y que exigen medidas activas (riego por aspersión, uso de calefactores) o pasivas (riego por manto sobre suelo desnudo) para su control (Toranzo, 2016).

Los vientos predominantes son de los cuadrantes oeste y sudoeste, con mayor frecuencia en primavera-verano. Su intensidad obliga a la utilización de cortinas rompevientos, para la cual se utilizan tradicionalmente diferentes especies de álamos (Toranzo, 2016).

La región se caracteriza por tener altos valores de radiación global (1260W/m<sup>2</sup>) y de insolación. El fotoperiodo tiene su valor máximo en diciembre con 15,9 horas y disminuye paulatinamente hasta junio, con un valor de 10,4 horas (Rodríguez y Muñoz, 2006).

La intensa radiación en conjunto con las altas temperaturas que se registran en la región provocan asoleado o daño por sol tanto en manzanas como peras (Colavita et al., 2005). Los frutos que desarrollan este desorden durante su crecimiento tienen mayor

---

predisposición a desarrollar fisiopatías durante el almacenamiento en poscosecha (Tartachnyk et al., 2012). Por lo tanto el daño de sol es un desorden de suma importancia para los productores de fruta, ya que puede llegar a provocar entre un 40-50% de pérdidas económicas por descarte de manzanas para exportación (Yuri et al., 2010).

---

## 1.2 Estrés fotooxidativo en las plantas

Cuando un factor externo provoca una influencia negativa o desventajosa en una planta, se considera que se encuentra bajo una condición de estrés (Taiz y Seiger, 2010).

Las plantas se estresan debido a la falta de agua, al calor, al frío o al exceso de luz. Cuando cuentan con humedad suficiente y temperaturas medias, se considera que se encuentran bajo “condiciones óptimas”. En algunos casos deben soportar altas o bajas temperaturas y sequías, todos ellos factores ambientales adversos que generan situaciones de estrés. Así, en invierno y en verano, la luz que en condiciones normales supondría una fuente de energía adecuada se convierte en excesiva, ya que en estas condiciones el metabolismo de las plantas no es capaz de asimilarla en su totalidad. Ese proceso se conoce como estrés fotooxidativo (Elhuyar Fundazioa, 2008).

### 1.2.1 Formación de especies reactivas de oxígeno

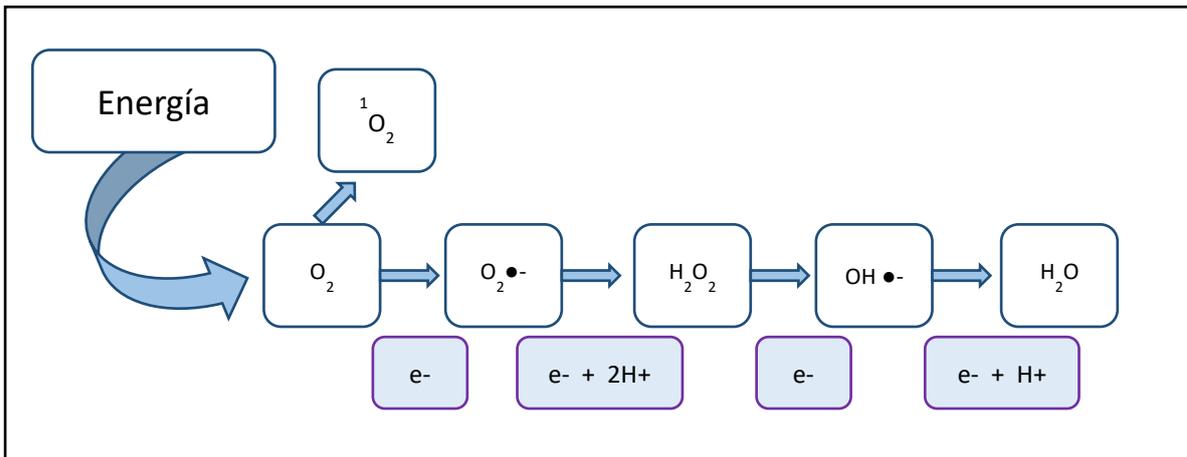
El estrés fotooxidativo produce especies reactivas de oxígeno (ROS) por exceso de energía (Foyer, 1994). Las principales ROS en las células vegetales se derivan de la activación de la molécula de dioxígeno ( $O_2$ ), lo que da lugar a especies químicas parcialmente reducidas, como el oxígeno singlete  $O_2^1$  y el radical superóxido ( $O_2^-$ ), que constituyen las especies activas (o reactivas) de oxígeno primarias (Figura 2). Las reacciones posteriores de las especies activas de oxígeno primarias con los componentes celulares, forman otros radicales libres (como el radical hidroxilo  $HO^\cdot$ ) u otros compuestos oxidantes como el peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ , que tienen carácter oxidante pero no son radicales libres (Mittler, 2002).

Además de originarse por excesos de intensidad lumínica, las ROS también son productos de reacciones del metabolismo energético como la fotosíntesis, la respiración y la fotorrespiración. Otras reacciones de síntesis de ROS más específicas y sujetas a control celular sobrevienen por la acción de enzimas como la NADPH oxidasa, amino oxidasas y peroxidasas de la pared celular. La función de estas últimas enzimas es producir ROS involucradas en la muerte celular programada y en la defensa contra patógenos, eso quiere decir que tales compuestos también parecen cumplir con la importante función de indicadores del estrés y segundos mensajeros en las cadenas de transducción de señales de respuesta al estrés (Mittler, 2002).

Las ROS se pueden formar tanto en células estresadas, como no estresadas. Las plantas han desarrollado sistemas de defensa contra los ROS, los cuales bajo

---

condiciones sin estrés son suficientes para mantener en balance la formación y remoción de  $O_2$ . Sin embargo, en condiciones de estrés cuando se incrementa la formación de ROS, los sistemas de defensa se saturan y son incapaces de remover las ROS, por más que aumente la concentración enzimática o no enzimática de antioxidantes (Alscher y Hess, 1993).



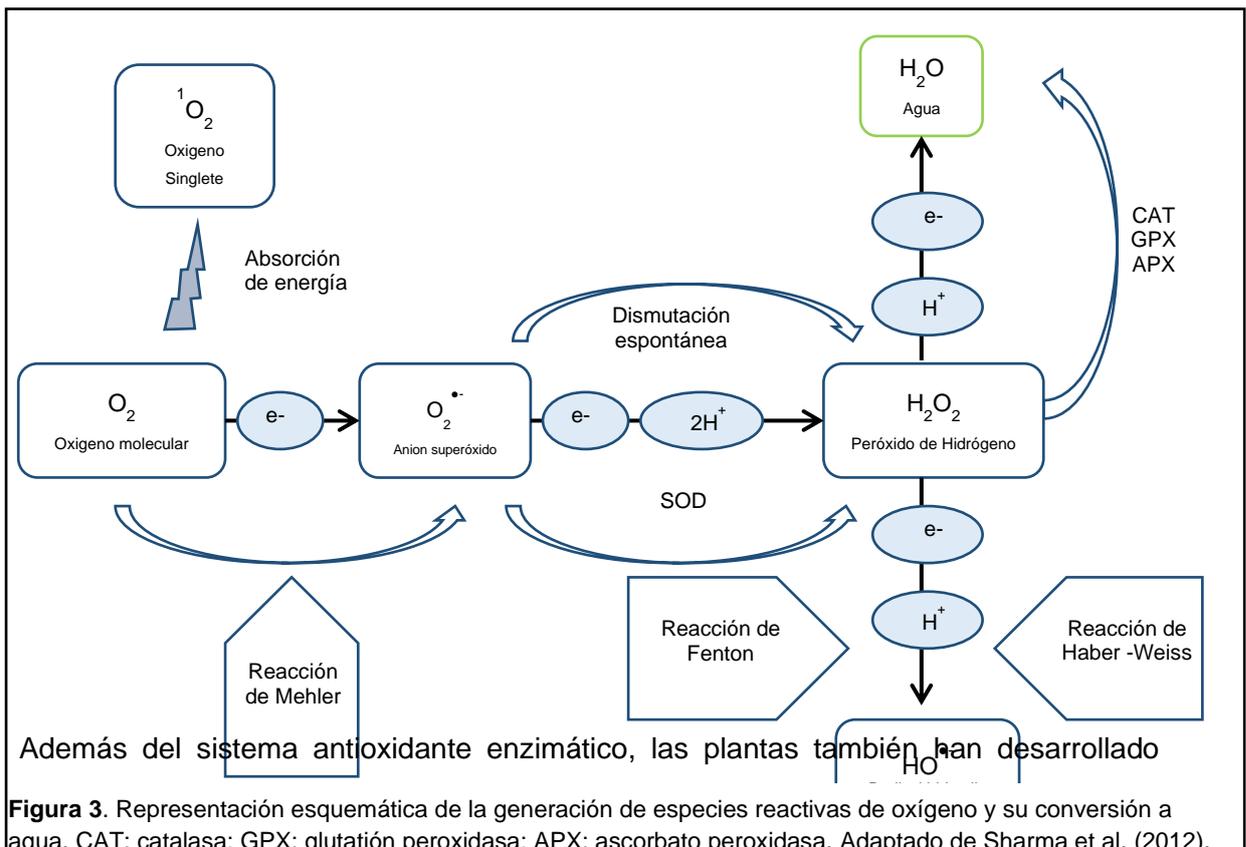
**Figura 2.** Ruta de la reducción univalente del oxígeno y formación de ROS.

La mencionada función dual de las ROS, por una parte, como señalizadores del estrés, por otra, como compuestos que causan la muerte celular. Indica que el control de su concentración por medio de sustancias antioxidantes, parece ocurrir debido, al menos, por dos mecanismos: (1) uno que lleva a cabo el control fino de los niveles de las ROS para propósitos de señalización y (2) otro que se encarga de la desintoxicación de las ROS producidas en exceso durante los eventos de estrés. Para el caso de la señalización parece ser que tanto la concentración de una molécula específica reactiva, como la concentración relativa de diferentes ROS, son preponderantes en la determinación de la respuesta celular (Benavides-Mendoza, 2009).

### 1.2.2 Mecanismos de defensa antioxidantes en las plantas

La función química de los antioxidantes es ceder potencial reductor a los compuestos oxidantes capaces de dañar a los componentes celulares. Los productos finales de esta reacción de disipación energética antioxidante-oxidante son comúnmente el  $O_2$  y el  $H_2O$ , acompañados de liberación de calor (Mittler, 2002).

Los principales sistemas de eliminación de ROS en las plantas incluyen ciclos enzimáticos catalizados por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y peroxidasa (Figura 3). También la actividad de quelación y secuestro de iones de metales, disminuyen o previenen la formación de radicales hidroxilos, resultantes de reacciones Haber Weiss o reacciones Fenton. El balance de la actividad de los tres sistemas enzimáticos: SOD, APX y CAT es crucial para determinar la concentración relativa estacionaria de  $O_2^{\cdot-}$  y de  $H_2O_2$ , lo cual controla la producción de  $HO^{\cdot}$ . Dado que muchos factores abióticos inducen estrés y el consiguiente aumento en la concentración de ROS, cualquier factor anatómico, morfológico, bioquímico o fisiológico que disminuya la intensidad del estrés, será valioso desde el punto de vista de la reducción en la producción de ROS. Debido a las concentraciones en las que actúan APX ( $\mu M$ ) y CAT ( $mM$ ), se infiere que pertenecen a dos clases de sistemas de eliminación de ROS distintos: uno de control fino y otro de eliminación de exceso en condiciones de estrés (Mittler, 2002).



sistemas de defensa antioxidante basados en compuestos como, vitamina C (ácido ascórbico) (Johnson *et al.*, 1999) y vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (Yuri, 2001), flavonoides (Merzlyak *et al.*, 2002), carotenoides y fenoles (Wünsche *et al.*, 2004), enzimas tales

como superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, fenil-alanina-amonio liasa y polifenoloxidasa (Yuri, 2001; Yuri et al., 2000b). La tabla 1 presenta un resumen de los principales sistemas bioquímicos que producen y eliminan a las ROS.

Los antioxidantes no enzimáticos, se encuentran en todos los compartimentos celulares. Estos compuestos pueden actuar directamente en la detoxificación de ROS o pueden reducir algunos sustratos para la acción de enzimas antioxidantes (Mittler, 2002).

**Tabla 1.** Procesos de producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno en plantas.

Mecanismo de producción	Localización
$O_2^-$ Cloroplasto en fotosíntesis (transporte de electrones y PSI y PSII)	Cloroplasto
$O_2^-$ en respiración (transporte de electrones)	Mitocondria
$H_2O_2$ por la glicolato oxidasa	Peroxisoma
$O_2^{\cdot 1}$ por clorofila excitada	Cloroplasto
$O_2^-$ por la NADPH oxidasa	Membrana plasmática
$H_2O_2$ por la $\beta$ -oxidación de ácidos grasos	Peroxisoma
$H_2O_2$ por la oxalato oxidasa	Apoplasto
$O_2^-$ por la xantina oxidasa	Peroxisoma
$H_2O_2$ y $O_2^-$ por peroxidasa, $Mn^{2+}$ y NADH	Pared celular
Mecanismo de eliminación	Localización
$O_2^-$ por superóxido dismutasa	Cloroplasto, mitocondria, citoplasma, peroxisoma, apoplasto
$H_2O_2$ por la ascorbato peroxidasa	Cloroplasto, mitocondria, citoplasma, peroxisoma, apoplasto
$H_2O_2$ por la catalasa	Peroxisoma
$H_2O_2$ y ROOH por la glutatión peroxidasa	Citoplasma
$H_2O_2$ por peroxidasa	Pared celular, citoplasma, vacuola
$H_2O_2$ por tioredoxina peroxidasa	Cloroplasto, citoplasma, mitocondria, peroxisoma, apoplasto
$H_2O_2$ por el glutatión	Cloroplasto, citoplasma, mitocondria, peroxisoma, apoplasto
ROOH y $O_2^-$ por el $\alpha$ -tocoferol	Membranas
$O_2^{\cdot 1}$ por carotenoides	Cloroplasto

Adaptado de: Mittler (2002); Mullineaux y Karpinski (2002).

### 1.2.3 Daño oxidativo de las ROS a las biomoléculas

Cuando las ROS superan los mecanismos de defensa, se producen daños a biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN. El exceso de ROS incrementa la peroxidación de lípidos en la membrana celular, lo cual provoca la disminución de la fluidez de las membranas, aumenta la permeabilidad y causa daños secundarios a las

---

proteínas de membrana (Halliwell, 2006). El nivel de peroxidación de lípidos se ha utilizado ampliamente como un indicador de ROS y de daño a las membranas celulares bajo condiciones de estrés. (Sharma et al., 2012). Los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de las membranas son susceptibles a la peroxidación causada por las ROS produciendo varios tipos de aldehídos, alcanos y alquenes hidroxilados incluyendo al malondialdehído (MDA) y al 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Estos dos productos finales se utilizan en general en los estudios de peroxidación de lípidos a través de la reacción con el ácido tiobarbitúrico (Garg y Manchanda, 2009).

Las ROS producen también la oxidación de diferentes aminoácidos, generando grupos carbonilo libres que pueden inhibir o alterar sus actividades y aumentar la susceptibilidad al ataque proteolítico. La carbonilación de proteínas se produce a través de la oxidación directa de cadenas laterales de aminoácidos. Los aminoácidos que contienen azufre y los grupos tiol son más susceptibles al ataque de las ROS. El oxígeno activado extrae un átomo de hidrógeno del grupo sulfhidrilo, generando un radical que reacciona con un segundo radical formando puentes disulfuro (Moller et al., 2007).

El ADN también puede ser modificado por las ROS en diversas formas, en especial en las bases nitrogenadas. El radical HO<sup>•</sup> es el más reactivo, el O<sub>2</sub><sup>•1</sup> ataca en especial guanina y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no produce reacciones de oxidación en ADN (Moller et al., 2007).

### **1.3 Fisiopatía daño de sol en manzana**

En los frutos de manzano expuestos a estrés por altas temperaturas y elevadas intensidades lumínicas, desarrollan un fenómeno conocido comúnmente como daño de sol, asoleado o sunburn (Sibbet et al., 1991).

El daño por sol afecta la superficie de productos hortícolas y frutícolas, reduciendo la calidad y limitando la comercialización. En manzana, dependiendo de la intensidad del daño, la fruta se puede remover durante el embalaje, pero en muchos casos es difícil detectar los frutos dañados durante este proceso. Inicialmente, el daño corresponde a manchas blancas o amarillentas, pudiendo ocurrir una depresión superficial y el

---

desarrollo de una textura esponjosa. Conjuntamente ocurren importantes cambios anatómicos, tales como la separación de la cutícula, engrosamiento de la pared celular y desorganización de los plastidios (Andrews, 1997). El uso de cultivares sensibles (ej. “Fuji”, “Braeburn”, “Granny), portainjertos enanizantes, la orientación de las hileras de plantación, sistemas de conducción expuestos al sol (ej. solaxe), el riego, uso de mallas, protectores químicos y el manejo del follaje para proteger a la fruta de la exposición solar pueden hacer variar la incidencia de este desorden fisiológico (Wünsche *et al.*, 2004; Yuri, 2001).

### 1.3.1 Importancia económica de la fisiopatía daño de sol

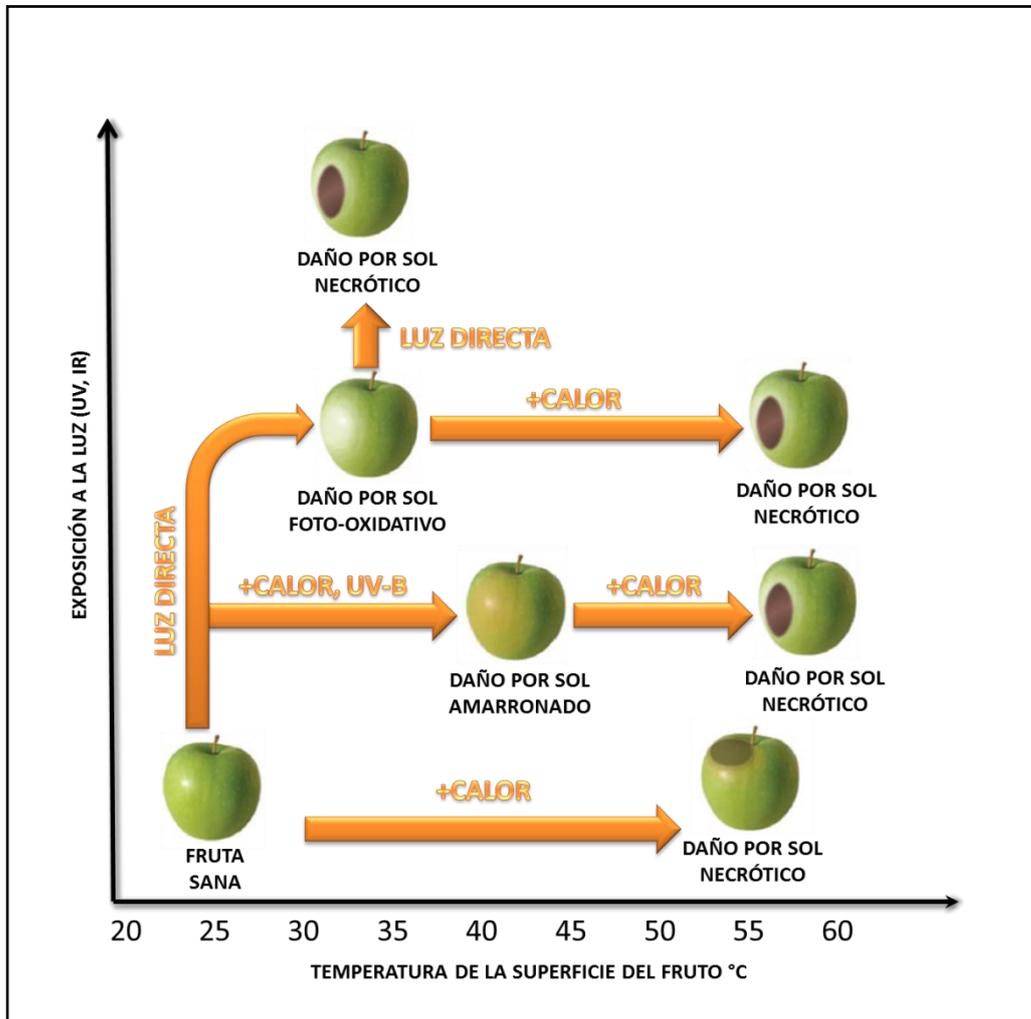
Los síntomas sobre frutos de manzano pueden ir desde zonas blancas hasta manchas insoladas marrón oscuras sobre la superficie, dependiendo del cultivar y de las diferentes condiciones ambientales que pueden ocurrir dentro de un mismo cultivo. Además de los daños preliminares externos causados por la exposición a elevada radiación solar, el daño por sol puede afectar severamente la maduración y calidad del fruto y por ende disminuir su valor de mercado (Schrader *et al.*, 2008). La mayoría de estos desordenes hacen que la fruta pierda margen para ser comercializada. Por lo tanto, el daño por sol es un grave problema económico en prácticamente todas las regiones donde se cultivan manzanas. En el estado de Washington, el cual produce la mitad de las manzanas de Estados Unidos, el daño por sol causa pérdidas anuales de alrededor del 10% (Schrader *et al.*, 2008)

En la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, donde se producen el 80% de las manzanas argentinas, los datos preliminares generados por empresas exportadoras y empacadoras de la región indican que el problema estaría en el orden del 15 al 40% según variedad, edad de la planta y sistemas de conducción (Colavita, 2007). Estos valores representan una enorme pérdida de rendimiento para la región e impactan notablemente en la rentabilidad de la actividad frutícola de la zona.

### 1.3.2 Clasificación de la fisiopatía daño por sol

Se identificaron tres tipos distintos de asoleado o daño por sol en frutos de manzana. Schrader *et al.* (2001) caracterizaron al asoleado necrótico y al asoleado con pardeamiento. Luego, Felicetti y Schrader (2008) describieron al asoleado fotooxidativo.

En la Figura 4 se indican las condiciones necesarias para la formación de los tres tipos de daño por sol.



**Figura 4.** Condiciones para la formación de los tres tipos de asoleado en frutos de manzana. Adaptado de: Racsko y Schrader (2012).

