



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN AGRONOMÍA

ESTRÉS POR ALTA RADIACIÓN SOLAR EN PLANTAS DE
MANZANO (*Malus domestica* Borkh.): ESTUDIO DEL
PROCESO DE FOTOQUÍMICA, ESTRÉS FOTOXIDATIVO Y LA
INFLUENCIA DEL ESTATUS NUTRICIONAL

VALERIA BLACKHALL

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el 2012 y el 2018, bajo la dirección del Dr. Gustavo Adolfo Orioli.

.....

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR</p> <p>Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de(.....)</p>
-------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

.....
Director

– Usted dice, profesor Nietzsche, que el crecimiento es la recompensa del sufrimiento...

– No, no sólo el desarrollo. También está la fortaleza. Un árbol necesita tiempo tormentoso para alcanzar una altura de la que enorgullecerse (...) “Hay que tener caos y frenesí interior para dar a luz una estrella danzarina”.

Extracto de “El día que Nietzsche lloró”,
Irvin D. Shalom.

A Santi, mi compañero incondicional en esta aventura de la vida,
mi caos, mi frenesí interior...

Agradecimientos

A mi director, Dr. Gustavo Orioli, por haber aceptado la dirección de la presente tesis, por compartir sus aportes académicos y culturales.

A mi co-directora de beca, M.Sc Graciela Colavita, por abrirme las puertas al mundo de la Fisiología Vegetal y acompañarme en este proceso. Sin su permanente asesoramiento y participación esta tesis no hubiera sido posible.

A las instituciones donde se llevaron a cabo los ensayos de campo: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue y Estación Experimental Alto Valle INTA, y los análisis de laboratorio: Instituto de Biotecnología del Comahue (IBAC), CITAAC CONICET-UNCo.

A la Comisión de Doctorado de Agronomía, y a la Universidad Nacional del Sur.

A los miembros del jurado.

A M.Sc Mariela Curetti, por su compañía, aportes en el trabajo en equipo, amistad y consejos.

A todos los que me acompañaron en el campo y en el laboratorio: Andrea Castro, Alen Martín, Ximena Mondaca, Romina Enríquez, Ana Scarso, Melisa Mux, Dolores Del Brío, Mariana Guerreño, Marisa Tudela, Fernando Roma, Freddy Cabezas, Nazarena Spera, Laura Vita, Nidia González y Patricia Rebolledo.

A los que me dieron una mano en alguna parte de esta tesis, con charlas de pasillo, consultas y apoyo para llegar a la meta, ... Cristina Sosa, Ceci Lutz, Melisa Blackhall, Hugo Álvarez, compañeros del grupo de Fisiología Vegetal, Vero Romero por prestarme su oficina y amigos por la compañía a lo largo de estos años.

Especial agradecimiento a toda mi familia, Papá, Melisa, Matías, Federico, Lucía, Agustina y Joaquín, por estar siempre, escucharme y aconsejarme pacientemente.... Y a Mamá por sembrar en mí su pasión por las ciencias naturales y enseñarme a indagar.

Y por sobre todo a Santi, por motivarme, acompañarme e incentivarme a ser una mejor versión de mí misma.... Y a Facu, que nos completa en todo sentido... *nuestra estrella danzarina.*