El asoleado necrótico ocurre cuando la temperatura de la superficie del fruto (FST) alcanza  $52 \pm 1$  °C durante al menos 10 minutos, y ocasiona muerte celular inducida por el calor (Figura 4 y Figura 5). Este tipo de daño por sol ocurre naturalmente a la luz del sol, pero puede ser inducido en laboratorio bajo condiciones de oscuridad a una FST de  $52 \pm 1$  °C (Schrader et al., 2001). Su manifestación sobre el fruto se caracteriza por una mancha marrón oscura o negra en la superficie de la manzana que puede aparecer entre 1-4 días después de la exposición térmica de la epidermis, momento en el cual las células del sector afectado colapsan. Esta mancha puede tener varios milímetros de espesor.

---

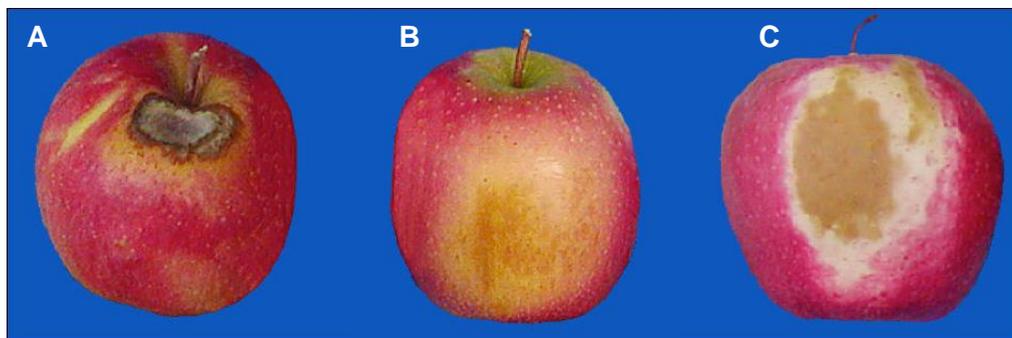
El daño por sol amarronado es el más común de los tipos de asoleado que suceden en la cara expuesta al sol de los frutos de manzanos. A diferencia del daño de sol necrótico, no conlleva a la muerte celular y es caracterizado por el amarillamiento o amarronamiento de la piel de la manzana (Schrader et al., 2001). Esta decoloración se ha relacionado a una disminución del contenido de clorofila y antocianina, y un aumento de la concentración de carotenoides y de quercetina (Felicetti y Schrader, 2008). La decoloración es superficial y no penetra en el mesocarpio de la fruta. El daño por sol de amarronamiento ocurre cuando la FST se encuentra en temperaturas de entre 46 y 49 °C, dependiendo del cultivar, y no ocurre en ausencia de radiación, es decir cuando las manzanas son calentadas en la oscuridad (Figura 4 y Figura 5) (Schrader et al., 2001). La FST mínima para producir este daño por sol en fruta expuesta a la luz del sol durante una hora fue referida al umbral de temperaturas previamente mencionado. Debido a que el daño por sol de amarronamiento no ocurre en la oscuridad, se puede sugerir que diferentes componentes de la luz solar son factores desencadenantes de su desarrollo. Se demostró que la radiación ultravioleta-B (UV-B, 280-320 nm) está implicada debido a que cuando se utilizan filtros para la misma, la incidencia de este tipo de daño por sol se redujo. También se comprobó que no había diferencias significativas en conductividad de electrolitos relativa entre manzanas con daño por sol leve y manzanas sanas, en cambio en daños graves la pérdida de electrolitos es significativa dado que hay necrosis de los tejidos. (Schrader et al., 2001), Resultados que corroboran que esta fisiopatía es un evento subletal en el fruto.

El daño fotooxidativo se ha descrito como el resultado de la exposición repentina de un fruto que estaba a la sombra a la radiación directa de la luz solar. El primer síntoma del daño por sol fotooxidativo es una mancha blanca que aparece en los frutos (Figura 4 y Figura 5). Los síntomas iniciales de este tipo de daño por sol pueden desarrollarse con FST por debajo de 31°C (temperatura del aire por debajo de 18°C) y puede ser detectado dentro de 24 horas de la exposición del fruto, como una zona blanca en la superficie de la fruta expuesta.

A diferencia de los dos primeros tipos de daño por sol, el aumento de la aparición de daño por sol fotooxidativo en los frutos no se correlaciona con los mayores valores de FST. Estudios de integridad de membrana y en el microscopio electrónico indican que se ocasiona la muerte celular con fotodespigmentación. La fotodespigmentación ocurre a FST por debajo de 31°C. En frutos no aclimatados que estaban protegidos de la radiación UV-A y UV-B, el daño por sol fotooxidativo y necrótico ocurrió igual. La radiación infrarroja (>700 nm) fue descartada como un factor de inducción. Se sugiere

---

que la radiación visible y la producción de ROS son factores de inducción de daño por sol fotooxidativo (Felicetti y Schrader, 2008).



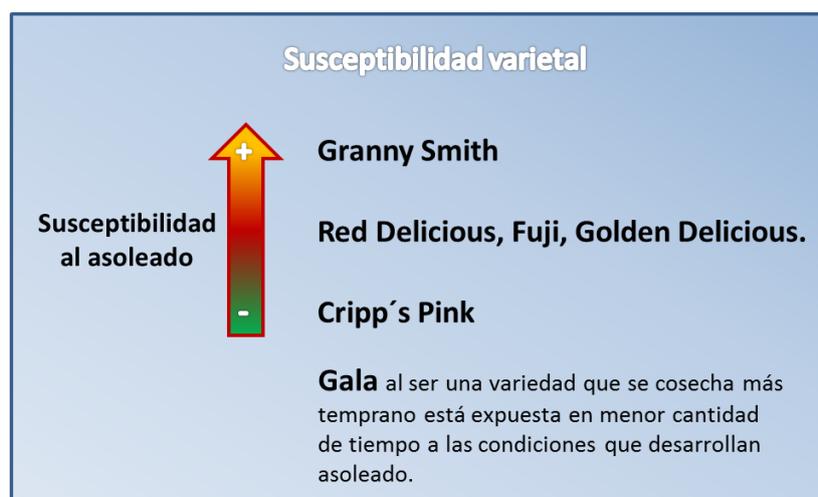
**Figura 5.** Clasificación de los diferentes tipos de daño por sol. A: asoleado necrótico; B: asoleado por amarronamiento; C: Asoleado fotooxidativo. Adaptado de: Schrader et al. (2003)

### 1.3.3 Factores que afectan la inducción del daño por sol

Numerosos estudios se han focalizado en establecer los factores predisponentes al daño por sol. Como fue indicado previamente las temperaturas en conjunto con una elevada intensidad lumínica son los factores directamente involucrados (Yuri et al., 2004).

Existen también diversos factores indirectos que pueden interactuar con los factores directos e influir en la aparición y magnitud de los síntomas. Entre ellos se destacan la susceptibilidad de cada cultivar; el estado de desarrollo y ubicación del fruto, la forma del árbol y el sistema de conducción, la orientación de las filas, y las condiciones hídricas y climáticas como la humedad relativa y el viento (Yuri et al., 2004).

Varios estudios indican que bajo las mismas condiciones ambientales, hay diferencias entre en la susceptibilidad al daño por sol en diferentes variedades de manzanas. En muchas regiones del mundo, numerosos estudios reportaron alta susceptibilidad al daño por sol de las variedades Granny Smith y Jonagold. Mientras que Fuji, Golden Delicious, Braeburn, Boskoop, y Delicious parecen ser de susceptibilidad moderada. Cripp's Pink, Idared, y Topaz son las variedades que menos daño por sol reportan (Figura 6). Variedades de cosecha temprana como Gala, pueden sufrir alto grado de daño por sol algunos años y ser levemente afectados en otros, esto depende de cuando ocurre el umbral de FST, más que con una cuestión de susceptibilidad varietal (Racskó y Schrader, 2012).



**Figura 6.** Escala de susceptibilidad varietal al daño de sol en variedades de importancia en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén.

Investigaciones en Brasil encontraron, en condiciones similares, mayor incidencia del daño por sol en Fuji respecto a Gala (do Amarante et al., 2011). Moggia y Yuri (2003) señalan a Fuji y Braeburn como variedades susceptibles a este daño en las condiciones climáticas y de producción chilenas.

Brunner et al. (2003) indican para el estado de Washington que el 25% de los frutos de manzano descartados en el empaque, son por daño por sol. En algunas regiones de Sudáfrica se registraron porcentajes de daño por sol del 56,9% en Granny Smith, 32,5% en Braeburn y 44,4% en Fuji (Wand et al., 2006). Aly et al. (2010) reportan valores de frutos asoleados del 16% para la variedad de manzana Anna en Egipto.

En Chile, el asoleado de manzanas es uno de los principales problemas para los productores, representando pérdidas económicas del 40%, dependiendo de la región, la variedad y la temporada (Moggia y Yuri, 2003).

Estudios realizados en la Región del Alto Valle de Río Negro indicaron que Fuji fue la variedad más susceptible, observándose que el 55,6% de los frutos muestreados presentó algún tipo de afección por sol. Le siguieron en orden de ocurrencia de daño Golden Delicious, Granny Smith y Braeburn, esta última con una incidencia de daño del 38,1%. Las variedades que menor daño presentaron fueron Red Delicious con un 24% y luego Starkrimson con un 14,9% (Colavita, 2008). Otros ensayos realizados en la región reportan valores de descarte por asoleado grave en variedad Fuji del 20% (Dussi et al., 2005). El daño por sol leve no siempre es considerado una razón de descarte de

---

los frutos, pero este desorden disminuye el valor de los frutos en especial con destino de exportación (Colavita, 2008).

El daño por sol ocurre en frutas expuestas a la luz del sol, pero no se desarrolla en todos los frutos de la planta que están expuestos a la misma condición. En este sentido, los frutos expuestos de una rama podrían verse afectados o solamente puede ser afectado uno. Se ha sugerido que el fruto terminal del racimo es más susceptible que los laterales, y que los frutos pequeños tienen más resistencia al daño por sol que frutos grandes (Racskó y Schrader, 2012).

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

El daño por sol también está usualmente relacionado con el estrés hídrico y/o el inadecuado riego de las plantas. Esto se explica por la capacidad de las plantas de regular la temperatura de sus órganos por el mecanismo de la respiración (Gonda et al., 1998).

La baja humedad relativa es considerada un importante factor indirecto para la inducción del daño por sol, pero es menos importante que la exposición a la luz solar y la temperatura. Por otra parte, las capas de aire adyacentes a la superficie caliente del fruto son calentadas por este mismo y cuando hay movimientos de aire se reduce el flujo de calor neto de la fruta, pero cuando esto no ocurre, aumenta el flujo de calor en la fruta ("Efecto de capa límite"). Cuando el movimiento del aire sobre el fruto se incrementa, la capa límite alrededor del mismo es disturbada y se provoca un enfriamiento convectivo que es importante en el balance térmico del fruto (Racskó y Schrader, 2012). En nuestra región Rodríguez et al. (2008) determinaron que vientos suaves, 6-14 km/h, producen un efecto de refrigeración, mientras que los más fuertes, mayores a 30 km/h, causan aumento de la tasa de transpiración de hojas y frutos y acompañado de altas temperaturas, provocan estrés hídrico. En cambio, con ventolinas o condiciones de calma, la temperatura superficial de los frutos alcanza los valores mas elevados.

---

#### 1.3.4 Respuesta de los frutos a la radiación solar excesiva

Los frutos han desarrollado un complejo sistema de defensa (pigmentos, enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico, etc.) contra la elevada radiación solar. Este sistema puede actuar de forma segura para la célula, eliminando los radicales libres y así prevenir el daño molecular, protegiendo a las proteínas de una desnaturalización irreversible y de esta forma disminuyendo el daño por sol (Wunsche et al., 2004a). Sin embargo, la enorme incidencia de daño por sol en los montes de manzana sugiere que este mecanismo habitualmente es insuficiente (Racskó y Schrader 2012).

Los pigmentos localizados en la membrana tilacoide de los cloroplastos, son capaces de capturar eficientemente la energía solar y transferirla a otros componentes del aparato fotosintético para impulsar los mecanismos fotoasimilatorios. Bajo condiciones de excesiva exposición a luz del sol, la absorción de fotones por los pigmentos fotosintéticos a menudo excede la utilización requerida para fotosíntesis, lo que resulta en un exceso de energía de excitación. Este exceso de energía de excitación de las moléculas de clorofila puede disiparse con seguridad en forma de calor en los complejos pigmento-antena a través de un proceso llamado enfriamiento no foto químico, minimizando así el potencial por daños fotooxidativo. Más del 75% de los fotones absorbidos se pueden eliminar por este proceso de disipación térmica en hojas. En la cascara de manzanas el patrón del pigmento clorofila indica la presencia de ambos fotosistemas (PS I y PS II). Sin embargo los frutos tienen una capacidad muy limitada para la utilización del flujo de fotones fotosintéticos (Racskó y Schrader 2012).

En los casos de daño por sol de tipo amarronamiento en manzanas, se ha reportado un aumento significativo del contenido de  $\beta$ -caroteno bajo esta condición. Además, el contenido de este pigmento aumentó en forma proporcional a la severidad del daño. Debido a que los carotenos son pigmentos amarillos, el cambio de color del tono de la piel del fruto durante el desarrollo del daño por sol sería un mecanismo de protección destinado a la eliminación de los radicales libres (Racskó y Schrader 2012)

En estudios sobre los mecanismos de defensa de los frutos de manzana se ha observado que los antioxidantes carotenoides y fenoles como el ácido clorogénico, aumentan sustancialmente en la cara expuesta al sol de los frutos. El ácido clorogénico puede aumentar hasta seis veces en el sector con daño por sol comparado con el lado sombreado (Wünsche et al., 2001). Trabajos realizados por Yuri (2014), corroboran que la piel de la manzana expuesta al sol presenta más polifenoles y antioxidantes que la no expuesta.

---

Otras de las estrategias que tienen los frutos frente a la elevada radiación solar es la activación de proteínas de choque térmico (HSP). Estas HSP le confieren tolerancia al calor, protegiendo otras proteínas de una eventual desnaturalización. Sin embargo, se desconoce el momento en que este mecanismo comienza a operar, una vez que el fruto ha sido expuesto al sol (Wünsche *et al.*, 2004; Ritenour *et al.*, 1998).

### 1.3.5 Desórdenes fisiológicos asociados al daño de sol

Numerosos trastornos fisiológicos pueden aparecer en manzanas que han sido expuestas a estrés por excesiva radiación solar y/o altas temperaturas, algunos de estos trastornos aparecen en el campo antes de la cosecha y otros durante la vida de poscosecha del fruto. Dentro de los que afectan a los frutos en la precosecha se encuentran: lenticelosis, bitter pit, cracking y corazón acuoso. Y durante la poscosecha se desarrolla la fisiopatía denominada escaldado de sol (Racskó y Schrader 2012).

El escaldado de sol se caracteriza por un oscurecimiento o pardeamiento de la piel en la parte expuesta al sol de la fruta durante su vida de poscosecha. Lurie *et al.* (1991) describieron un trastorno parecido en el que las manzanas Granny Smith que muestra sólo una pequeña área amarilla en la cosecha (es decir, ligero daño por sol de amarronamiento) desarrollan un color oscuro en esa zona durante el período de almacenamiento, el área amarilla primero cambia a un color cobre y luego a uno marrón en una etapa posterior (Foto 2).

La variedad más susceptible a esta fisiopatía es Granny Smith y puede causar pérdidas económicas significativas (Contreras *et al.*, 2008; Lurie *et al.*, 1991; Racskó y Schrader, 2012).



**Foto 2.** Escaldado de sol en manzana Granny Smith.

Los síntomas aparecen exclusivamente en la superficie del fruto que estuvo expuesta a la radiación solar (Contreras et al., 2008; Lurie et al., 1991; Vita et al., 2016).

El escaldado por sol ha sido descrito como un proceso no-enzimático y no-oxidativo ya que el pardeamiento de los tejidos no se acelera con el aumento de temperatura, al igual que las reacciones de tipo enzimática, y la expresión de los síntomas no se inhibe o reduce por el uso de antioxidantes (Lurie et al., 1991).

Estudios realizados en manzanas Granny Smith por Contreras et al. (2008), determinaron que frutos con mayor severidad de daño por sol a cosecha presentaron mayor incidencia de escaldado por sol en el almacenaje. Luego de 3 meses de conservación en frío, los frutos levemente dañados por alta radiación presentaron aproximadamente 50% de frutos escaldados por sol, mientras que un 90% de los frutos presentó este problema cuando el golpe de sol a cosecha fue severo.

Según Hernández et al. (2014) la concentración de glicósidos de quercetina a cosecha está altamente correlacionada con el desarrollo de escaldado por sol durante el almacenamiento.

---

## 1.4 Etileno

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

### 1.4.1 Efectos fisiológicos del etileno

El etileno regula la expansión celular en hojas y la expansión lateral en plántulas en germinación con inhibición de la elongación del epicótilo y radícula, causando también un incremento en la curvatura a nivel de la porción cotiledonar, lo cual en conjunto se conoce como el efecto de la “triple respuesta”. La expansión celular lateral se asume es un efecto del etileno sobre alineamiento a nivel de microtúbulos lo cual afecta la deposición de nuevas microfibrillas de celulosa durante el crecimiento. La expansión puede asociarse de alguna manera a la formación de aerénquima en raíces y tallos de plantas de hábito acuático (órganos sumergidos) como una respuesta adicional a la anoxia (Jordán y Casaretto, 2006).

Los efectos más conocidos del etileno son a nivel de la maduración de frutos. Con el avance de la madurez ocurre la transformación del almidón en azúcares, ablandamiento y degradación de paredes celulares junto a desarrollo de aromas, sabores y colores. También se denota un aumento global de la respiración con alta producción de CO<sub>2</sub>. Aunque este efecto es inicialmente lento, la producción de etileno se “retroalimenta”, es decir, los niveles endógenos auto-generan un mayor incremento de su síntesis rápidamente y en forma exponencial. El aumento explosivo del nivel de producción de etileno en algunas frutas se denomina climaterio. El fenómeno ocurre solamente en algunas especies; entre los frutos climatéricos se puede citar a banana, manzana, tomate, paltas, kiwi, melón, pera, higo, durazno, nectarín, mango, y otros; a diferencia de aquellos que, como cítricos (naranja, limón), cerezas, frutillas y uvas, el nivel de etileno permanece estable (frutos no climatéricos). En estos el etileno no es requerido para la maduración. Sin embargo, aplicaciones a cítricos provocan un efecto de amarillamiento, con pérdida de clorofila en el flavedo, lo que da una apariencia de mayor madurez. Se ha determinado que en frutos climatéricos puede producirse un nivel de etileno superior a 300 nl/g/h, al mismo tiempo que se desencadena una rápida liberación de CO<sub>2</sub>, (Jordán y Casaretto, 2006).

---

#### 1.4.2 Síntesis y degradación

La biosíntesis de etileno fue dilucidada por Yang, quien en 1979 describió lo que se conoce como el ciclo de la metionina o de Yang. Este ciclo se inicia justamente en la metionina que se asocia a la adenosina conformando la S-adenosilmetionina (SAM). El paso siguiente es la conversión de este intermediario en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) el cual se desdobla en etileno con liberación de CO<sub>2</sub> (Figura 7). De la conversión de SAM a ACC se libera 5 metil-tio-adenosina la cual se disocia en adenina y ribosa pasando por varias reacciones a constituir nuevamente metionina, para continuar el ciclo. Este ciclo metabólico es importante pues recicla la metionina, un amino ácido no abundante, como fuente de azufre. Las reacciones pueden estar separadas espacialmente; en condiciones de inundación (condiciones anaeróbicas) el ACC se genera en la raíz y se transporta vía xilema, a través de la corriente transpiratoria hacia la parte aérea, donde se transforma en etileno y donde manifiesta su acción (Bradford y Yang 1980). Las tres reacciones principales están gobernadas por las enzimas SAM sintasa para la síntesis de SAM; la ACC sintasa para el ACC y la ACC oxidasa para el etileno, siendo esta última una reacción aeróbica.

La síntesis y actividad de esta enzima también es estimulada por factores abióticos como inundación, sequía y daño mecánico por heladas o heridas (por ejemplo granizo) o durante algunas etapas de desarrollo como cierto grado de madurez de frutos. En el caso de la ACC oxidasa, la condición aeróbica y el fenómeno de maduración, pero no temperaturas superiores a 35°C, estimulan la conversión a etileno. Aumentos de ACC, ACC oxidasa y etileno se han observado en varios frutos un par de días después de su cosecha, sin embargo las reacciones de síntesis también pueden ser incrementadas bajo algunas situaciones de estrés. Así en tomate, bajo condiciones de anaerobiosis (suelos inundados de agua), la síntesis de ACC se torna muy intensa en raíces y la conversión a etileno ocurre una vez que este es transportado a la parte aérea (pecíolos) y donde la condición aeróbica permite la acción de la ACC oxidasa (Yang, 1987). Quizás el punto más limitante en la producción de etileno es la ACC sintasa. El análisis de mutantes de Arabidopsis ha revelado un nuevo proceso a nivel molecular para el control de la actividad de esta enzima (Chae y Kieber 2005). Las dos clases de ACC sintasas que existen en Arabidopsis contienen un dominio carboxilo-terminal que sería sujeto a fosforilaciones por proteínas quinasas. Tales modificaciones bloquearían la formación de un complejo entre las ACC sintasas y un regulador negativo de éstas, el cual las marcaría para ser degradadas por el sistema del proteasoma 26 (Wang et al. 2004).

La degradación de etileno ocurre en forma gradual pasando a óxido de etileno, ácido oxálico y CO<sub>2</sub>. Por otro lado, no todo el ACC es convertido a etileno, sino que parte de él se conjuga a N-malonil ACC.

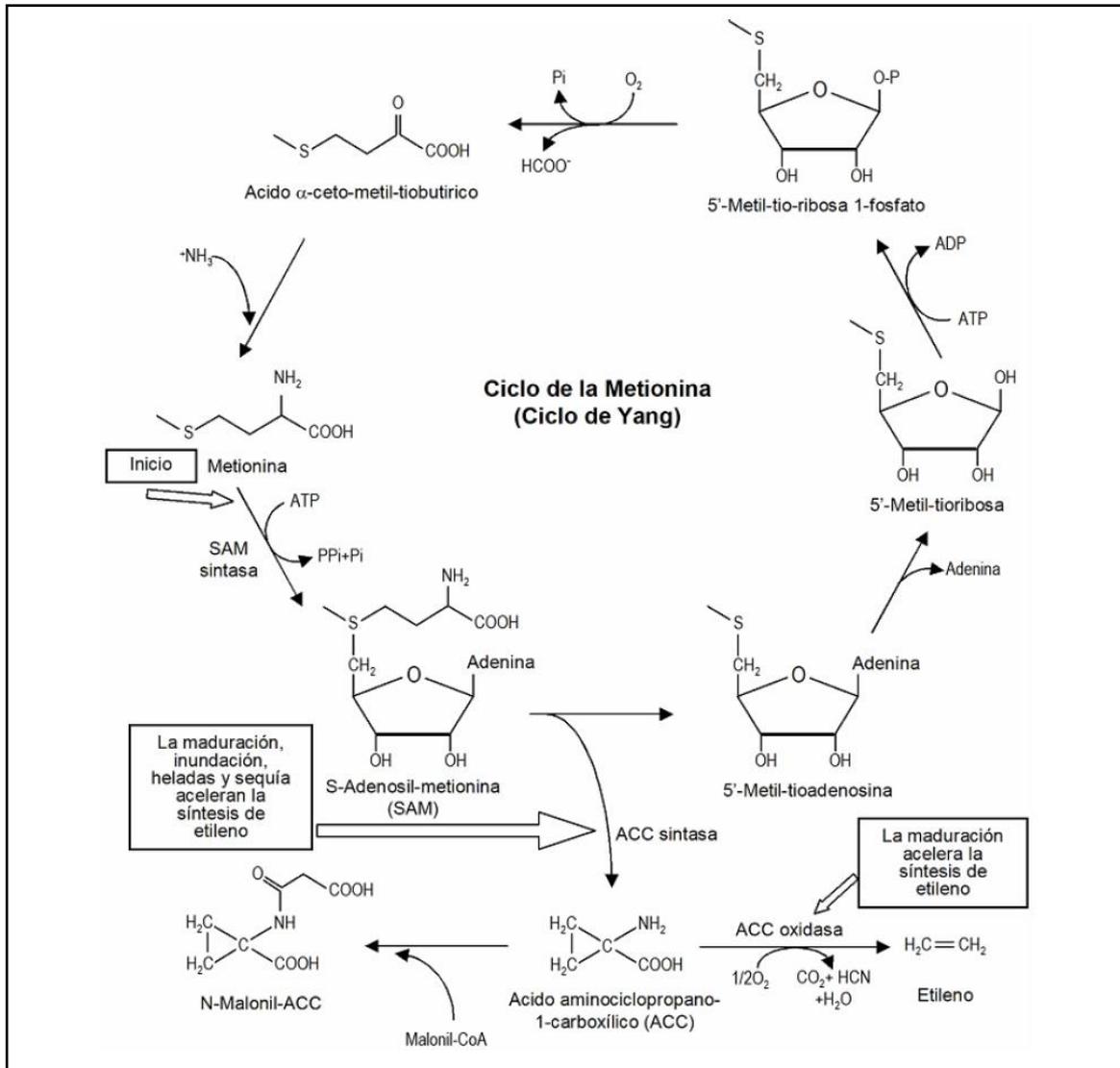


Figura 7. Ciclo de Yang. Fuente: Jordán y Casaretto (2006).

### 1.4.3 Mecanismos de acción

En plantas mutantes de *Arabidopsis* que son insensibles al etileno, se ha determinado a nivel de membranas de retículo endoplásmico y plasmalema un receptor proteico de etileno denominado ETR1 de 79-kDa con dominio transmembrana en forma de dímero. Aparte de ETR1, se han identificado otras proteínas. El receptor ETR se dimeriza (por presencia de una proteína citosólica mediante enlaces disulfuro y con fijación de un ión

---

de  $\text{Cu}^{+2}$ ) iniciando así señales de fosforilación y transferencia del fosfato desde el dominio histidina al dominio receptor anexo de ETR. Luego ETR interactúa con otra quinasa (CTR1) presente en el citosol y la activación de ésta inicia una cascada de MAP quinasas que culmina con la desactivación de la proteína de transmembrana EIN2. Cuando el etileno es percibido, el receptor ETR se inactiva desacoplándose la interacción entre ETR y CTR1. La desactivación de la cascada de quinasas resulta en una proteína EIN2 activa, la cual regula la activación de factores de transcripción EIN3 y EIL1, los que finalmente inducen la expresión de genes específicos de respuesta al etileno. Es importante mencionar que todas las respuestas a etileno comparten la ruta de transducción de señales desde los receptores hasta EIN2. A partir de este punto, diversas rutas de señalización regularían distintas respuestas a etileno (Chen et al. 2005).

Los niveles de factores como EIN3 son regulados por ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S. Los genes blanco de EIN3/EIL1 son genes que también codifican para factores de transcripción. EIN3/EIL1 reconocen “elementos de respuesta primarios” (PERE) presentes en los promotores de genes ERBP (Solano et al. 1998). A su vez, los factores de transcripción EREBPs reconocen cajas GCC en genes de respuesta final a etileno. Un EREBP, ERF1, por ejemplo, está involucrado en regular genes de defensa de la planta y está regulado también por otros reguladores hormonales como ácido jasmónico. Es decir, varios EREBPs pueden actuar como puntos de contacto de señales reguladas por otras hormonas o etapas del desarrollo de la planta (Wang et al. 2002).

#### 1.4.4 Inhibidores y antagonistas a la acción del etileno

Existen diversas sustancias de origen sintético que actúan impidiendo la acción del etileno. Dentro de aquellos que inhiben la síntesis de etileno se encuentran la aminoetoxivinilglicina y el ácido aminooxiacético. Éstos actúan bloqueando la conversión de AdoMet a ACC. Por otra parte el ión  $\text{Co}^{+2}$  bloquea la ACC-oxidasa y el ión  $\text{Ag}^{+}$  inhibe fuertemente la acción de etileno, anulando sus efectos como se ha demostrado en la preservación de pétalos de varias especies florales. Altos niveles de  $\text{CO}_2$  bajo condiciones de almacenamiento, pareciera igualmente reducir el nivel de etileno. Actualmente, el 1-metilciclopropeno (1-MCP) es el bloqueador de etileno más utilizado a nivel comercial (Jordán y Casaretto, 2006).

El 1-MCP es un alqueno cíclico, con fórmula molecular  $\text{C}_4\text{H}_6$  (Figura 8). Se trata de un compuesto gaseoso en condiciones estándar de temperatura y presión, considerado de

---

muy bajo riesgo para la salud humana. Entre sus propiedades físicas se mencionan un punto de fusión inferior a los  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y un punto de ebullición próximo a  $4,7\text{ }^{\circ}\text{C}$  (como líquido inestable). Su utilidad radica en la regulación de la maduración de frutos climatéricos, la inhibición de la senescencia de hortalizas de hoja, de flores de corte y de muchas especies de plantas ornamentales (Blankenship, 2003). La exposición durante varias horas al 1-MCP, en concentraciones variables según la especie, vuelve a ciertas frutas y hortalizas insensibles al etileno por períodos de tiempo considerables (Sozzi, 2007).



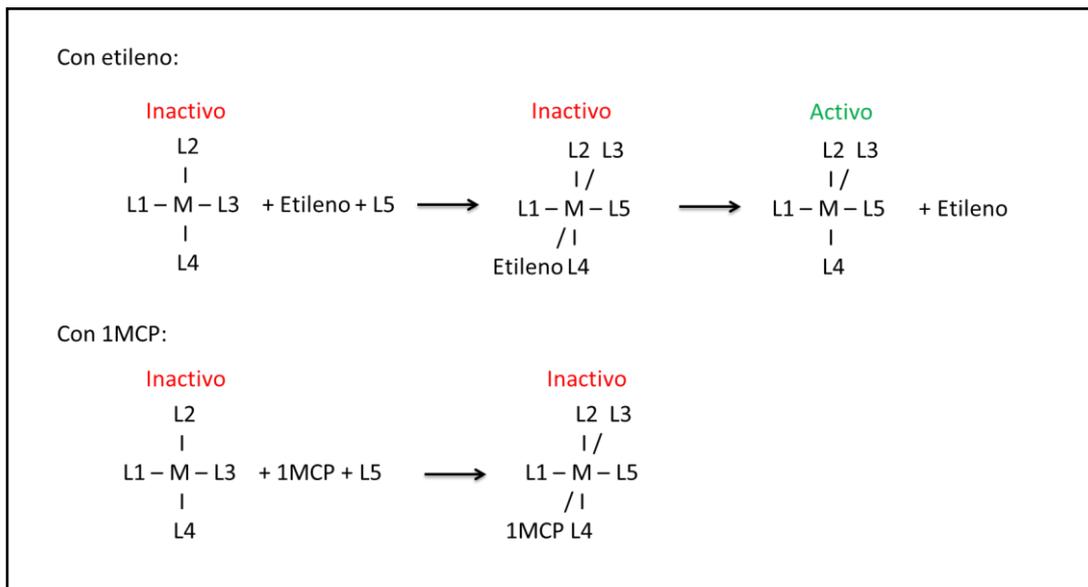
**Figura 8.** Estructura química del alqueno 1-metilciclopropeno.

#### 1.4.5 Mecanismo de acción del 1-metilciclopropeno

El 1-MCP compite con el etileno por el sitio activo en las proteínas de membrana receptoras del etileno. Luego de que una molécula de 1-MCP se une al sitio activo de un receptor, actúa como agente bloqueante impidiendo el acceso del etileno a dicho sitio. La unión del 1-MCP al sitio activo de los receptores del etileno es prácticamente irreversible. Así, el 1-MCP inhibe todos aquellos procesos de la maduración dependientes de la acción del etileno. La maduración posterior de los frutos tratados con 1-MCP se produciría por su capacidad de sintetizar nuevos receptores luego de la aplicación del producto. Por no haber sido expuestos a la presencia de 1-MCP, esos nuevos receptores no se hallan bloqueados. Así, el etileno puede eventualmente unirse a ellos de forma reversible y desarrollar sus funciones regulatorias, desencadenando la cascada de señales conducente a la maduración (Sisler, 1997).

El mecanismo a nivel de membrana por el cual el 1-MCP se une a los receptores de etileno es similar a la forma en la que el etileno acopla con los sitios activos. Normalmente el etileno retira electrones de un metal (M) de proteínas receptoras de membrana. Este M está rodeado por ligandos (L1, L2, L3, L4, L5) de estructura desconocida. Luego se produce una sustitución en uno de los ligandos y finalmente se

desprende el etileno con lo cual se forma un complejo activo que induce una acción de respuesta (Figura 9). El 1-MCP debería ser capaz de inducir tal respuesta ya que, teóricamente, también retiraría electrones de un metal. Pero como el 1-MCP permanece unido al metal del receptor, la formación de un complejo activo no se completa, bloqueando así efectivamente el receptor. Se plantea la hipótesis de que el etileno puede salir del receptor, y que esta salida es necesaria para la formación del complejo activo, el etileno no sería entonces una parte del complejo activo, sino el iniciador de su formación (Sisler, 1997).



**Figura 9.** Modelo propuesto para la acción del etileno y del 1- metilciclopropeno (1-MCP) en los receptores de etileno. M: metal; L1, L2, L3, L4, L5: ligandos de estructura desconocida. Adaptado de: Sisler (1997).

#### 1.4.6 Efectos de la aplicación de 1-metilciclopropeno en frutos de manzana

Conjuntamente con los efectos sobre el retraso de la madurez de los frutos, la inhibición del etileno a través del 1-MCP ha demostrado otros efectos sobre los frutos de manzana. Fanjaniaina Fawbush et al. (2009) han encontrado que la actividad antioxidante fue mayor tanto en la piel como en la pulpa de frutos de manzana tratados con 1-MCP y conservados en atmósfera controlada. Datos similares también fueron hallados por MacLean et al. (2003). La razón por la cual hay un mayor nivel de actividad antioxidante en frutos tratados con 1-MCP conservados en cámara frigorífica es incierto. MacLean et al. (2003) sugieren que la mayor concentración de antioxidantes en frutos tratados con 1-MCP puede ser resultado de la habilidad del 1-MCP, a través de un mecanismo desconocido, de inhibir la generación de radicales libres. MacLean et al. (2006)

determinaron mayores niveles de antocianinas y flavonoides y menores niveles de ácido clorogénico en manzanas Delicious tratadas con 1-MCP en comparación con las no tratadas y también conservadas en cámara frigorífica.

Asimismo se registró mayor actividad de la enzima peroxidasa en frutos tratados con 1-MCP con respecto a los frutos testigos, sugiriendo así que el 1-MCP podría tener un efecto complejo en el metabolismo del fruto (Vilaplana et al., 2006)

Diversos efectos del 1-MCP se han descrito sobre frutos de manzana en relación a su calidad nutricional y componentes, como así también efectos sobre el metabolismo y desórdenes fisiológicos durante la conservación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Algunos efectos del 1-metilciclopeno (1-MCP) en frutos de manzana.

<b>Efecto del 1-MCP sobre la calidad nutritiva, los compuestos bioactivos, el metabolismo y desórdenes</b>	
<b>Aumenta</b>	<b>No afecta</b>
Actividad antioxidante total hidrosoluble y el contenido en compuestos fenólicos en la piel, flavonoides y ácido clorogénico.  Contenido de vitamina C	
<b>Efecto del 1-MCP sobre la calidad organoléptica y metabolismo</b>	
<b>Reduce o retrasa</b>	<b>No afecta</b>
Producción de etileno, respiración, ablandamiento, pérdida de acidez, cambios de color y producción de aromas.	Contenido en sólidos solubles y acidez titulable en diferentes variedades.
<b>Efecto del 1-MCP sobre desórdenes fisiológicos durante almacenamiento</b>	
<b>Disminuye</b>	<b>Aumenta</b>
Escaldado superficial, escaldado húmedo, corazón pardo, lenticelosis, decaimiento de senescencia, escaldadura de sol, harinosidad y pardeamiento interno. También puede reducir la sensibilidad al rolado durante la poscosecha de los frutos.	Podredumbre amarga y contaminación fúngica en algunas variedades.  Los frutos de cosechas tempranas y tratados con 1-MCP manifiestan la deficiencia de calcio con síntomas de plara, más que con bitter pit.  El tratamiento con 1-MCP incrementa el riesgo de daño por CO <sup>2</sup> .

Adaptado de: Guillen (2009) y Calvo y Candan (2013).

---

## 2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La manzana variedad Granny Smith es apta para largos períodos de conservación refrigerada. Habitualmente, la fruta sana se almacena a granel en contenedores bins de 400 kg, y así se guarda en cámaras frigoríficas. Previo a la comercialización los frutos se clasifican por calidad y se embalan según estándares pautados internacionalmente.

En general, los frutos que presentan daño de sol no son destinados a conservación a largo plazo en cámaras frigoríficas, ya que tienen mayor predisposición a desarrollar fisiopatías como el escaldado de sol y a perder calidad durante el almacenamiento en poscosecha. Las mermas de producción por el daño por sol a campo y durante la conservación en frutos de manzanas son elevadas en la mayoría de las regiones frutícolas del mundo y en la región del Alto Valle de Río Negro pueden llegar al 25-55% dependiendo de la variedad (Colavita 2008). Por todo esto, el daño por sol es un desorden de suma importancia para la producción frutícola regional.

El daño por sol en frutos ha sido materia de estudio a nivel agronómico durante muchos años, pero las investigaciones a nivel bioquímico y molecular han cobrado importancia en los últimos años, permitiendo un abordaje desde su acción en el metabolismo oxidativo y en los distintos mecanismos de defensa antioxidante tales como pigmentos, enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico, etc. Por otra parte, el 1-MCP se ha generalizado como una tecnología utilizada para la conservación a largo plazo de frutos debido a su potente efecto inhibidor del etileno. Su acción ha sido también ampliamente estudiada en relación a los distintos procesos relacionados con la maduración sobre los frutos de manzana. Sin embargo, es escasa la información del efecto de la inhibición del etileno durante la conservación refrigerada sobre el metabolismo oxidativo de frutos con daño de sol. Consecuentemente, las pérdidas económicas ocasionadas por el daño de sol en frutos de manzana y los estudios insuficientes sobre el efecto de la inhibición de etileno sobre el metabolismo oxidativo de estos frutos, justifican la profundización en el conocimiento fisiológico y bioquímico de este proceso.

---

### **3 HIPÓTESIS**

**La inhibición de la acción del etileno, atenúa los procesos oxidativos durante la poscosecha en manzanas con síntomas de estrés por alta radiación solar.**

---

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto que tiene la inhibición de la acción del etileno en los procesos oxidativos durante la conservación refrigerada de frutos de manzanas Granny Smith, que presentan síntomas de estrés por alta radiación solar.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Analizar la producción de etileno de frutos de manzana con síntomas de estrés por alta radiación solar y tratados con 1-MCP durante la conservación frigorífica.
- Determinar el efecto de la inhibición del etileno sobre el sistema antioxidante en frutos de manzana con síntomas de estrés por alta radiación solar durante la poscosecha.
- Comparar el efecto de la inhibición del etileno en la calidad de frutos de manzana sanos y con daño de sol durante la poscosecha.

---

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material vegetal

El material vegetal sobre el cual se realizaron las evaluaciones fisiológicas y bioquímicas fueron frutos de manzana (*Malus domestica* Borkh.) var. Granny Smith. Los frutos fueron cosechados entre 3-7 días luego de la fecha oficial de inicio de cosecha indicada por SENASA, en un establecimiento comercial en plena producción ubicado en la zona de Centenario. Se seleccionaron 200 frutos con un sector de epidermis con síntomas visibles de daño de sol grado 1 (DS1), según la clasificación de Shrader et al. (2003). Este sector presentó un área de color amarillo o con un ligero descoloramiento, sin zonas de color marrón o necróticas. Asimismo se recolectaron 200 frutos con epidermis sana (S), en la cual no se observaban síntomas de daños de sol u otros desórdenes (Foto 3).

Todos los frutos fueron tratados con una solución de Captan (50% p/v) a una dosis de 40 g/100 l, para el control de enfermedades fúngicas durante el período de conservación.

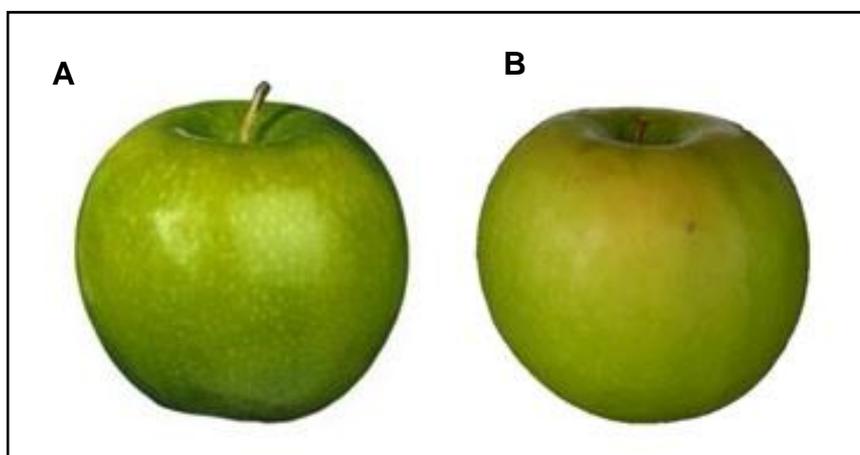


Foto 3. A: Frutos sanos (S) y B: frutos con daño de sol grado 1 (DS1).

### 5.2 Tratamiento de inhibición de la producción de etileno

Para el tratamiento de inhibición del etileno a través del 1-MCP se seleccionaron 100 frutos S y 100 frutos DS1. Los mismos fueron llevados a una cámara frigorífica comercial a 0°C +/- 1°C. El 1-MCP se aplicó dentro de las 24 h de cosechada la fruta. La dosis se

---

calculó por peso del producto según las especificaciones del fabricante, donde 1,28 g de 1-MCP SmartFresh® polvo (0,14% de ingrediente activo, AgroFresh Inc./Rohm & Haas Company) producen 800 ppb de 1-MCP en 1 m<sup>3</sup>. La aplicación se realizó en la cámara frigorífica, durante 24 h. El 1-MCP gaseoso fue liberado de contenedores al adicionarle agua tibia (40°C). Se prendieron los ventiladores dentro de cada cámara para una mejor distribución del gas dentro de la misma. Los frutos sin tratamiento de inhibición de etileno se dejaron bajo las mismas condiciones frigoríficas el tiempo que duró el tratamiento, sin la aplicación de 1-MCP. Durante el enfriado y tratamiento, la fruta permaneció en canastos plásticos.

### **5.3 Acondicionamiento de los frutos y período de evaluaciones**

Los frutos expuestos a 1-MCP (S-I y DS1-I) y los frutos sin tratar (S-N y DS1-N) se embalaron en una caja de 100 frutos por cada tratamiento y fueron colocadas en una cámara frigorífica de un establecimiento comercial para su conservación en atmósfera convencional a 0°C +/- 1°C y humedad relativa de 95%. A cosecha (día 0) y a los 90 y 180 días de conservación se retiraron frutos de los cuatro tratamientos para su evaluación.

### **5.4 Evaluación de parámetros de madurez**

La firmeza de pulpa se determinó sobre un total de 20 frutos de cada tratamiento a través de un presiómetro Effegi modelo 327 (Italia), con émbolo de 11 mm. Se retiró la piel y se realizaron dos lecturas en la zona ecuatorial, una en el tejido S y otra en el tejido con DS-1 (Mitcham et al., 1996). Los resultados fueron expresados en libras.pulg<sup>-2</sup>.

Para la determinación de la concentración de sólidos solubles se realizó la extracción de jugo en los 20 frutos anteriormente mencionados. Los sólidos solubles se cuantificaron utilizando un refractómetro ERMA 0-32% (Tokio, Japón) y los resultados se expresaron en grados Brix (Mitcham et al., 1996).

---

## 5.5 Determinaciones fisiológicas y bioquímicas

Todas las determinaciones fisiológicas y bioquímicas se realizaron en 6 repeticiones de un fruto cada una. En cada fruto se tomaron muestras de la piel de aproximadamente 1mm de espesor de la cara que presentaba daño de sol y de la cara opuesta (Tejido sano).

### 5.5.1 Producción de etileno

La producción de etileno de frutos se determinó a través de cromatografía gaseosa en el momento de cosecha, y las evaluaciones a 90 y 180 días se realizaron después de 24 horas de salida de cámara. Los frutos fueron colocados durante 30 minutos en frascos de 1,5 l con cierre hermético. Luego de este periodo, se tomó con una jeringa una muestra de 1 ml de aire del espacio de cabeza. La muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases (GC-14A Shimadzu, Japón) equipado con columna de alúmina (40°C) y detector FID (210°C). Se utilizó helio como gas transportador. Con este dato, se relacionó la cantidad de etileno producido con el peso del fruto y el tiempo de encierro. La producción de etileno se expresó como  $\text{nl.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Las curvas de producción de etileno de frutos a los 90 y 180 días de conservación refrigerada se construyeron a través de mediciones en forma diaria a lo largo de 23 días a 20°C (Gomila et al., 2011).

### 5.5.2 Integridad de membrana

La integridad de la membrana se evaluó a través de la adaptación de la técnica de pérdida de electrolitos de tejidos vegetales propuesta por Campos et al. (2003) y Bajji et al. (2002). Se extrajeron 6 réplicas de 10 discos de 1 cm de diámetro de piel de los frutos que se colocaron en tubos de 20 ml de agua bidestilada. Las muestras se agitaron a 150 rpm a 20°C durante 1 h en y luego se determinó la conductividad eléctrica con un conductímetro (modelo TCL- 930, LIEE, Argentina). El valor determinado corresponde a la conductividad inicial. Luego las muestras fueron congeladas por 24 h, se descongelaron y se determinó nuevamente la conductividad eléctrica. Los valores de esta medición se consideraron como conductividad total ó 100 % del tejido. La pérdida de electrolitos se calculó como el porcentaje de la conductividad inicial respecto de la conductividad total.

---

### 5.5.3 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue medida en términos de concentración de TBARs principalmente MDA a través de la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Hodges et al., 1999). Se homogeneizó 0,25 g de piel con 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. El homogenato fue centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. Una alícuota de 0,5 ml del sobrenadante se colocó en un tubo de ensayo y se le adicionó 2 ml de TCA 20% (TBA-). Otra alícuota de 0,5 ml fue colocada en otro tubo de ensayo con una solución de 0,1% de TBA realizada a partir de TCA 20% (TBA+). Ambos tubos fueron calentados en baño de agua a 95 °C por 30 min y luego rápidamente enfriados en hielo. Luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm en un espectrofotómetro UV-Vis DU-80 Beckman Coulter (Alemania). Se sustrajo el valor de absorbancia no específica por turbidez leído a 440 nm y a 600 nm. Las mismas lecturas se realizaron para las muestras sin reaccionar con el TBA. Este último valor se restó al anterior, eliminando de esa manera la interferencia de pigmentos y otros compuestos que absorben a la misma longitud de onda. Se utilizó un coeficiente de extinción molar del MDA a 532 nm de 157 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La absorción molar de la sacarosa a 532 nm y a 440 nm es de 8,8 y 147,0 respectivamente, dando una relación de 0,057 (e). La concentración de MDA fue calculada como:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = [(A-C-B)/157000].10^6$$

Dónde:

$A = A_{\text{TBA+532}} - A_{\text{TBA+600}}$	Estimación bruta de MDA
$B = (A_{\text{TBA+440}} - A_{\text{TBA+600}}) \cdot e$	Interferencia por sacarosa
$C = A_{\text{TBA-532}} - A_{\text{TBA-600}}$	Interferencia por antocianinas

### 5.5.4 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó usando el método del 2,2, difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) desarrollado por Brand-Williams et al. (1995). Se disolvió DPPH en metanol

---

100% y se ajustó a 1,1 de absorción a 515 nm. Se homogeneizó 0,25 g de piel de manzana en nitrógeno líquido con HCl: metanol (0,5%), se agitó a 150 rpm a 20°C durante 2 horas y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min. Una alícuota de 40 µl del sobrenadante se diluyó en 120 µl de agua bidestilada. Luego se extrajeron 20 µl de la solución y se le incorporaron 780 µl de la solución metanólica de DPPH para constituir la muestra A<sub>B</sub>. Se realizó un blanco (A<sub>A</sub>) con 20 µl de agua bidestilada con 780 µl de solución de DPPH. A<sub>A</sub> y A<sub>B</sub> se incubaron durante 30 min en la oscuridad a 4°C. La disminución en la absorbancia se determinó a 515 nm. La actividad antioxidante de las muestras fue evaluada a través de su capacidad de reducción del radical libre-DPPH y fue expresada como porcentaje de inhibición de DPPH.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = [(A_A - A_B) / A_A] * 100$$

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

#### 5.5.5 Contenido de la clorofila

El contenido de clorofila en la epidermis de los frutos se realizó a través de la extracción con dimetilsulfóxido (DMSO) y la cuantificación a través de espectrofotometría. Se extrajeron con sacabocado 3 discos de epidermis de 10 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Los discos fueron pesados y colocados en un tubo de ensayo con 3 ml de DMSO. Se colocaron las muestras en estufa a 65 °C durante 2 horas. Pasado el tiempo de reacción, se dejó enfriar durante 15 min y se procedió a medir la absorbancia de clorofila A a 665,1 nm y clorofila B a 649,1 nm en un espectrofotómetro UV-Vis DU-80 Beckman Coulter, Alemania.

Con los valores de absorbancia, se determinó el contenido de clorofila por medio de las ecuaciones propuestas por Wellburn (1994).

$$\text{Clorofila A} = 12,47 \cdot A^{665,1} - 3,62 \cdot A^{649,1}$$

$$\text{Clorofila B} = 25,06 \cdot A^{649,1} - 6,50 \cdot A^{665,1}$$

#### 5.5.6 Determinación alfa-farnesenos y trienos conjugados

Las determinaciones de alfa-farnesenos (AF) y trienos conjugados (TC) se realizaron siguiendo el método descrito por Anet (1972). Se extrajeron con sacabocado 5 discos

---

de piel de 10 mm de diámetro. Luego fueron colocados en 10 ml de hexano grado HPLC y mantenidos en agitación a 120 rpm y 20°C durante 10 min. Luego, 1 ml de esta solución fue diluido en 4 ml de hexano. Las mediciones se realizaron un espectrofotómetro UV-Vis DU-80 Beckman Coulter (Alemania), previamente calibrado con hexano de grado HPLC. Se registró la absorbancia a 232 nm correspondiente a AF y a 281-290 nm para TC. Las concentraciones se calcularon usando el coeficientes de extinción molar a 232 nm = 27.700 y 281-290 nm = 25.000 para para AF y TC respectivamente (Huelin y Coggiola, 1968; Anet, 1972; Du y Bramlage, 1993).

## **5.6 Determinaciones enzimáticas**

### **5.6.1 Preparación del extracto proteico**

Se pulverizaron 2 g de peso fresco de piel de manzana en mortero con nitrógeno líquido. Al polvo de tejido se lo suspendió en 10 ml de de buffer fosfato de potasio 100 mM (pH 7,8) que contenía 0,5% (v/v) de Triton X-100 para aumentar la extractabilidad de la enzima. Se agregó 1 g de polivinilpolipirrolidona que actuó como absorbente de fenoles, dado que la manzana contiene elevados niveles de estos compuestos que interfieren en la extracción y en las determinaciones enzimáticas (Serradell et al., 2000). La mezcla fue dializada toda la noche a 5 °C contra el mismo buffer y luego fue centrifugada a 22.000 g por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recolectado y conservado a -20 °C para las posteriores determinaciones de actividad enzimática (Abassi et al., 1998), que se realizaron mediante espectrofotometría usando un espectrofotómetro Shimadzu 240 UV-Vis de doble haz.

### **5.6.2 Actividad de Superóxido dismutasa (SOD)**

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

---

NADH. El medio de reacción fue 800 µl trietanolamina-dietanolamina 100mM (pH 7,4), 100 µl de solución EDTA 100 mM más MnCl<sub>2</sub> 50 mM (pH 7,0), 40 µl NADH 7,5 mM; a esta mezcla se le agregó 5-25 µl de muestra (o agua o buffer), 100 µl mercaptoetanol 10 mM se mezcló suavemente se dejó reaccionar por 10 minutos y luego se leyó el decrecimiento en la absorbancia a 340 nm por 5 minutos. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que reduce a la mitad la velocidad de oxidación del NADH, tomando como referencia una cantidad inicial de NADH equivalente a una unidad de absorbancia. Para el cálculo de las unidades de SOD presentes en las muestras se usó la fórmula:

$$VSOD = VMAX / [1 + (Vol / K0,5)]$$

Donde,

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

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

Vol: volumen de muestra empleado.

K0,5: volumen de muestra que contiene una unidad de SOD, expresado en las mismas unidades que Vol.

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

$$1/ VSOD = 1/ VMAX + [1/ (VMAX .K0,5 )] . Vol$$

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

### 5.6.3 Actividad de Ascorbato peróxidasa (APX)

La actividad de APX se midió siguiendo la oxidación del ascorbato por la disminución de la absorbancia a 290 nm (coeficiente de extinción 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Mishra et al., 1993).

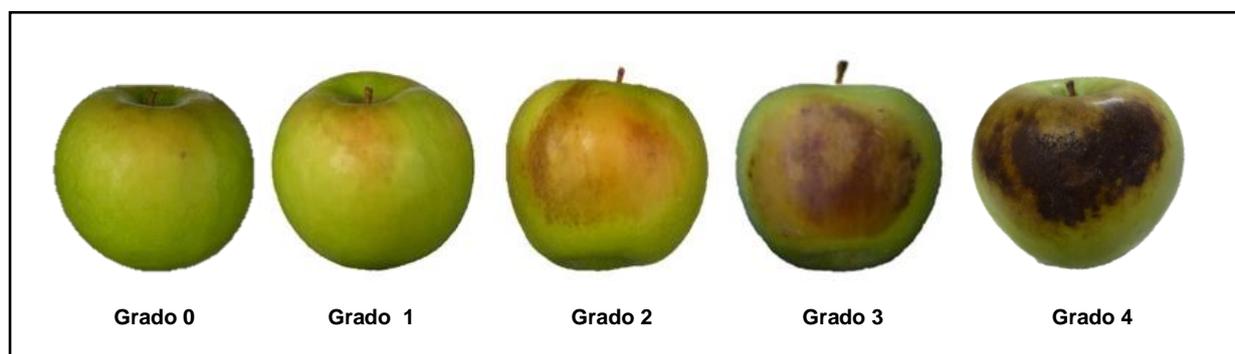
El ensayo fue realizado a 20 °C y el medio de reacción contenía buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, ascorbato de Na 0,5 mM y 0,1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 100 µL de muestra. La reacción se disparó con el agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el cambio en la absorbancia se midió desde 10 a 30 segundos después de la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizó una

---

corrección con el dato de la oxidación del ascorbato por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ausencia de la muestra.

### 5.7 Evaluación de escaldado de sol durante la conservación en frío

La evolución de la escaldadura de sol se realizó visualmente cuantificando la incidencia y severidad del cambio de color de amarillo a pardo (Contreras et al., 2008) sobre los mismos 40 frutos a lo largo del periodo evaluado por tratamiento (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 días). La evaluación se realizó al momento de la remoción de los frutos de la cámara frigorífica. La severidad del daño correspondió al área afectada del fruto según una escala de cambio de color. En la Foto 4 se observa la escala, donde grado 0 corresponde a frutos con daño de sol leve pero sin escaldadura de sol, 1 a la menor severidad de escaldadura de sol hasta el grado 4, el cual corresponde a la mayor severidad. Los resultados fueron expresados como porcentaje de frutos afectados con cada uno de los grados indicados.



**Foto 4.** Escala de clasificación de severidad de escaldadura de sol en Granny Smith. Grado 0, fruto con daño de sol de campo sin escaldado de sol debido a conservación; Grado 1, fruto que presenta inicio de escaldado de sol y superficie no mayor a la mitad cara expuesta; Grado 2, fruto que presenta toda la cara expuesta escaldada y tonos pardos; Grado 3, fruto que presenta toda la cara expuesta afectada y tonos pardos oscuros; Grado 4, fruto que presenta toda la cara expuesta afectada y mayor porcentaje de colores oscuros en la mancha de escaldado.

### 5.8 Análisis estadístico

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

---

Para detectar diferencias entre las medias de los tejidos de cada tipo de fruto y sus tratamientos, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para cada variable en estudio. El nivel de significación estadístico se estableció en  $\alpha= 0,05$  y los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  un desvío estándar.

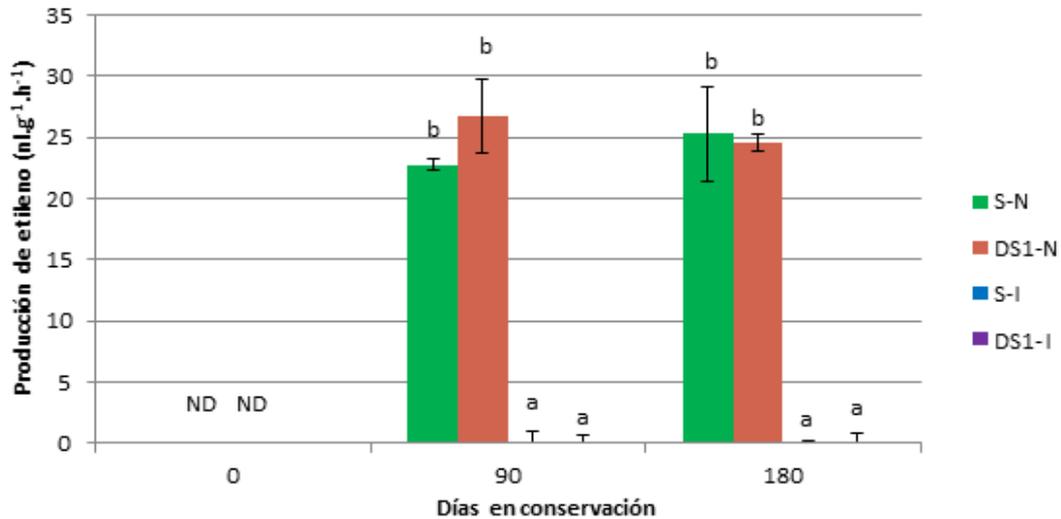
Cuando en el ANOVA se determinaron diferencias significativas las comparaciones fueron hechas usando la prueba de igualdad de medias de Tukey.

Los programas estadísticos utilizados fueron el InfoStat versión 1.1. y STATISTICA versión 8.0.

---

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Producción de etileno

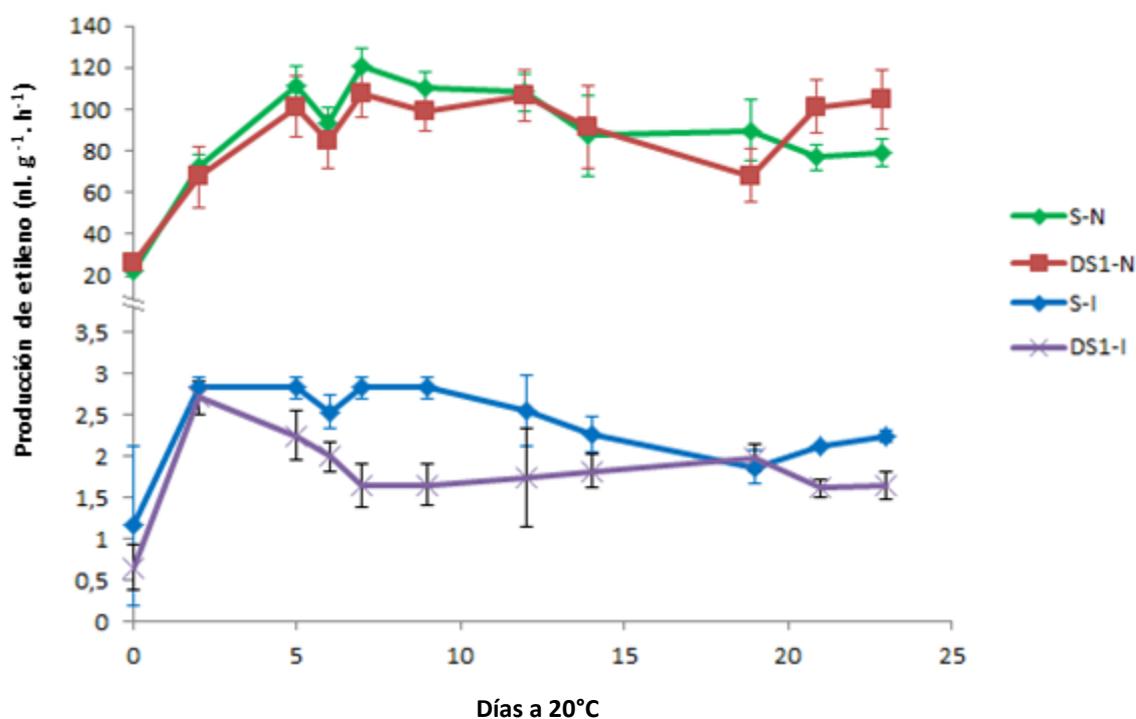


En la evaluación realizada en madurez inicial de los frutos, luego de 5 días de la cosecha no se detectó producción de etileno, tanto en frutos sanos como en aquellos con daño de sol. A los 90 y 180 días de conservación y en forma inmediata a la salida de cámara frigorífica se observó 18 veces más de producción de etileno en los frutos S-N y DS1-N respecto a aquellos con inhibición de etileno (Figura 8). Los frutos tratados con 1-MCP presentaron niveles de etileno menores a  $2 \text{ nl.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , lo cual indica una efectiva acción inhibitoria en la producción de etileno.

**Figura 8.** Producción de etileno ( $\text{nl.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) a 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol leve con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol leve con etileno inhibido (DS1-I). ND: no detectable. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

En la Figura 9 se puede observar la evolución de los niveles de etileno durante 23 días a  $20^\circ\text{C}$  en los frutos conservados en cámara frigorífica durante 90 días. Los frutos S-N y DS1-N mostraron un incremento significativo en la producción de etileno, especialmente durante los primeros 5 días. Luego se detectaron valores cercanos a los  $100 \text{ nl.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  hasta los 23 días. Los frutos S-N no se diferenciaron estadísticamente de los frutos DS1-N, durante todo el período evaluado.

Los frutos tratados con 1-MCP presentaron valores significativamente menores de producción de etileno a  $20^\circ\text{C}$  respecto a aquellos tratados con 1-MCP. Sin embargo, se observó también un incremento en los primeros días y luego se mantuvo relativamente constante entre  $2-3 \text{ nl.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Entre los días 5 y 10 se observó una mayor producción de etileno estadísticamente significativa en los frutos S-I, respecto a DS1-I.

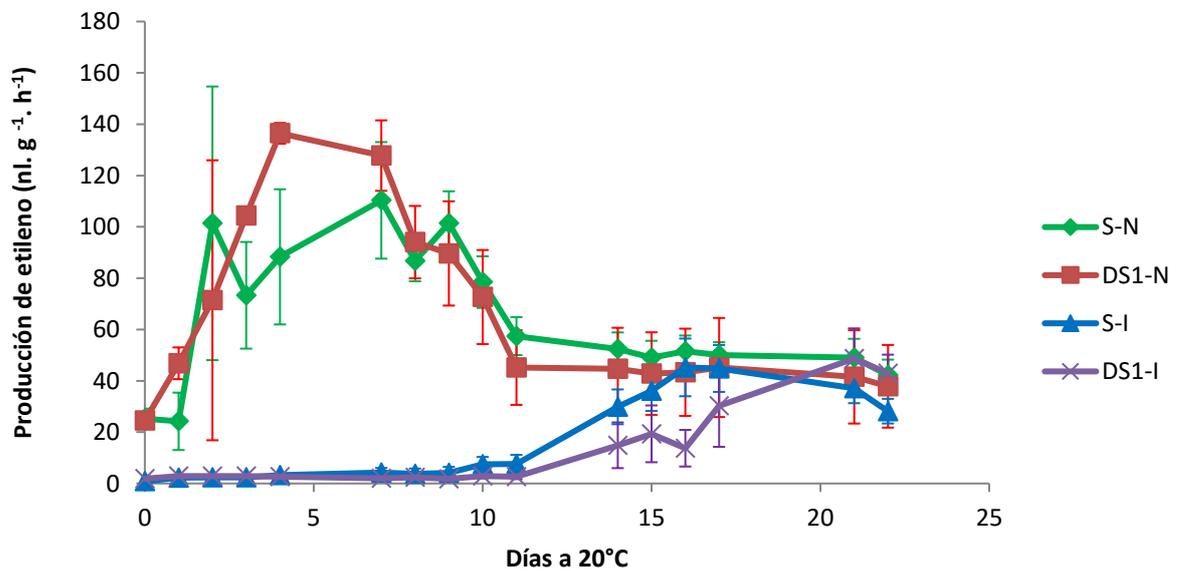


**Figura 9.** Evolución de la producción de etileno ( $\text{nl.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) a lo largo de 23 días a  $20^\circ\text{C}$  después de 90 días de conservación frigorífica ( $0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal

(S-N), frutos con daño por sol leve con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol leve con etileno inhibido (DS1-I). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

En los resultados obtenidos en frutos conservados durante 180 días y expuestos a 20°C a los largo de 23 días (Figura 10) se observa nuevamente que los frutos S-N y DS1-N muestran un incremento significativo de la producción de etileno durante los primeros 5-7 días, alcanzando valores en promedio de 110  $\text{nl}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Luego comienza a descender, llegando a valores en promedio de 40  $\text{nl}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  en el día 23. No se detectaron diferencias significativas entre los frutos sanos y con daño de sol cuando la acción del etileno estaba inhibida.

Los frutos tratados con 1-MCP presentaron valores estadísticamente inferiores de etileno durante los primeros 14 días a 20°C respecto a aquellos sin tratar. A partir de ese momento no se detectan diferencias significativas entre los frutos con inhibición de etileno y aquellos que presentan una producción normal para cualquiera de los niveles de daño de sol estudiado.



**Figura 10.** Evolución de la producción de etileno ( $\text{nl}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) a lo largo de 23 días a 20°C, después de 180 días de conservación frigorífica ( $0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol leve con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol leve con etileno inhibido (DS1-I). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

---

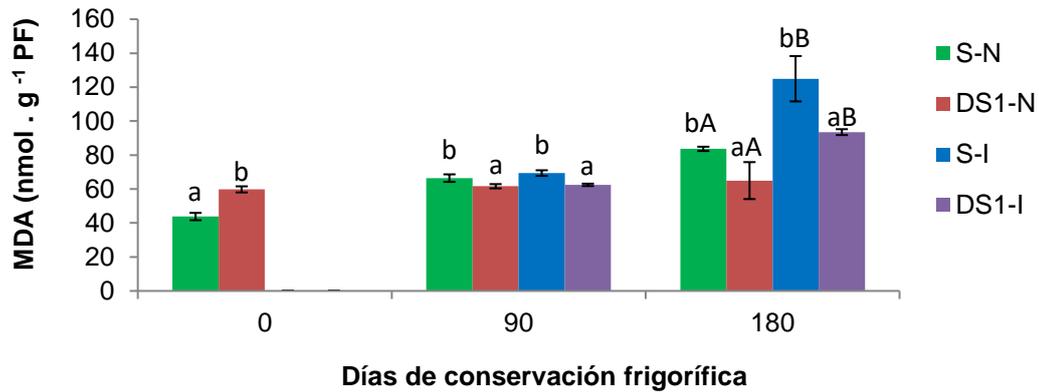
Al comparar los resultados obtenidos a 90 y 180 días se observa que los frutos S-N y DS1-N se comportan en forma similar durante todo el periodo evaluado. Luego, en la evaluación realizada a 180 días se detecta una disminución de la producción de etileno en estos frutos. En los frutos S-I y DS1-I también se observó una producción similar de etileno durante los primeros días en ambos análisis. Sin embargo, en la evaluación a 180 días, se produce a partir del día 13 un incremento en la producción de etileno en estos frutos.

Por lo tanto, se determinó una inhibición de etileno en los frutos a través de la aplicación de 1-MCP independientemente si se trató de frutos sanos o con daño de sol.

## **6.2 Metabolismo oxidativo**

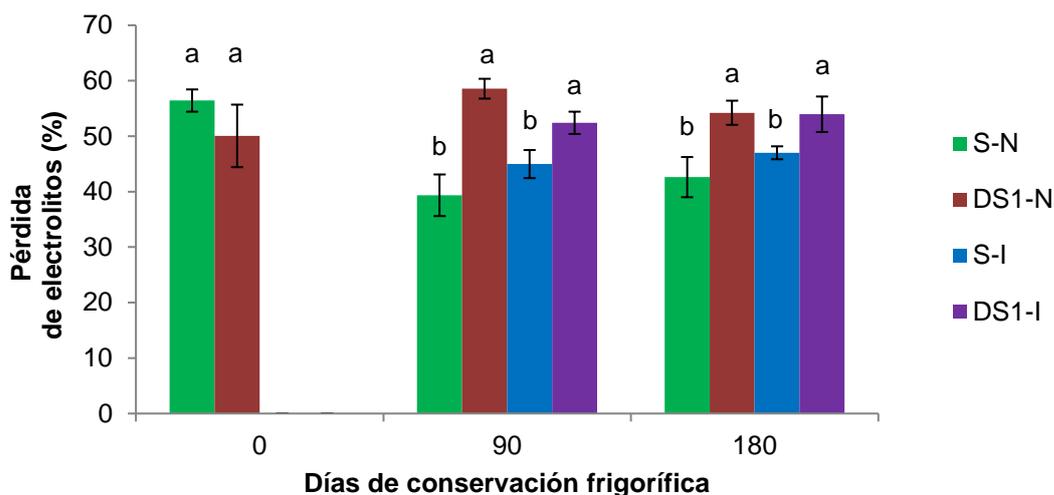
En la Figura 11 se observa a cosecha que los tejidos con daño por sol presentaron un 36% más de peroxidación de lípidos que los tejidos de los frutos sanos. Posteriormente, en el análisis a los 90 días, la peroxidación de lípidos de membrana se incrementó en forma estadísticamente significativa en los tejidos S-N y S-I respecto a los tejidos DS1-N y DS1-I. En esta evaluación se observó una fuerte incidencia del tejido estudiado sobre la peroxidación de lípidos.

A los 180 días, se detectó nuevamente un incremento en la peroxidación de lípidos en los frutos sanos respecto a los frutos con daño de sol. En el caso de S-N fue 28% más que DS1-N y en S-I 33% más que DS1-I. Asimismo se detectó un incremento significativo en promedio del 43% de peroxidación de lípidos en los frutos tratados con 1-MCP respecto a los no tratados (Figura 11).



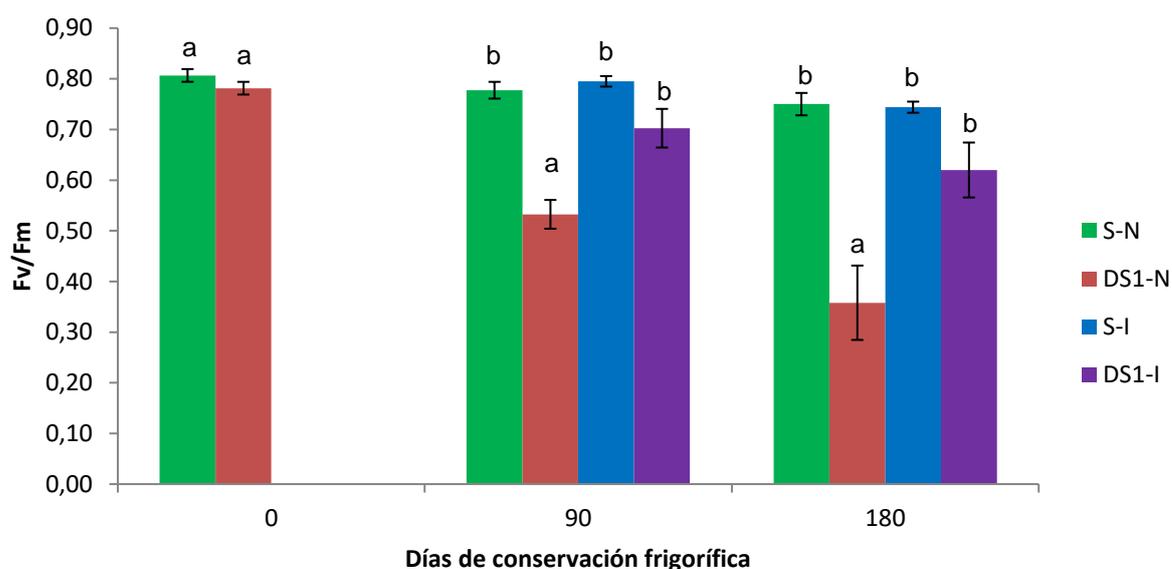
**Figura 11.** Peroxidación de lípidos a 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) medida en MDA ( $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ PF}$ ) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol con etileno inhibido (DS1-I). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en la condición de fruto dentro de cada período evaluado, letras mayúsculas indican diferencias entre frutos con y sin inhibición del etileno dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

No se encontraron diferencias en la integridad de membrana en los frutos sanos respecto a aquellos con síntoma de daño de sol leve al momento de cosecha (Figura 12). Sin embargo, a los 90 y 180 días de conservación en frío los frutos DS1-N y DS1-I presentaron mayor pérdida de electrolitos estadísticamente significativa respecto a los frutos S-N y S-I. No se detectó un efecto de la inhibición del etileno sobre la integridad de membrana en ninguno de los períodos analizados.



**Figura 12.** Pérdida de electrolitos a 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño de sol leve con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño de sol con etileno inhibido (DS1-I). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

Al momento de cosecha no se encontraron diferencias significativas en el parámetro fluorescencia de la clorofila ( $F_v/F_m$ ) entre la piel de los frutos sanos y la de frutos con daño por sol, registrándose valores en promedio de 0,79 (Figura 13). A los 90 y 180 días de conservación en frío convencional se detectó una interacción significativa entre la condición del fruto y la inhibición del etileno. En ambos análisis no se detectaron diferencias significativas entre S-N y S-I y DS1-I. Los frutos DS1-N mostraron valores estadísticamente menores de fluorescencia de la clorofila respecto a los demás tratamientos.

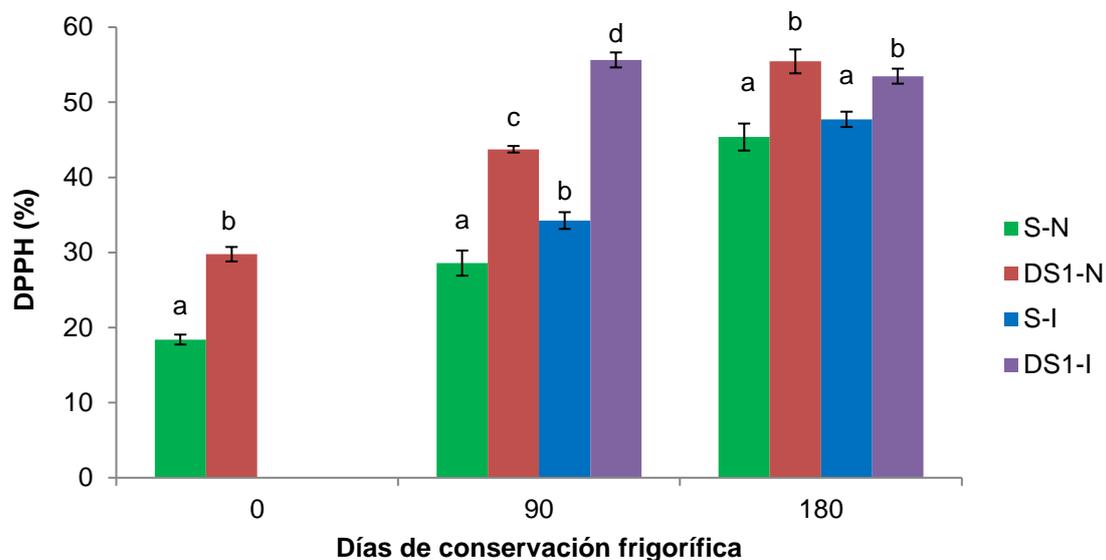


**Figura 13.** Fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) a 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol con etileno inhibido (DS1-I). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

La capacidad antioxidante-DPPH de los frutos de manzana se incrementó durante la conservación refrigerada independientemente del nivel daño de sol o la inhibición del etileno a la que fueron sometidos (Figura 14).

Al día 0, la piel de los frutos con daño por sol leve presentó un 66% más de capacidad antioxidante respecto a los frutos sanos. A los 90 días de conservación frigorífica, todos los tejidos y tratamientos estudiados se diferenciaron estadísticamente. Los frutos S-N presentaron la menor capacidad antioxidante 29% seguida por los S-I (34%) luego DS1-N (44%) y DS1-I (56%).

A los 180 días de conservación se observa una mayor capacidad antioxidante estadísticamente significativa en los frutos con daño de sol respecto a aquellos sanos, independientemente de la inhibición del etileno.



**Figura 14.** Capacidad antioxidante- DPPH a 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol con etileno inhibido (DS1-I). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

La Tabla 3 presenta la actividad de SOD obtenida a 0, 90 y 180 días de conservación refrigerada. Al día 0 los frutos con daño de sol presentaron un 8 veces más de actividad de SOD, respecto a aquellos sanos.

A los 90 y 180 días de conservación en frío la actividad de SOD fue 5 veces y 15 veces mayor, respectivamente, en los tejidos con daño de sol en comparación a los tejidos sanos, sin diferencias entre los frutos con y sin 1-MCP (Tabla 3).

**Tabla 3.** Niveles enzimáticos de Superóxido dismutasa (SOD) a los 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol con etileno inhibido (DS1-I).

Tratamiento	Promedio actividad SOD (UI.mg <sup>-1</sup> PF)		
	0 DÍAS	90 DÍAS	180 DÍAS
S-N	5,9 ± 1,14 a	15,2 ± 4,31 a	6,1 ± 1,89 a
DS1-N	48,2 ± 7,45 b	97,4 ± 24,49 b	113,4 ± 24,9 b
S-I		19,9 ± 7,47 a	12,4 ± 0,92 a
DS1-I		83,3 ± 23,5 b	173,2 ± 54,35 b

Los valores representan la media ± error estándar. Letras diferentes para cada columna indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

La actividad de APX fue un 216% mayor en DS1-N respecto a S-N al día 0 de conservación en frío (Tabla 4). A lo largo del almacenaje se observó un leve incremento de la actividad de APX independientemente del tratamiento considerado. Asimismo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para cada periodo evaluado.

**Tabla 4.** Niveles enzimáticos de Ascorbato peroxidasa (APX) a los 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol con etileno inhibido (DS1-I).

Tratamiento	Promedio actividad APX (UI.mg <sup>-1</sup> PF)		
	0 DÍAS	90 DÍAS	180 DÍAS
S-N	1,04 ± 0,09 a	3,66 ± 0,53 a	4,16 ± 0,25 a
DS1-N	2,25 ± 0,07 b	3,67 ± 0,11 a	4,26 ± 0,29 a
S-I	-	3,74 ± 0,28 a	3,85 ± 0,11 a
DS1-I	-	3,95 ± 0,21 a	4,31 ± 0,24 a

Los valores representan la media ± error estándar. Letras diferentes para cada columna indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

Al momento de cosecha los frutos DS1-N presentaron 13,6 nmol.cm<sup>-2</sup> más de AF y 2,6 nmol.cm<sup>-2</sup> menos de TC respecto a S-N (Tabla 5). Se observó un diferente comportamiento de los AF respecto a los TC en los periodos analizados. Los AF mostraron valores estadísticamente superiores en S-N y DS1-N respecto a S-I y DS1-I tanto a 90 como a 180 días. Esto indica un significativo efecto de la inhibición del etileno sobre la concentración de este compuesto.

Con respecto a los TC, los resultados mostraron que existe una interacción entre la condición del fruto y la inhibición del etileno. Los frutos S-N presentaron en promedio 7 veces más y 8 veces más de TC respecto a los demás tratamientos a los 90 y 180 días, respectivamente. Asimismo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre DS1-N, S-I y DS1-I en ambos períodos estudiados.

**Tabla 5.** Concentración de alfa-farnesenos y trienos conjugados a los 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica (0°C ±1°C; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol con etileno inhibido (DS1-I).

Tratamiento	Concentración de alfa- farnesenos (nmol.cm <sup>-2</sup> )		
	0 DÍAS	90 DÍAS	180 DÍAS
S-N	21,7 ± 4,25 a	63,3 ± 17 b	80,4 ± 21,3 b
DS1-N	35,3 ± 6,85 b	36,7 ± 10,72 b	116,6 ± 29,95 b
S-I	-	29,9 ± 3,15 a	36,9 ± 12,97 a
DS1-I	-	15,6 ± 4,71 a	18,2 ± 15,82 a
Concentración de trienos conjugados (nmol.cm <sup>-2</sup> )			
S-N	4,6 ± 0,47 b	25 ± 2,61 b	50 ± 7,82 b
DS1-N	2,0 ± 0,26 a	2,9 ± 1,27 a	10,3 ± 2,75 a
S-I	-	5,3 ± 1,41 a	4,8 ± 0,98 a
DS1-I	-	2,9 ± 1,09 a	3,2 ± 0,98 a

Los valores representan la media ± error estándar. Letras diferentes para cada columna y parámetro indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey. P<0,05.

### 6.3 Parámetros de calidad

En la Tabla 6 se puede observar el contenido de clorofila a, b y total de la piel de frutos de los diferentes tratamientos y períodos de conservación refrigerada estudiados. Al momento de cosecha los frutos con daño de sol presentaron un 44,5%, 30,0% y 41,54% menos de clorofila a, b y total, respectivamente, en comparación a los frutos sanos.

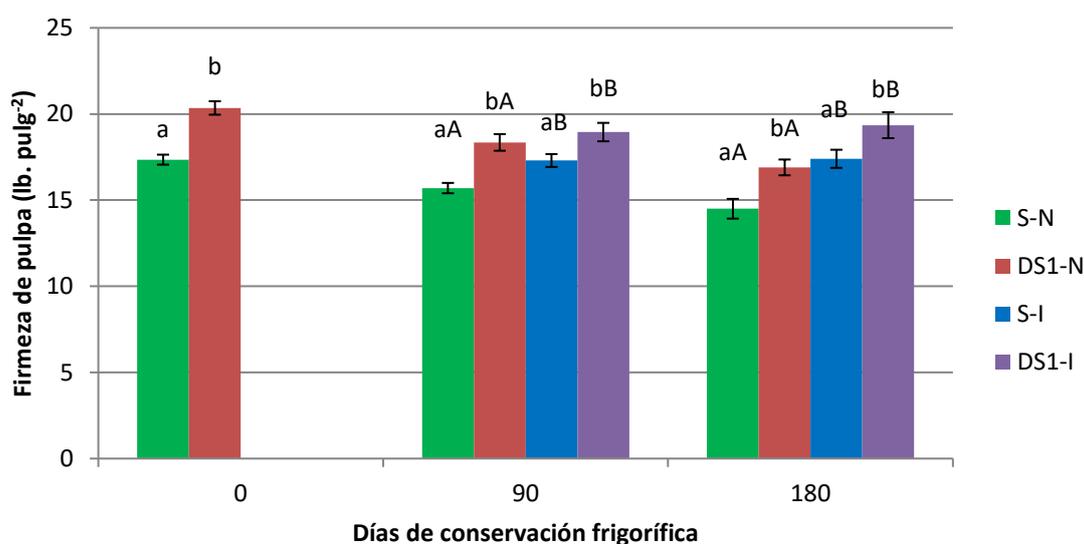
**Tabla 6.** Contenido de clorofila A, B y total a los 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño por sol con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño por sol con etileno inhibido (DS1-I).

Tratamientos	Concentración de clorofila a ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$ )		
	0 DÍAS	90 DÍAS	180 DÍAS
S-N	4,5 $\pm$ 0,2 b	3,9 $\pm$ 0,1 b	3,3 $\pm$ 0,3 b
DS1-N	2,4 $\pm$ 0,2 a	1,8 $\pm$ 0,3 a	0,9 $\pm$ 0,2 a
S-I		3,6 $\pm$ 0,2 b	3,3 $\pm$ 0,4 b
DS1-I		1,4 $\pm$ 0,6 a	1,4 $\pm$ 0,3 a
Concentración de clorofila b ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$ )			
S-N	2,0 $\pm$ 0,1 b	1,5 $\pm$ 0,1 b	1,4 $\pm$ 0,1 b
DS1-N	1,4 $\pm$ 0,1 a	1,1 $\pm$ 0,1 a	0,8 $\pm$ 0,1 a
S-I		1,4 $\pm$ 0,1 b	1,5 $\pm$ 0,2 b
DS1-I		0,9 $\pm$ 0,2 a	1,2 $\pm$ 0,1 a
Concentración de clorofila total (a + b) ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$ )			
S-N	6,5 $\pm$ 0,2 b	5,4 $\pm$ 0,2 b	4,7 $\pm$ 0,3 b
DS1-N	3,8 $\pm$ 0,3 a	2,9 $\pm$ 0,4 a	1,7 $\pm$ 0,3 a
S-I		5,0 $\pm$ 0,2 b	4,8 $\pm$ 0,4 b
DS1-I		2,3 $\pm$ 0,7 a	2,6 $\pm$ 0,3 a

Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes para cada columna y parámetro indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

A lo largo de almacenaje refrigerado se puede observar una disminución del contenido de clorofila total en la epidermis de los frutos independientemente del tratamiento considerado. A los 90 y 180 días los resultados no mostraron diferencias en el contenido de clorofila a, b y total entre los tejidos de los frutos que tenían etileno inhibido y los tejidos de los frutos sin tratar.

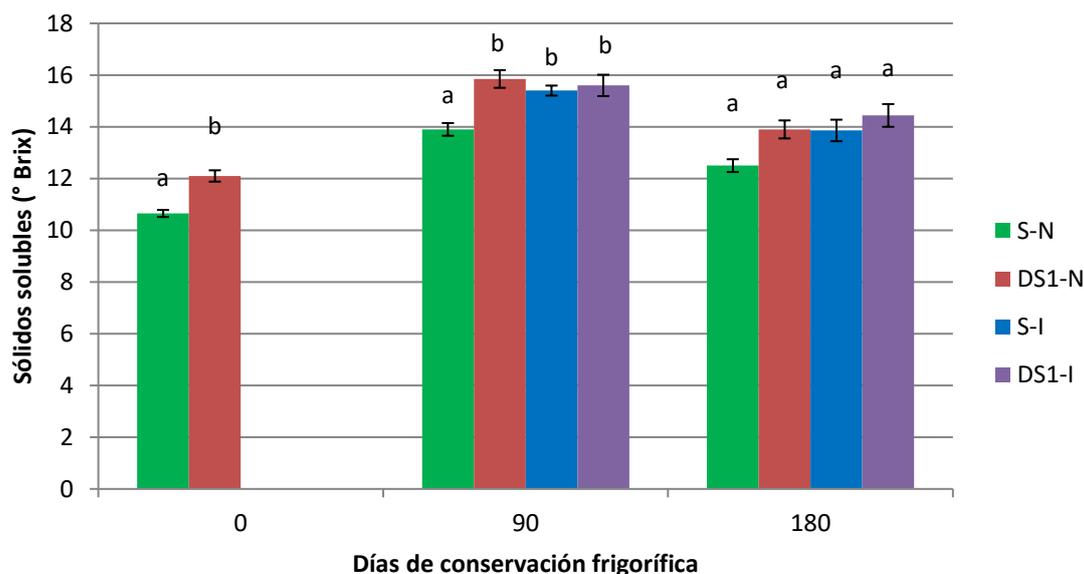
Los frutos con daño de sol presentaron una mayor firmeza ( $20,3 \text{ lb.pulg}^{-2}$ ) estadísticamente significativa respecto a los frutos sanos ( $17,3 \text{ lb.pulg}^{-2}$ ) al momento de cosecha (Figura 15). En las evaluaciones a los 90 y 180 días de conservación refrigerada los frutos DS-N y DS-I mostraron mayores valores de firmeza en relación a S-N y S-I, respectivamente en forma independiente del tratamiento de inhibición de etileno realizado. Asimismo, los frutos tratados con 1-MCP tuvieron mayor firmeza de pulpa que los no tratados en ambos períodos evaluados.



**Figura 15.** Firmeza de pulpa a 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño de sol leve con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño de sol con etileno inhibido (DS1-I). Letras minúsculas diferentes dentro de cada período evaluado indican diferencias estadísticamente significativas en la condición de fruto, letras mayúsculas dentro de cada período evaluado indican diferencias entre frutos con y sin inhibición del etileno. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

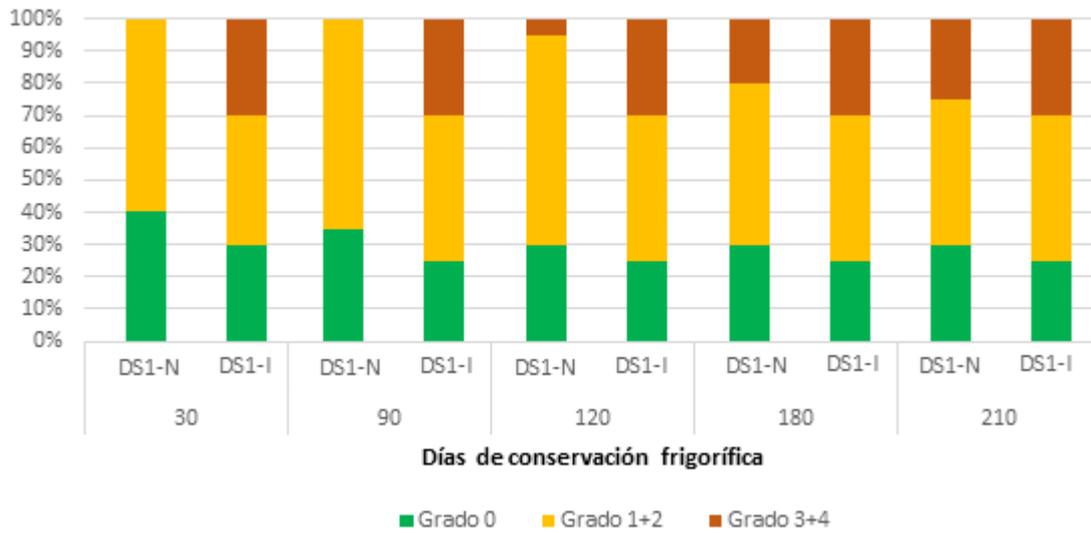
En la Figura 16 se indica la evolución del contenido de sólidos solubles desde la cosecha hasta 180 días de almacenaje en cámara frigorífica. Se observa en general un

incremento de sólidos solubles a los 90 días para luego disminuir a los 180 días. Al día 0 los frutos DS presentaron un 13,6% más de sólidos solubles respecto a los frutos S. A los 90 días de conservación los frutos S-N presentó el valor más bajo (13,9 °Brix) respecto a que los tejidos de los frutos DS-N, S-I y DS-I (15,6 °Brix). A los 180 días de almacenaje no se encontraron deferencias en este parámetro entre ninguno de los tratamientos.



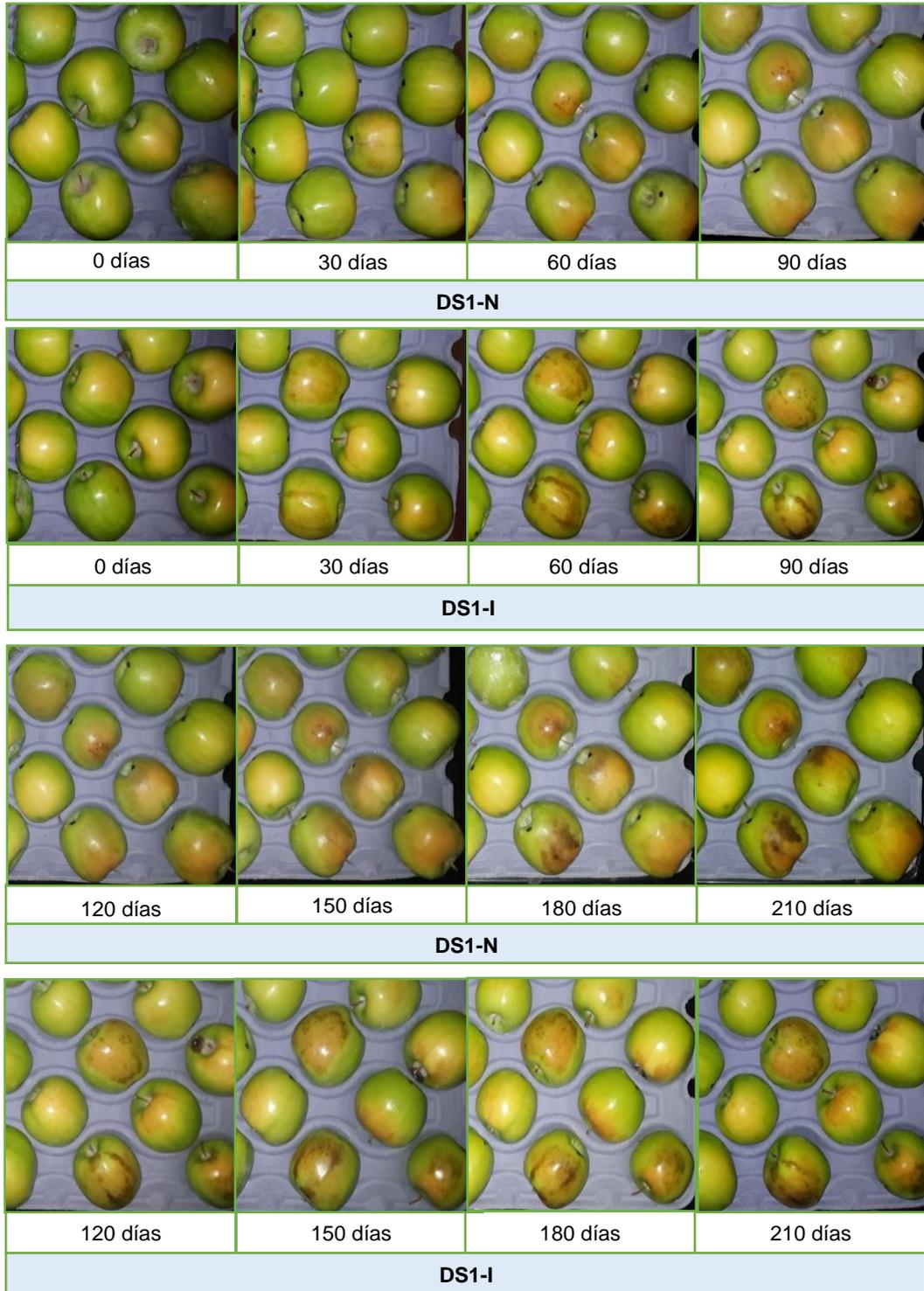
**Figura 16.** Concentración de sólidos solubles a 0, 90 y 180 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en frutos sanos con etileno normal (S-N), frutos con daño de sol leve con etileno normal (DS1-N), frutos sanos con etileno inhibido (S-I) y frutos con daño de sol con etileno inhibido (DS1-I). Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada período evaluado. Test de Tukey.  $P < 0,05$ .

A partir de 30 días de conservación los sectores con síntomas de daño de sol comenzaron a evolucionar hacia escaldado de sol (Figura 17 y Foto 5). El sector afectado se caracterizó principalmente por un oscurecimiento irregular del sector con daño por sol leve en la fruta. En DS1-I se observó un 30% de frutos con niveles escaldado de sol de mayor intensidad (grado 3+4) a partir de los 30 días de conservación frigorífica, mientras que en DS1-N se detectó un 5% recién a partir de los 120 días. Este porcentaje de frutos con grado 3+4 se fue incrementando llegando a valores cercanos al 30% en DS1-N a los 210 días de conservación.



**Figura 17.** Porcentaje de frutos con escaldado de sol a lo largo de 210 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en, frutos con daño de sol leve con etileno normal (DS1-N) y frutos con daño de sol leve con etileno inhibido (DS1-I). Grado 0: sin desarrollo de escaldado de sol; Grado 1+2: niveles leves y moderados de escaldado de sol; Grado 3+4: niveles graves y muy grave de escaldado de sol.

**Foto 5:** Evolución del escaldado de sol a lo largo de 210 días de conservación frigorífica ( $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; HR 95%) en, frutos con daño de sol leve con etileno normal (DS1-N) y frutos con daño de sol leve con etileno inhibido (DS1-I)



---

## 7 DISCUSIÓN

### 7.1 Evolución del etileno en frutos de manzana con síntomas de estrés por alta radiación solar y tratados con 1-MCP durante la conservación refrigerada

Las manzanas son clasificadas como frutos climatéricos ya que incrementan durante su madurez rápidamente la producción de etileno y la respiración. Durante el proceso de maduración se producen cambios físicos, metabólicos y bioquímicos iniciados y/o coordinados por el etileno. Las diferentes etapas durante este proceso pueden ser caracterizadas a través de la producción de etileno o de CO<sub>2</sub>. Se considera a los frutos de manzana fisiológicamente en la etapa pre-climatérica cuando presentan baja concentración de ACC y actividad de ACC sintasa, y baja producción de etileno (Dixon y Hewett, 2000).

En el presente estudio la producción de etileno en frutos sanos de manzana en el momento de cosecha no fue detectable (Figura 8). Esto indica que la recolección de los frutos para su conservación refrigerada se realizó previamente a su maduración, etapa pre-climatérica. En los frutos con síntoma de daño de sol tampoco fue detectada la producción de etileno. Torres et al. (2017) en manzana Granny Smith, también detectaron niveles significativamente superiores de etileno en frutos con daño de sol moderado durante todo el desarrollo y crecimiento de los frutos a campo y al momento de cosecha. Posiblemente la mayor intensidad de daño evaluado en su investigación explica la diferencia con nuestros resultados, en el cual el nivel de daño de sol estudiado fue leve.

Luego de 90 y 180 días de almacenaje refrigerado y a 24 h de salida de cámara, los frutos que no recibieron aplicación de 1-MCP presentaron mayor producción de etileno respecto a los no tratados (Figuras 9 y 10). Las moléculas de 1-MCP ocupan los receptores del etileno lo cual permite frenar el proceso autocatalítico de esta fitohormona (Calvo, 2001). Esta acción se encuentra ampliamente demostrada en la bibliografía (Blankenship y Dole, 2003).

La acción inhibitoria del 1-MCP sobre la producción de etileno se manifestó tanto en frutos con daño por sol leve, como en frutos sanos en forma inmediata a la salida de cámara frigorífica y en ambos periodos evaluados. Esto indica que el efecto estresante de la radiación solar y la presencia de la sintomatología de daño de sol no inhiben la acción del 1-MCP sobre estos frutos.

---

Luego de cada periodo de conservación se construyó una curva de evolución de la producción de etileno cuando los frutos fueron colocados durante 23 días a temperatura ambiente (20° C) para cada uno de los tratamientos evaluados. Los resultados obtenidos muestran el comportamiento climatérico de las manzanas Granny Smith, ya que se observa un incremento de etileno durante el proceso de maduración. Para el análisis de estas curvas se consideran dos variables: el número de días transcurridos hasta alcanzar la máxima producción de etileno y el valor de la máxima producción de etileno (Calvo et al., 2008).

En la evaluación realizada a 90 días de conservación, los frutos sin tratamiento con 1-MCP presentaron un incremento de la producción de etileno a los 5 días y valores cercanos a lo registrado en investigaciones previas en diversos cultivares de manzana (Lelievre et al., 1995; Calvo et al., 2008). Este comportamiento expresa la evolución normal de la producción de etileno durante el proceso de maduración de los frutos de manzana.

Con respecto al tipo de fruto estudiado, no se observaron diferencias significativas en la producción de etileno entre los frutos con daño leve por sol y los sanos. No obstante, analizando frutos con mayor nivel de daño por sol que los utilizados en nuestro estudio, Torres et al. 2017 determinaron mayor producción de etileno. Esto indica que el nivel de daño de sol estudiado no produjo modificaciones en el metabolismo y la dinámica de producción de etileno en el fruto durante la poscosecha. Existe escasa información sobre el comportamiento del etileno durante la exposición a temperatura ambiente en frutos de manzana que presentan daño de sol luego de haber permanecido en conservación refrigerada.

Los frutos tratados con 1-MCP y conservados durante 90 días presentaron valores muy bajos de producción de etileno durante los 23 días a temperatura ambiente respecto a aquellos sin tratar. Estos resultados confirman la eficaz inhibición del proceso autocatalítico del etileno en frutos de manzana (Calvo, 2001). Entre los días 5-7 se observó una menor producción de etileno en los frutos sin 1-MCP y con daño de sol, aunque en la mayoría de las evaluaciones no se percibieron diferencias entre ambos niveles de daño de sol estudiado. La acción del 1-MCP en la inhibición del etileno en frutos con síntomas de estrés por alta radiación solar se mantiene a lo largo de 23 días a 20°C luego de 90 días de conservación refrigerada.

A los 180 días de conservación y 23 días a temperatura ambiente los frutos tratados con 1-MCP mostraron una menor producción de etileno respecto a los no tratados,

---

independientemente del tipo de tejido considerado. Sin embargo, en esta evaluación y, a diferencia de los resultados obtenidos a los 90 días, en los frutos sanos con 1-MCP se detectó un incremento en la producción de etileno entre los 15 y 23 días a temperatura ambiente. Este aumento de producción de etileno presentó un retraso respecto al pico observado en los frutos sin inhibición de etileno. Asimismo, en los frutos con daño de sol y 1-MCP se produjo un retraso de 10 días en el incremento en la producción de etileno respecto a aquellos sanos con 1-MCP.

A partir de diversos trabajos se ha asumido que, ya que el 1-MCP se une en forma permanente a los receptores de etileno presentes en el momento del tratamiento, el retorno de la sensibilidad al etileno y su respuesta autocatalítica es debido a la aparición de nuevos sitios receptores. Al igual que en el presente estudio, se ha registrado previamente una demora en la producción de etileno en damascos, ciruelas y manzanas. En frutos de palta tratados con 1-MCP se ha registrado una demora en el pico de producción de etileno de 6 días y una reducción de su magnitud del 50% (Blankenship y Dole, 2003)

Los resultados obtenidos confirman que la inhibición del etileno es efectiva en frutos desarrollados bajo estrés por elevada radiación solar tanto al momento de cosecha como durante la poscosecha en frío.

---

## **7.2 Efecto de la inhibición del etileno sobre el sistema antioxidante en frutos de manzana con síntomas de estrés por alta radiación solar durante la poscosecha**

La fluorescencia de clorofila es una herramienta que se usa ampliamente para examinar el rendimiento fotosintético en plantas. Permite estimar la actividad del PS II, el cual sufre modificaciones bajo condiciones de estrés abiótico (Guidi y Degl'Innocenti, 2011). En el presente estudio y al momento de cosecha, el parámetro fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) fue similar en tejidos sanos y asoleados (Figura 13). Investigaciones previas proponen que los frutos expuestos a un estrés solar durante un periodo de tiempo largo (días o semanas), pueden aclimatarse al exceso de luz solar gracias a una adaptación fotosintética. Diversos mecanismos como las proteínas de choque térmico, el ciclo de las xantofilas y el ciclo del ascorbato-glutati6n pueden minimizar el da1o fotooxidativo en los tejidos vegetales a trav6s de la disipaci6n del exceso de energa que puede da1ar a los fotosistemas (Cheng y Ma, 2004). Posiblemente en la piel de los frutos con da1o de sol leve estudiados en el presente trabajo, se hayan activado mecanismos de defensa y aclimataci6n a las condiciones de exceso de radiaci6n solar y temperatura, los cuales permitieron recuperar la actividad del PS II

Por otra parte, a lo largo del almacenaje se observ6 una leve reducci6n de los valores de Fv/Fm tanto en frutos control como en aquellos con 1-MCP. Esta disminuci6n de la eficiencia cu6ntica durante el almacenaje indica que la funcionalidad de los cloroplastos no es protegida por el tratamiento con 1-MCP, sugiriendo entonces que el etileno tiene un rol secundario en la p6rdida de actividad de los cloroplastos durante la conservaci6n (Jayanty et al., 2004).

Asimismo, a los 90 y 180 d6as de almacenaje en fr6o, no se registraron diferencias en la fluorescencia de clorofila entre los frutos sanos sin 1-MCP y los frutos sanos o con da1o de sol con 1-MCP. Mir et al., (2001) en estudios con manzana Red Delicious no encontraron que la fluorescencia de clorofila fuera marcadamente afectada por aplicaciones de 1-MCP. A una temperatura de conservaci6n de 0°C no se observaron diferencias significativas de Fv/Fm en los frutos con 1-MCP en relaci6n a los frutos control.

La fluorescencia de la clorofila ha sido reportada como un indicador de diversas condiciones de estr6s entre ellas el fr6o durante la poscosecha en diversas especies incluida los frutos de manzano (Forney et al., 2000). A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se observa que los frutos con da1o de sol y sin 1-MCP redujeron

---

significativamente su eficiencia cuántica durante el almacenaje, mientras que la inhibición del etileno provocó que los tejidos asoleados se comporten de manera similar a los tejidos sanos. Es posible que el estrés por alta radiación en conjunto con las condiciones de conservación refrigerada provoque una disminución del parámetro Fv/Fm la cual podría ser atenuada a través de la aplicación de 1-MCP. Song et al., (1997) ha reportado una alta correlación entre el avance de la madurez en los frutos y la disminución en el parámetro Fv/Fm, lo cual sugiere una relación entre la fluorescencia de la clorofila y el proceso de senescencia en los frutos. Por lo tanto, el mantenimiento de valores de Fv/Fm en frutos con daño de sol y con 1-MCP, estaría relacionado con el retraso en el proceso de senescencia provocado por la inhibición del etileno.

El sistema de defensa antioxidante no enzimático incluye al ascorbato y al glutatión, los tocoferoles, los carotenoides y los compuestos fenólicos (Mittler, 2004). La actividad antioxidante de los compuestos no enzimáticos puede ser expresada en términos de la habilidad de secuestrar radicales libres a través de una reacción con un radical como es el DPPH (Rufino et al., 2011). En el presente estudio la actividad antioxidante a través de la técnica de DPPH presentó al día 0 un incremento significativo en los tejidos de los frutos expuestos al sol (Figura 14). Estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas en Chile sobre manzanas Granny Smith, Braeburn y Fuji donde determinaron un aumento en los niveles de antioxidantes-DPPH en los frutos con daño por sol leve (Yuri et al., 2010; Yuri et al., 2014).

La mayor capacidad antioxidante en los tejidos con daño de sol respecto a tejido sano detectada en el día 0 se mantuvo durante todo el período de conservación y se observó un incremento de este parámetro en todos los tratamientos luego de 180 días de almacenaje. Hoang et al., (2011) observaron incrementos del 40% de la actividad antioxidante en la piel de manzana durante el almacenaje refrigerado. Por el contrario, otros estudios indican que la capacidad antioxidante puede disminuir durante la conservación refrigerada (Vilaplana et al., 2006; Chaparzadeh y Yavari, 2013).

Al analizar el efecto del 1-MCP sobre la capacidad antioxidante de los frutos, se observa que los frutos con inhibidos de la acción del etileno presentaron mayor capacidad antioxidante respecto a frutos sanos, solamente a los 90 días. Luego a los 180 días no se observaron diferencias en el porcentaje de inhibición de DPPH. En concordancia con estos resultados, estudios previos realizados por Vilaplana et al. (2006) no encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante de manzana tratadas con 1-MCP respecto a frutos sin tratar luego de 100 días de conservación en frío. Diversas investigaciones demuestran que el efecto de 1-MCP en la capacidad antioxidante de las

---

manzanas durante el almacenamiento es inconsistente, debido posiblemente a características propias de los cultivares utilizados, las condiciones durante el almacenamiento y los métodos de análisis empleados (Hoang et al., 2011).

La neutralización efectiva de las ROS requiere de la acción de diversas enzimas antioxidantes concomitantemente con antioxidantes no enzimáticos (Vilaplana et al., 2006). Nuestros resultados mostraron que, de manera conjunta con el incremento del sistema antioxidante no enzimático a cosecha en los frutos con daño por sol leve, se produjo un aumento del sistema antioxidante enzimático a través de una mayor actividad de las enzimas SOD y APX. Estas enzimas están relacionadas con el ciclo de glutatión-ascorbato y se vinculan al incremento de metabolitos que contribuyen a la capacidad antioxidante en los tejidos con leve daño de sol (Merzlyak et al., 2002; Wünsche et al., 2004; Quintanar Escorza, 2009).

Durante la conservación refrigerada los tejidos con daño de sol leve presentaron una mayor actividad de SOD respecto a los frutos sanos independientemente de si estaban tratados con 1-MCP (Tabla 3). En estudios previos realizados en manzana Golden Smoothie con 1-MCP no se registraron diferencias en la actividad de SOD entre frutos tratados y control, a excepción de las primeras semanas donde la actividad de esta enzima fue ligeramente superior en los frutos con 1-MCP (Vilaplana et al., 2006). Shaham et al. (2003) analizando manzanas Granny Smith con y sin 1-MCP tampoco observaron diferencias significativas en la actividad de SOD.

En nuestro trabajo a los 90 y 180 días de conservación en frío, la actividad de APX no presentó diferencias significativas respecto al tratamiento con 1-MCP (Tabla 4) al igual que lo detectado por Lee et al. (2012) en manzanas Empire. Sin embargo, algunas investigaciones observaron que la actividad de APX disminuía en frutos tratados con 1-MCP con respecto al control (Shaham et al., 2003).

Tampoco se encontraron diferencias durante la conservación en la actividad de APX respecto a los niveles de daño de sol considerado. Esto podría indicar que esta enzima no participaría activamente durante el almacenaje en frutos cuando son sometidos a las condiciones estresantes por bajas temperaturas durante su conservación frigorífica.

Los resultados obtenidos indicaron una influencia significativa del daño de sol en la respuesta del sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático durante la conservación refrigerada. Por otra parte, la inhibición del etileno en los tejidos con

---

síntomas por elevada radiación solar, no produjo modificaciones en la respuesta de los componentes del sistema antioxidante abarcados en este estudio.

El incremento de la defensa antioxidante no enzimático y enzimático al momento de cosecha no fue capaz de disminuir la peroxidación de lípidos de membrana en los tejidos con daño de sol (Figura 11). El exceso de temperatura y radiación UV-B genera el daño por sol en frutos debido al estrés oxidativo causado por la producción de ROS (Chen et al., 2008). Estos resultados concuerdan con evaluaciones realizadas en manzana Gala por Chen et al. (2008), quienes encontraron un incremento de la peroxidación lipídica en el sector del fruto con daño por sol. Según los autores, el hecho de que la piel con daño por sol presente mayor peroxidación lipídica indica que el sistema antioxidante fue incapaz de hacer frente al proceso fotooxidativo producido por la elevada temperatura junto a la elevada radiación solar.

Durante la conservación refrigerada, la peroxidación de lípidos fue afectada de manera diferencial según el tratamiento considerado. A pesar de que al día 0 los tejidos con daño de sol presentaban mayor peroxidación lipídica, a los 90 días de almacenaje se observó un incremento de MDA en los tejidos sanos respecto a los tejidos con daño de sol independientemente del tratamiento con 1-MCP. En investigaciones previas se ha registrado un incremento de la peroxidación de lípidos en tejido sano, respecto al tejido con daño de sol (Vita et al., 2016). Shewfelt y del Rosario (2000), sugieren que la inducción de antioxidantes y de sistemas de defensa o reparación en respuesta a una condición de estrés inicial, pueden limitar la peroxidación de lípidos cuando son sometidos a una condición de estrés posterior. Esto posiblemente ocurra en tejidos con síntomas de estrés por elevada radiación solar cuando son expuestos a una condición de estrés posterior por almacenamiento a bajas temperaturas.

A los 180 días de conservación refrigerada se observó una mayor peroxidación de lípidos en los tejidos sanos, pero simultáneamente se registró un incremento significativo en los frutos con inhibición de etileno. Lee et al. (2012) indicaron una mayor acumulación de MDA en tejidos de manzana Empire tratada con 1-MCP durante la conservación a 0,5°C. Contrariamente, en manzanas Golden Smoothie los niveles de MDA no fueron afectados por los tratamientos con 1-MCP durante los primeros 15 días almacenamiento, pero luego y a largo de la conservación posterior fue menor en estos frutos respecto a los frutos control (Vilaplana et al., 2006).

El nivel de daño de sol estudiado no mostró a cosecha una mayor pérdida de electrolitos en los frutos con daño de sol, debido posiblemente al nivel de daño de sol leve utilizado

---

en este trabajo (Figura 12). Según Schrader et al. (2001) el incremento de la pérdida de electrolitos se produce en forma significativa en la piel de frutos de manzanas que presentan daños por excesiva radiación solar del tipo necrótico. Durante la conservación refrigerada, en los frutos con síntomas de estrés por elevada radiación solar se observó un incremento de la concentración de electrolitos en el exterior de los tejidos independientemente de la inhibición del etileno en dichos tejidos. Según Marangoni et al. (1996) las membranas celulares son sensibles a la refrigeración. En esas condiciones se producen alteraciones en las propiedades biofísicas relacionadas con su composición que pueden alterar la funcionalidad. Los cambios en la estructura y composición de la membrana se consideran los eventos primarios de lesiones por enfriamiento y conducen a una pérdida de control de la permeabilidad y disfunción metabólica.

Durante los meses de almacenamiento a baja temperatura los frutos de manzana son sensibles a diversos desórdenes fisiológicos asociados a estrés oxidativo (Du y Bramlage, 1995). Uno de ellos es el escaldado superficial el cual está correlacionado con la acumulación de ROS (Pesis et al., 2012) y de compuestos volátiles como el sesquiterpeno acíclico  $\alpha$ -farneseno (3,7,11-trimetil,1,3,6,10-dodecatetraeno) (AF) y los trienos conjugados (TC) que son producto de la oxidación de los AF (Lurie y Watkins, 2012). La concentración de TC en la piel son la causa de la aparición del escaldado superficial en la superficie de frutos de manzana (Ahn et al., 2007). Según Pesis et al. (2012) la variedad Granny Smith presenta alta susceptibilidad a esta fisiopatía de poscosecha.

En el presente ensayo, los valores de AF y TC detectados a cosecha y durante la conservación refrigerada (Tabla 5) coinciden con lo reportado previamente (Watkins et al., 1995). Asimismo, se produjo un incremento significativo de la concentración de AF durante la conservación refrigerada en los frutos sin inhibición de etileno, tanto sanos como aquellos con daño de sol. Según Whitaker (2007) los AF comienzan a acumularse rápidamente con el avance de la madurez y en especial al inicio del almacenamiento en frío, y generalmente alcanzan un máximo a las 8-12 semanas de conservación para luego decaer. La disminución de los AF durante el almacenamiento prolongado en frío se debe a una menor actividad de la alfa-farneseno sintasa (AFS), enzima clave en su biosíntesis, así como a una mayor oxidación a TC (Rupasinghe et al., 2000).

El estrés por elevada radiación solar no modificó la concentración de AF en los tejidos a los 90 y 180 días de conservación en frío. Esto coincide con lo detectado por Rodikov (2008), el cual indica que la acumulación de este compuesto en los frutos es

---

independiente de las condiciones de estrés por elevada radiación solar a las que son sometidos durante su desarrollo a campo.

La aplicación de 1-MCP limitó la acumulación de AF durante la conservación de frutos sanos y con daño de sol. Estudios de correlación han demostrado una estrecha relación entre la producción de AF y de etileno (Tsantili et al., 2007), ya que esta hormona regula la expresión de la AFS (Busatto et al., 2014). Varias investigaciones han indicado que inhibidores del etileno pueden desempeñar un papel significativo en la disminución de la acumulación de AF en manzanas Granny Smith (Ekinci et al., 2016). Nuestras investigaciones coinciden y reafirman estos resultados en Granny Smith, indicando que el 1-MCP es efectivo en la inhibición del etileno y de sus metabolitos asociados como los AF, tanto en frutos sanos como en frutos con síntomas de daño de sol.

Con respecto a los TC, los frutos sanos sin inhibición de etileno presentaron un incremento significativo en su contenido durante la conservación. La oxidación de los AF a TC en este tejido son la causa del incremento de este compuesto en la piel de frutos sanos (Rupasinghe et al., 2000).

El tejido con daño de sol sin inhibición de etileno presentó una menor concentración de TC respecto a los frutos sanos. Según Rodikov (2008) los tejidos de manzana expuestos a la radiación solar presentan contenidos similares de AF que los no expuestos, pero menor concentración de TC debido posiblemente a que algunas sustancias inhiben la oxidación de los AF. Wünsche et al. (2004) y Merzlyak et al. (2002), indican que el fruto es capaz de activar mecanismos de defensa antioxidante en respuesta al daño por sol. Asimismo, Contreras et al. (2008) determinaron en manzanas Granny Smith que la concentración de AF y TC fue significativamente más baja en el sector con golpe de sol que en el sector sano, lo que demostraría la capacidad de los tejidos afectados por daño por sol de reducir la presencia de compuestos considerados iniciadores de la fisiopatía oxidativa escaldado superficial en manzanas.

En el presente estudio la inhibición de etileno limitó la concentración de TC, tanto en frutos sanos como aquellos con daño de sol, limitó. Sabban-Amin et al. (2011) encontraron que frutos tratados con 1-MCP reducen su producción de AF y sus compuestos de oxidación como son los TC. Además, la inhibición del etileno, produce una disminución de a ROS que también son producto de la oxidación de AF.

Estos resultados indican que producción de TC en frutos de manzana Granny Smith con daño de sol se encuentra limitada debido a los diferentes compuestos antioxidantes que se forman en la piel de los frutos como respuesta a la elevada radiación solar, mientras

---

que en frutos tratados con 1-MCP, la inhibición del etileno condiciona la concentración de AF, sustrato indispensable para la producción de TC.

---

### **7.3 Efecto de la inhibición del etileno en la calidad de frutos de manzana sanos y con daño de sol durante la poscosecha**

La calidad fisicoquímica de los frutos es el resultado de su desarrollo fisiológico y se caracteriza con una combinación de índices como el color de la piel, la firmeza y el contenido de azúcares, entre otras. La calidad está influenciada por la ubicación de los frutos en el árbol y las condiciones ambientales como la luz y la temperatura. El nivel de exposición a la radiación solar a la que estuvieron sometidos los frutos durante su desarrollo, y la severidad del daño por sol que presentan, afectan su calidad a cosecha durante la etapa de maduración (Woolf y Ferguson, 2000; Schrader et al., 2009a).

En el presente estudio, la concentración de clorofila a, b y total fue significativamente menor en la piel de los frutos con daño de sol leve respecto a los sanos tanto al momento de cosecha, como luego de 90 y 180 días de conservación frigorífica (Tabla 6).

Según Racskó (2010) la radiación solar excesiva provoca una degradación de la clorofila junto con el aumento de otros pigmentos implicados activamente en los mecanismos fotoprotectores de la fruta. Los sectores del fruto con síntomas de daño por sol poseen un color amarillo intenso que se asocia con la transformación de los pigmentos de los cloroplastos en el área afectada (Solovchenko et al., 2006). La situación de estrés provocaría una disminución de la clorofila, probablemente debido a la fotoinhibición (Wünsche et al., 2004; Merzlyak et al., 2002). Hernández et al. (2014), encontraron que manzanas Granny Smith con daño de sol desde leve a severo presentaron menor contenido de clorofila a y b en el momento de cosecha, lo que demuestra que ambos pigmentos se degradan bajo condiciones fotooxidativas a campo. Similares variaciones en los pigmentos de frutos asoleados han sido también reportados por Torres et al. (2006), Chen et al. (2008) y Tartachnyk et al. (2012).

Durante la conservación refrigerada se produjo una disminución en el contenido de clorofila de los frutos de todos los tratamientos. La inhibición del etileno no modificó el contenido de clorofila ni su degradación durante la poscosecha. Sin embargo, otras investigaciones indican que la aplicación de 1-MCP retrasa la degradación de clorofila y otros tipos de cambios en el color en un amplio rango de especies (Blankenship y Dole, 2003).

En el presente estudio se observó una mayor firmeza de pulpa estadísticamente significativa en los frutos con síntomas de estrés por elevada radiación solar respecto a los sanos (Figura 15). Estos resultados concuerdan con estudios previos en manzana

---

Fuji, Granny Smith, Gala, Jonagold y Golden Delicious, en donde el sector expuesto a radiación solar excesiva y con síntomas de daño, presentó valores de firmeza más altos respecto al sector sano del fruto (Schrader et al., 2009b; Tartachnyk et al., 2012). Woolf y Ferguson (2000) indican que este incremento puede deberse a una diferente composición de la pared celular y al engrosamiento de la misma o a la variación en el número de células. La mayor firmeza presentada por el tejido asoleado también podría deberse a la pérdida de agua que se produce en este sector según lo indicado por Racskó et al. (2005). Existe además evidencia de que la luz solar y la temperatura causan cambios en las propiedades de la cutícula cerosa, lo que podría inducir a una mayor permeabilidad del agua en los sectores expuestos de los frutos (Woolf y Ferguson, 2000).

La firmeza de pulpa es un importante indicador de la calidad de frutos de manzano durante la poscosecha. Los frutos más firmes se consideran de mejor calidad (Johnston et al., 2001). Su evolución durante la conservación está afectada por la exposición de los frutos a excesiva radiación solar y temperatura a campo (Woolf y Ferguson, 2000; Rudell et al., 2008).

Nuestros resultados indicaron un descenso de la firmeza durante el periodo de almacenaje en los frutos sin inhibición de etileno. La evolución de la firmeza observada coincide con lo descrito por Johnston et al. (2001) para frutos de manzana.

La pérdida de firmeza se produjo tanto en frutos sanos como con daño de sol, lo que muestra que este descenso no estaría relacionado con el nivel de daño de sol estudiado. Por lo tanto, el valor de firmeza inicial en cada tejido condicionaría los valores de firmeza alcanzados al final del periodo de almacenaje. En coincidencia con lo presentado por Schrader et al. (2009b), en el presente estudio el mayor valor de firmeza inicial en los frutos asoleados se mantuvo durante todo el tiempo de almacenaje.

La inhibición del etileno atenuó la pérdida de firmeza tanto en frutos sanos como en los que presentaban síntomas de elevada radiación solar. Estos resultados coinciden con investigaciones previas en diversos cultivares de manzana en los cuales se observó un mantenimiento de la firmeza de pulpa durante la conservación en frío en frutos tratados con 1-MCP (Blankenship y Dole, 2003). La pérdida de firmeza en los frutos implica la modificación fisiológica de los polisacáridos que constituyen la pared celular. La poligalacturonasa, en conjunto con otras enzimas, está implicada en el desmontaje de la pared celular a través de su acción sobre las pectinas las cuales son un componente principal de la pared celular primaria. El etileno regula la acumulación, traducción y

---

actividad enzimática del ARNm de la poligalacturonasa. Por lo tanto, la inhibición de la acción del etileno en los frutos provocó el mantenimiento de la firmeza en los frutos con 1-MCP a través del control de las enzimas que actúan sobre la desintegración de la pared celular (Costa et al., 2010).

Al igual que lo reportado por Racskó et al. (2005) y Schrader et al. (2009b), el contenido de sólidos solubles a cosecha en este estudio fue significativamente mayor en los frutos con daño de sol respecto a los sanos (Figura 16). Según Torres et al. (2013) la acumulación de carbohidratos en los tejidos expuestos a la radiación solar podría ser consecuencia de un menor metabolismo de estas moléculas debido a la condición de estrés ambiental. El sorbitol también puede desempeñar un papel como antioxidante (Smirnoff y Cumbes, 1989) lo cual les permite a los frutos hacer frente al estrés ambiental y oxidativo causado por alta temperatura y radiación (Torres et al., 2013). Al igual que con la firmeza, la deshidratación del sector con daño de sol por el aumento de permeabilidad de la capa cerosa, también podría contribuir a la mayor concentración de sólidos solubles.

Schrader et al. (2009b) determinaron que el mayor contenido de sólidos solubles en frutos con daño de sol se mantenía desde cosecha hasta los 6 meses de almacenaje. En concordancia con estos resultados, en el presente trabajo se observó un mayor contenido de sólidos solubles en los frutos asoleados a lo largo de los 180 de conservación. Estos resultados sugieren que la evolución del contenido de sólidos solubles está influenciada especialmente por el nivel de daño por sol y el contenido inicial y que las condiciones de conservación afectan de forma similar a ambos tipos de frutos.

A los 90 días de conservación frigorífica se produjo un incremento en la concentración de sólidos solubles en todos los tratamientos y luego un descenso hacia los 180 días. Este aumento durante el almacenaje fue observado previamente (Erturk et al., 2002; Fellman et al., 2003) y se corresponde con la disminución del contenido de almidón debido a su despolimerización (Vilaplana et al., 2006). El descenso observado en etapas más tardías implica que algunos azúcares fueron usados para la respiración o en otros procesos catalíticos (Ergun et al., 2012).

La inhibición del etileno provocó que los frutos sanos presentaran un comportamiento similar a los frutos asoleados en relación a la concentración de sólidos solubles, manteniéndose niveles superiores respecto a los frutos sanos sin 1-MCP. Calvo (2005) ha reportado que en manzanas, la acción del 1-MCP mantiene los componentes críticos

---

del sabor, el contenido de sólidos solubles y la acidez titulable. Es posible que la disminución del proceso respiratorio debido a la inhibición del etileno en los frutos sanos, mantenga los niveles de sólidos solubles en valores similares a los alcanzados por los frutos con síntomas de elevada radiación solar.

El desarrollo de escaldado por sol observado en los frutos con síntoma de daño de sol y el incremento en la intensidad del mismo durante la conservación (Figura 17 y Foto 5) coinciden con reportes previos en el mismo cultivar (Contreras et al., 2008; Hernández et al., 2014). En coincidencia con otras investigaciones (Contreras et al., 2008; Vita et al., 2016) la escaldadura de sol durante el almacenamiento se observó exclusivamente en el área de los frutos que presentaba daño de sol a cosecha.

Aunque existe relativamente escasa información sobre el origen del oscurecimiento de la piel que se visualiza en el escaldado de sol, algunas investigaciones indican que la oxidación de fenoles, en especial glicósidos de quercetina, podrían ser el origen de esta fisiopatía (Hernández et al. 2014). Posiblemente el aumento de la peroxidación de lípidos observada durante la conservación, se relacione con la oxidación de fenoles.

Los frutos con daño de sol e inhibición del etileno presentaron una aparición más temprana y de mayor intensidad de la fisiopatía escaldado de sol durante la conservación refrigerada. Estas observaciones sugieren que la inhibición del etileno podría acelerar e intensificar el escaldado de sol. Aunque Contreras et al. (2008) no detectaron diferencias en el escaldado de sol entre los tratamientos con 1-MCP y los testigos, Calvo y Candan (2011) indican que los frutos con daño de sol tratados con 1-MCP serían más propensos a desarrollar escaldadura de sol después del almacenamiento.

El efecto de 1-MCP en diversas fisiopatías es inconsistente en sus resultados y depende del cultivar de manzana considerado. En algunos casos y variedades el tratamiento con 1-MCP disminuyó la incidencia de algunos desórdenes; por ejemplo el escaldado superficial y el decaimiento por senescencia. En otros casos, se observó un aumento de la incidencia o severidad del decaimiento interno (Blankenship y Dole, 2003) o el incremento del desarrollo de algunas lesiones superficiales como es el caso del daño por CO<sub>2</sub> (Beaudry y Watkins, 2003). Según Ku et al. (1999) el 1-MCP puede inhibir respuestas metabólicas relacionadas a mecanismos de defensa natural de los frutos, haciéndolos más susceptibles a algunas fisiopatías.

---

## 8 CONCLUSIONES

- La acción inhibitoria del 1-MCP sobre la producción de etileno se manifestó tanto en frutos sanos como con daño por sol leve al momento de cosecha y durante la poscosecha en frío. A nivel agronómico, el tratamiento con 1-MCP de frutos que presenten daño por sol sería un método viable como estrategia de conservación a corto plazo.
- La respuesta antioxidante de los frutos fue condicionada por el nivel del estrés por alta radiación solar durante su desarrollo y no fue modificada por la inhibición del etileno durante su conservación a corto plazo. No obstante, para plazos mayores a 90 días, la acción del 1-MCP incrementa procesos oxidativos, que podrían relacionarse con mayor escaldado de sol.
- La producción de metabolitos oxidantes como los trienos conjugados fue limitada al mismo nivel tanto por la inhibición del etileno como por la inducción de antioxidantes generados por las condiciones de estrés por alta radiación solar.
- El 1-MCP fue efectivo en el mantenimiento de la calidad durante la conservación tanto en frutos sanos como en frutos con síntomas de estrés por alta radiación solar. No obstante, los frutos con daño de sol e inhibición del etileno presentaron una aparición más temprana y de mayor intensidad de la fisiopatía escaldado de sol durante la conservación refrigerada.

En función a los resultados y conclusiones arribadas en la presente tesis, se rechaza la hipótesis formulada. La inhibición del etileno no atenúa los procesos oxidativos durante la conservación refrigerada de manzanas con síntomas de estrés por alta radiación solar.

---

## **9 FUTURAS LÍNEAS DE AVANCE**

Ampliar los conocimientos sobre el metabolismo antioxidante enzimático y no enzimático en frutos de manzana con daño de sol y su relación con la acción del etileno.

Profundizar el estudio del proceso bioquímico involucrado en el desarrollo del escaldado de sol y las causas de su intensificación a partir de la inhibición del etileno.

---

## 10 BIBLIOGRAFÍA

Abbasi, S., Naseema A. y Soni R. 1998. Heavy metals in the environment, Mittal publications.

Ahn, T., Paliyath, G., y Murr, D. P. 2007. Antioxidant enzyme activities in apple varieties and resistance to superficial scald development. *Food research international*, 40(8), 1012-1019.

Alscher RG y Hess JL. 1993. Antioxidants in higher plants. Boca Raton: CRC Press.

Aly, M.; El-Megeed, N. A. y Rehab M. Awad, R. M. 2010. Reflective Particle Films Affected on, Sunburn, Yield, Mineral Composition and Fruit Maturity of 'Anna' Apple (*Malus domestica*) Trees. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6(1), 84-92.

Andrews, P. 1997. Anatomical changes and antioxidant levels in the peel of sunscald damaged apple fruit. *Plant Physiology* 114S:103.

Anet, E. F. L. J. 1972. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. IX. Effect of maturity and ventilation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23(6), 763-769.

Bajji M., Kinet J.M. y Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.* 2002;36(1):61-70. doi:10.1023/A:1014732714549.

Beaudry, R., y Watkins, C. 2003. Use of 1-MCP on Apples. *New York fruit quarterly*. Vol. 11 N° 1, pp 11-13.

Benavides-Mendoza, A., H. Ramírez, V. Robledo-Torres, L.O y Fuentes-Lara. 2009. Antioxidantes en las plantas: algunos factores edáficos y ambientales que los modifican. En: *Temas Modernos de Nutrición Vegetal*, A.C., pp. 13-26. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Texcoco, México. ISBN 978-607-95106-2-6.

Benitez, C. 2001. Cosecha y Poscosecha de Peras y Manzanas, en los Valles irrigados de la Patagonia. 77-106. INTA Ediciones.

Blankenship, S.M.; Dole, J.M. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology* 28 (1): pp 1–25.

Bradford, K. y Yang, S. 1980. Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in water-logged tomato plants. *Plant physiology* 65: pp 322-326.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Jay F. Brunner, Wendy Jones, Eugene Kupferman, Chang-Lin Xiao, Dana Faubion, y Gerald Tangren. 2003. Information from the careful evaluation of packingline culls. *Washington tree fruit postharvest conference*.

---

Busatto, N., Farneti, B., Tadiello, A., Vrhovsek, U., Cappellin, L., Biasioli, F., y Costa, F. 2014. Target metabolite and gene transcription profiling during the development of superficial scald in apple (*Malus x domestica* Borkh). BMC plant biology, 14(1), 193.

Calvo, G., y Candan, A. P. 2011. Guía para la identificación de fisiopatías en manzanas y peras. INTA.

Calvo, G., Candan, A. P., Gomila, T. y Villarreal, P. 2008. Cripp's Pink, Investigación regional sobre el comportamiento de la variedad en cosecha y poscosecha. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle Centro Regional Patagonia Norte. 16-17. INTA Ediciones.

Calvo, Gabriela. 2005. Boletín INTA: Situación actual del 1-metilciclopropeno.

Calvo, G. 2001. Nuevas tecnologías de poscosecha. EEA Alto Valle. General Roca, Río Negro. AR. 2001. cap. 3, p. 2.

Calvo, Gabriela y Candan, Ana Paula. 2013. Guía para la identificación de fisiopatías en manzanas y peras. isbn 978-987-679-023-9.

Campos PS, Quartín V, Ramalho JC, Nunes MA. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. J Plant Physiol. 160 (3):283-292. doi:10.1078/0176-1617-00833.

Chae, H. y Kieber, J. 2005. Eto brute. Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. Trends in plant science 10: pp 291-296.

Chaparzadeh, N., y Yavari, B. 2013. Antioxidant responses of Golden delicious apple under cold storage conditions. Iran. J. Plant Physiol, 4(1), 907-915.

Chen, Y., Etheridge, N. y Schaller, E. 2005. Ethylene signal transduction. Annals of botany 95: pp 901-915.

Cheng, L. y Ma, F. W. 2004. Diurnal operation of the xanthophylls cycle and the antioxidant system in apple peel. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129: pp 313-320.

Chen, L. S., Li, P., y 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(5), 745.

Colamarino, 2010. Informe Sectorial N°1. Peras y manzanas. Informe Sectorial de las Cadenas de Origen Agrícola y Forestal. Marzo- abril 2010. Pomáceas. Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/frutas/productos/dePepita/FrutasPepitas\\_2010\\_03Marzo.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/frutas/productos/dePepita/FrutasPepitas_2010_03Marzo.pdf). Fecha de consulta: 10 de Agosto de 2015.

Colavita, G. 2007. Respuesta antioxidante al estrés lumínico y golpe de sol en frutos de manzana. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Comahue.

Colavita, G. M. 2008. Evaluación de la incidencia de asoleado en la producción de región del Alto Valle del Río Negro. Revista Fruticultura & Diversificación 58, 16-23.

Colavita, G., Frassetto F. y López, L. 2005. Incidencia de daño por asoleado en frutos de manzanas en el Alto Valle de Río Negro. Libro de resúmenes del XII Congreso Latinoamericano y XXVIII Congreso Argentino de Horticultura. 116.

---

Contreras, C., J.P. Zoffoli, J.A. Alcalde, y M. Ayala. 2008. Evolution of sunburn in 'Granny Smith' apples during storage. *Cien. Inv. Agr.* 35, 113– 122.

Costa, F., Peace, C. P., Stella, S., Serra, S., Musacchi, S., Bazzani, M. y Van de Weg, W. E. 2010. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 3029-3039.

Dixon, J., y Hewett, E. W. 2000. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28(3), 155-173.

do Amarante, C. V. T., Steffens, C. A., y Argenta, L. C. 2011. Yield and fruit quality of 'Gala' and 'Fuji' apple trees protected by white anti-hail net. *Scientia Horticulturae*, 129(1), 79-85.

Du, Z., y Bramlage y W. J. 1993. A modified hypothesis on the role of conjugated trienes in superficial scald development on stored apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(6), 807-813.

Du, Z., Bramlage y W. J. 1995. Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. *HortScience*, 30(4), 205-209.

Dussi, M. C., Giardina, G., Sosa, D., González Junyent, R., Zecca, A., y Reeb, P. 2005. Shade nets effect on canopy light distribution and quality of fruit and spur leaf on apple cv. 'Fuji'. *Spanish J. Agr. Res.* 3, 253–260.

Ekinci, N., Şeker, M., Aydin, F., y Gündoğdu, M. A. 2016. Possible chemical mechanism and determination of inhibitory effects of 1-MCP on superficial scald of the Granny Smith apple variety. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(1), 38-44.

Elhuyar Fundazioa. 2008. Public Release. Measuring the stress of forested áreas. [http://www.eurekalert.org/pub\\_releases\\_ml/2008-07/aaft-t\\_1072208.php](http://www.eurekalert.org/pub_releases_ml/2008-07/aaft-t_1072208.php)

Ergun, M. 2012. Postharvest quality of 'Galaxy' apple fruit in response to kaolin-based particle film application. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(3), 599-607.

Erturk, U., Akbudak, B., y Ozer, M. H. 2002. Quality changes of some apple cultivars stored in normal atmosphere for long periods. In *International Conference: Postharvest Unlimited* 599 (pp. 665-672).

Fawbush, F., Nock, J., y Watkins, C. 2009. Antioxidant contents and activity of 1-methylcyclopropene (1-MCP)-treated 'Empire' apples in air and controlled atmosphere storage.

Felicetti, D.A., y Schrader, L.E. 2008. Changes in pigment concentrations associated with the degree of sunburn browning of "Fuji" apple. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133:27-M.

Fellman, J. K., Rudell, D. R., Mattinson, D. S., y Mattheis, J. P. 2003. Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27(1), 39-51.

---

Forney, C. F., Jordan, M. A., Nicholas, K. U., y DeEll, J. R. 2000. Volatile emissions and chlorophyll fluorescence as indicators of freezing injury in apple fruit. *HortScience*, 35(7), 1283-1287.

Foyer, C.H., Leilandais, M., y Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. - *Physiol. Plant.* 92: pp 696-717.

Garg, N., y Manchanda, G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosys.*143, 8-96.

Guidi L., Degl'Innocenti E., Carmassi G., Massa D., y Pardossi A. 2011. Effects of boron on leaf chlorophyll fluorescence of greenhouse tomato grown with saline water. *Environmental and Experimental Botany*. Volumen 73. 57-63

Gillen F. 2009. 1-MCP como estrategia de conservación. *Horticultura Internacional* N° 69, 18-24.

Gomila, T., Calvo, G. y Candan, A.P. 2011. Non-destructive index to characterize the maturity of 'williams' pears grown in argentina. *Acta Hort.* 909, 751-756.

DOI:10.17660/ActaHortic.2011.909.93.

<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.909.93>

Gonda, I. 1998. Symptoms of drought stress on fruit crops. In: *Reducing Drought Damage in Horticultural Production*. pp. 28–30. Nyíri, L., and Récsey, A., Eds., Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–22.

Hernandez, O.; Torres, C. A.; Moya-León, M. A.; Opazoc, M. C. y 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.

Hoang, N. T., Golding, J. B., y Wilkes, M. A. 2011. The effect of postharvest 1-MCP treatment and storage atmosphere on 'Cripps Pink' apple phenolics and antioxidant activity. *Food chemistry*, 127(3), 1249-1256.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., y Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604-611.

Huelin, F. E., y Coggiola, I. M. 1968. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. IV Effect of variety, maturity, oiled wraps and diphenylamine on the concentration of a-farnesene in the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19(6), 297-301.

Jayanty, S. S., Cañoles, M., y Beaudry, R. M. 2004. Concentration Dependence of Redchief Delicious' Apple Fruit Softening and Chlorophyll Fluorescence to Repeated Doses of 1-Methylcyclopropene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(5), 760-765.

Johnson, J. R., Fahy, D., Gish, N., y Andrews, P. K. 1999. Influence of ascorbic acid sprays on apple sunburn. *Good Fruit Grower* 50: 81–83.

---

Johnston, J. W., Hewett, E. W., Hertog, M. L., y Harker, F. R. 2001. Temperature induces differential softening responses in apple cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 23(3), 185-196.

Jordán, M. y Casaretto, J. 2006. *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo y L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Ku, V., Wills, R. y Ben-Yehoshua, S. 1999. 1-Methylcyclopropene can differentially affect the postharvest life of strawberries exposed to ethylene. *HortScience* 34, 119–120.

Lee, J., Cheng, L., Rudell, D. R., y Watkins, C. B. 2012. Antioxidant metabolism of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treated 'Empire' apples during controlled atmosphere storage. *Postharvest biology and technology*, 65, 79-91.

Lee J., Rudell D., Davies J., Watkins C., 2012. Metabolic changes in 1-methylcyclopropene (1-MCP)-treated 'Empire' apple fruit during storage

Lelievre, J. M., Tichit, L., Fillion, L., Larrigaudiere, C., Vendrell, M., y Pech, J. C. 1995. Cold-induced accumulation of 1-aminocyclopropane 1-carboxylate oxidase protein in Granny Smith apples. *Postharvest Biology and Technology*, 5(1-2), 11-17.

Lurie, S., Pesis, E. y Ben-Arie, R. 1991. Darkening of sunscald on apples in storage is a non-enzymatic and non-oxidative process. *Postharvest Biology and Technology* 1: pp 119-125.

Lurie, S., y Watkins, C. B. 2012. Superficial scald, its etiology and control. *Postharvest Biology and Technology*, 65, 44-60.

MacLean, D.D., Murr, D.P., y DeEll, J.R., 2003. A modified total oxyradical scavenging capacity assay for antioxidants in plant tissues. *Postharvest Biol. Technol.* 29, pp 183–194.

MacLean, D.D., Murr, D.P., DeEll, J.R., y Horvath, C.R., 2006. Postharvest variation in apple (*Malus domestica* Borkh.) flavonoids following harvest, storage, and 1-MCP treatment. *J. Agric. Food Chem.* 54, pp 870–878.

Marangoni A. G., Palma T. y Stanley D. W. 1996. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology*. Volumen 7, Issue 3, 193-217.

Merzlyak, M. N., Solovchenko, A. E., y Chivkunova, O. B. 2002. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6), 679-684.

Ministerio de Agroindustria. 2016. Frutas. Evolución de la producción Argentina de Manzana. Disponible en: <http://www.agroindustria.gob.ar/dimeagro/frutas/prod-manzpera.php>. Fecha de consulta: 10 de enero de 2017.

Mir, N. A., Curell, E., Khan, N., Whitaker, M., y Beaudry, R. M. 2001. Harvest maturity, storage temperature, and 1-mcp application frequency alter firmness retention and chlorophyll fluorescence of 'delicious' apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(5), 618-624.

---

Mishra D., Myrdal P.B., Ward G.H., Dannenfelser R-M y Yalkowsky S.H. 1992. Aqueous Functional Group Activity Coefficients; Application to Hydrocarbons." *Chemosphere*, 24, 1047-1061.

Mitcham, B., Cantwell, M., y Kader, A. 1996. Methods for determining quality of fresh commodities. *Perishables handling newsletter*, 85, 1-5.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9), 405-410.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., y Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9(10), 490-498.

Moggia, C. y Yuri J. A. 2003. Apple postharvest practices in Chile. Washington tree fruit postharvest conference. December 2nd and 3rd, 2003, Wenatchee, WA Disponible en: <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/PC2003F.pdf>. Fecha de consulta: 10 de Agosto de 2015.

Moller, I.M., Jensen, P.E., y Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 459-481.

Paoletti Francesco, Aldinucci Donatella, Mocali Alessandra y Caparrini Anna. 1986. A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide.

Pesis, E., Feygenberg, O., Goldenberg, L., y Sabban-Amin, R. 2012. Superficial scald symptoms in 'Granny Smith' apples associated with reactive oxygen species (ROS) accumulation. In *Proc Fla State Horticult Soc.* 125, 276-279.

Quintanar Escorza, Martha Angélica; Calderón Salinas, y José Víctor. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, vol. 28, núm. 3, pp. 89-101 Universidad Nacional Autónoma de México Distrito Federal, México.

Racskó, J., Szabó, T., Nyéki, J., Soltész, M., Nagy, P. T., Miller, D. D., y Szabó, Z. 2010. Characterization of sunburn damage to apple fruits and leaves. *International Journal of Horticultural Science*, 16(4), 15-20.

Racsco, J., Szabo, Z., y Nyeki, J. 2005. Importance of supraoptimal radiance supply and sunburn effects on apple fruit quality. *Acta Biol. Szegediensis* 49, 111–114.

Racsco, J., y Schrader, L.E., 2012. Sunburn of apple fruit: historical background, recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 455–504.

Ritenour, M., Schrader, L. y Ku, M. 1998. The presence of heat-shock proteins in sun-exposed and heat-treated apple fruit. *HortScience* 33: pp 452.

Rodikov, S. A. 2008. New data on the effect of solar radiation and  $\alpha$ -farnesene on development of apple superficial scald during storage. *Russian Agricultural Sciences*, 34 (3), 162-164.

Rodríguez A. y Muñoz A. 2006. Síntesis Agrometeorológica para el período 1990-2004 EEA Alto Valle. Ed. INTA. *Boletín Divulgación Técnica* 53, 4-45.

---

Rodríguez, Andrea, Dolores Raffo Benegas y Mariela Curetti. 2008. Asoleado de frutos: Variables meteorológicas que afectan la temperatura superficial de manzanas cv. royal gala en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén.

Rudell, D. R., Mattheis, J. P., y Curry, E. A. 2008. Prestorage ultraviolet- white light irradiation alters apple peel metabolome. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(3), 1138-1147.

Rufino, M. S., Alves, R. E., Fernandes, F. A., y Brito, E. S. 2011. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. *Food Research International*, 44(7), 2072-2075.

Rupasinghe, H. V., Paliyath, G., y Murr, D. P. 2000. Sesquiterpene  $\alpha$ -farnesene synthase: partial purification, characterization, and activity in relation to superficial scald development in apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125 (1), 111-119.

Sabban-Amin, R., Feygenberg, O., Belausov, E., y Pesis, E. (2011). Low oxygen and 1-MCP pretreatments delay superficial scald development by reducing reactive oxygen species (ROS) accumulation in stored 'Granny Smith' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 62(3), 295-304.

Schrader, L. E., Kahn, C. B., y Elfving, D. C. 2009a. Sunburn browning decreases at-harvest internal fruit quality of apples (*Malus domestica* Borkh.). *Int. J. Fruit Sci.* 9: pp 425-437.

Schrader, L. E., Sun, J., Felicetti, D., Seo, J-H., Jedlow, L., y Zhang, J. 2003. Stress-induced disorders: Effects on apple fruit quality. *Proc. Washington Tree Fruit Postharvest Conf.* Disponible en: <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/PC2003A.pdf>. Fecha de consulta: 10 de Agosto de 2015.

Schrader, L. E., Zhang, J., Sun, J., Xu, J., Elfving, D. C., y Kahn, C. 2009b. Postharvest changes in internal fruit quality in apples with sunburn browning. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1), 148-155.

Schrader, L. E., Zhang, J., y Duplaga, W. K. 2001. Two types of sunburn in apple caused by high fruit surface (peel) temperature. *Plant Health Progress*, 10, 1-5.

Schrader, L. Sun J., Zhang, J. Felicetti, D. y Tian, J. 2008. Heat and light-induced Apple skin disorders: Causes and prevention. *Acta Hort.* 772: pp 51-58.

SENASA. 2017. Anuario estadístico 2017. Centro Regional Patagonia Norte. Disponible en: [http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/SENASA%20COMUNICA/PUBLICACIONES/anuario\\_estadistico\\_2017\\_web.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/SENASA%20COMUNICA/PUBLICACIONES/anuario_estadistico_2017_web.pdf). Fecha de consulta: 6 de noviembre de 2018.

Serradell María de los Angeles, Rozenfeld Paula Adriana, Martínez Gustavo Adolfo, Civello Pedro Marcos, Chaves Alicia Raquel y Añón María Cristina. 2000. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification.

---

Shaham Z., Lers A., y Lurie Susan 2003. Effect of Heat or 1 Methylcyclopropene on Antioxidative Enzyme Activities and Antioxidants in Apples in Relation to Superficial Scald Development. *Hort Science* 128 (5), 761-766.

Sharma, P., Jha A.B., Dubey R.S., y Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Botany*. 2012, 1-26.

Shewfelt, R. L., y Del Rosario, B. A. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *HortScience*, 35 (4), 575-579.

Sibbett, G., Micke, W., Mitchell, F., Mayer, G., y Yeager, J. 1991. Effect of a topically applied whitener on sun damage to Granny Smith apples. *California Agriculture*, 45(1), 9-10.

Sisler, E.C., y Serek, M. 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiologia Plantarum* 100: pp 577–582.

Smirnoff, N., y Cumbes, Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.

Solano, R., Stepanova, A. Chao, Q. y Ecker, J. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive and ethylene-responsefactor1. *Genes and development* 12: pp 3703-3714.

Solovchenko, A. E., Avertcheva, O. V., y Merzlyak, M. N. 2006. Elevated sunlight promotes ripening-associated pigment changes in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 40(2), 183-189.

Song, J., Deng, W., Beaudry, R. M., y Armstrong, P. R. 1997. Changes in chlorophyll fluorescence of apple fruit during maturation, ripening, and senescence. *HortScience*, 32(5), 891-896.

Sozzi, G.O., y Beaudry, R.M. 2007. Current perspectives on the use of 1-methylcyclopropene in tree fruit crops: an international survey. *Stewart Postharvest Review* 3 (2): pp 1–16.

Taiz, L. y Seiger, E. 2010. *Stress Physiology*. *Plant Physiology*, 5<sup>o</sup> Edición. 591-623. Editorial Sinauer.

Tartachnyk, I., Kuckenbergh, J., Yuri, J. A., y Noga, G. 2012. Identifying fruit characteristics for non-invasive detection of sunburn in apple. *Scientia Horticulturae*, 134, 108-113.

Toranzo, J. 2016. Producción mundial de manzanas y peras. Programa Nacional Frutales. Revisión mayo 2016. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle. INTA Ediciones, 27-28.

Torres, C.A., P.K. Andrews, y N.M. Davies. 2006. Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *J. Expt. Bot.* 57:1933–1947.

Torres, C.A., Sepulveda, A., Gonzalez-Talice, J., Yuri, J.A. y Razmilic, I., 2013. Fruit water relations and osmoregulation on apples (*Malus domestica* Borkh.) with different sun exposures and sun-injury levels on the tree. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 161, 143–152.

---

Torres, C. A., Sepúlveda, G., y Kahlaoui, B. 2017. Phytohormone Interaction Modulating Fruit Responses to Photooxidative and Heat Stress on Apple (*Malus domestica* Borkh.). *Frontiers in plant science*, 8, 2129.

Tsantili, E., Gapper, N. E., Arquiza, J. A., Whitaker, B. D., y Watkins, C. B. 2007. Ethylene and  $\alpha$ -farnesene metabolism in green and red skin of three apple cultivars in response to 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (13), 5267-5276.

Tustin, D. S., Watkins, C. B., Castmore, W. M., y Brookfield, P. L. 1993. Sources Of Variation In Fruit Quality Ofbraeburn'apple At Harvest And After Storage. *HortScience*, 28(5), 446-446.

Vilaplana, R., Valentines, M. C., Toivonen, P., y Larrigaudière, C. 2006. Antioxidant Potential and Peroxidative State of Golden Smoothie'Apples Treated with 1-Methylcyclopropene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(1), 104-109.

Vita, L.I., Gonzalez, N.F. y Colavita, G.M. 2016. Effect of preharvest solar radiation on apple skin oxidative disorders during cold storage. *Acta Hort.* 1144, 325-332.

Wand, S.J.E., Theron, K. I., Ackerman, J., y Marais, S.J.S. 2006. Harvest and post-harvest apple fruit quality following applications of kaolin particle film in South African orchards. *Sci. Hort.* 107, 271–276.

Wang, K, Li, H. y Ecker, J. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant cell* 14: pp 131-151.

Wang, K., Yoshida, H. Iurin, C. y Ecker, J. 2004. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the arabidopsis *eto1* protein. *Nature* 428: pp 945-950.

Warrington I.J. 1998. The 'Granny Smith' apple. En Ferree, D.C. (ed.) *A History of Fruit Varieties*. Good Fruit Grower Magazine, Yakima, Washington, pp 111-115.

Watkins, C. B., Bramlage, W. J., y Cregoe, B. A. 1995. Superficial scald of Granny Smith'apples is expressed as a typical chilling injury. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(1), 88-94.

Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.

Whitaker, B. D. 2007. Oxidation products of  $\alpha$ -farnesene associated with superficial scald development in d'Anjou pear fruits are conjugated trienols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(9), 3708-3712.

Wolf, A. B. y Ferguson, I. B. 2000. Postharvest responses to high fruit temperatures in the field. *Postharvest Biol. Technol.* 21: pp 7–20.

Wünsche, J. N., Greer, D., Palmer, J., Lang, A. y McGhie, T. 2001. Sunburn the cost of the high light environment. *Acta Horticulturae* 557: pp 349-356.

---

Wünsche, J.N., Bowen, J., Ferguson, I., y Woolf, A. 2004. Sunburn on apples-causes and control mechanisms. *Acta Horticulturae* 636: pp 631-636.

Yang, S. 1987. The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. En: thomson ww, ea nothnagel & rc huffaker (eds) *plant senescence: its biochemistry and physiology*: pp 156-166. American society of plant physiologists, rockville, USA.

Yuri, J. A., Lepe, V., Moggia, C., Bastias, R. y Bertschinger, L. 2004. Sunburn on apple. *Schweiz. Zeitschr. Obst- und Weinbau* 8: 7–10.

Yuri, J. A., Neira, A., Maldonado, F., Quilodran, A., Simeone, D., Razmilic, I., y Palomo, I. 2014. Total phenol and quercetin content and antioxidant activity in apples in response to thermal, light stress and to organic management. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87.

Yuri, J. A., Neira, A., Quilodran, A., Razmilic, I., Motomura, Y., Torres, C., y 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(2), 920-925.

Yuri, J. A., Torres, C. y Vásquez, Y. J. 2000. Sunburn on apples. I. Damage evaluation and control methods. *Agro-Ciencia* 16(5): pp 13–21.

Yuri, J.A. 2001. El daño por sol en manzanas. *Revista Frutícola (Chile)* 3: pp 89-96.