Resumen

La radiación solar es la fuente de energía primordial para la subsistencia de la vida sobre el planeta. Las plantas, responsables de la conversión de la luz en energía química a través de la fotosíntesis, no solo tienen que utilizar la energía solar para subsistir, sino que además deben lidiar con un exceso de energía de excitación (EEE). El EEE conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) potencialmente dañinas para las biomoléculas. La generación de ROS dependiente de la luz se conoce como *estrés fotooxidativo*. Esta situación se suele observar en las regiones semiáridas como el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, donde los cultivos están sometidos a condiciones de alta radiación solar. En manzano (*Malus domestica* Borkh.) se han registrado hasta un 40 % de pérdida en la producción debido al *asoleado* de los frutos, producto del estrés fotooxidativo. El adecuado funcionamiento de la etapa fotoquímica de la fotosíntesis, así como la disipación del EEE a través de mecanismos fotoprotectores y el sistema antioxidante son fundamentales para evitar el daño fotooxidativo. Estos procesos requieren de nutrientes minerales esenciales, como el Mg para la adecuada disipación de energía en el PSII, y de Zn al ser cofactor de enzimas del sistema antioxidante. El objetivo general de la presente tesis fue estudiar el efecto de la alta radiación solar en plantas de manzano, daño fotooxidativo, y la influencia del estatus nutricional de Mg y Zn en la reducción del estrés, ya sea al incrementar la disipación de energía o a través de la promoción del sistema antioxidante. Los ensayos se llevaron a cabo en plantas de manzano adultas en plena producción. El material vegetal estudiado fueron hojas y frutos expuestos y no expuestos a la radiación solar directa. Se estudió el funcionamiento de la etapa fotoquímica a través de la fluorescencia directa de la clorofila *a*. En este experimento se observó que la etapa fotoquímica es afectada en condiciones de alta radiación solar en hojas y frutos expuestos, presentando mayor daño fotooxidativo y degradación de clorofila que las hojas y frutos no expuestos respectivamente. El crecimiento de los frutos redujo su capacidad fotoquímica. La exposición abrupta al sol produjo más daño oxidativo en los frutos en estadios tempranos y medios. En los ensayos con plantas deficientes de Mg se observó menor contenido de clorofila, menor tasa fotosintética y por ende una menor capacidad de procesar químicamente la luz. A niveles productivos se observó un 16 % más de frutos asoleados con respecto a las plantas no deficientes de Mg. En los ensayos con

aplicaciones foliares de Zn se observó un incremento en el contenido de los pigmentos fotosintéticos y en la capacidad antioxidante de las hojas expuestas a la radiación solar, debido al aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa. Por lo tanto, plantas de manzano con un adecuado nivel de Mg y Zn nutricional estarían mejor preparadas para soportar climas áridos con altos niveles de radiación solar. Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron generar información con respecto a la fisiología de las plantas de manzano en situación de estrés por alta radiación solar en el Alto Valle de Río Negro que podría ser considerada para el manejo del cultivo.

Abstract

Solar radiation is the main energy source for life subsistence on the planet. Plants, responsible for the conversion of light into chemical energy through photosynthesis, not only have to use solar energy to survive, but also must deal with an excess of excitation energy (EEE). The EEE leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) potentially harmful to biomolecules. Light dependent ROS generation is known as photooxidative stress. This situation is frequently observed in semi-arid regions such as Alto Valle de Río Negro and Neuquén, where crops grow under high solar radiation conditions. Up to 40% of production loss has been recorded in apple crops (*Malus domestica* Borkh.) due to fruit sunburn caused by photooxidative stress. Photochemical stage of photosynthesis, as well as EEE dissipation through photoprotective mechanisms and antioxidant system, play a fundamental role in preventing photooxidative damage. These processes require essential mineral nutrients, such as Mg for the adequate energy dissipation in the PSII, and Zn as antioxidant enzymes cofactor. The main objective of this thesis was to study the effect of high solar radiation on apple plants, photooxidative damage, and influence of Mg and Zn nutritional status on stress alleviation, either by increasing energy dissipation or by promoting the antioxidant system. The tests were carried out in adult apple plants. Leaves and fruits exposed and not exposed to direct solar radiation were studied. Photochemical photosynthesis stage was studied through chlorophyll *a* fluorescence. Photochemical stage was affected by high solar radiation in exposed leaves and fruits, presenting greater oxidative damage and chlorophyll degradation than not exposed leaves and fruits. Fruit growth reduced their photochemical capacity. Suddenly sun exposed fruits presented more oxidative damage at early and mid-growth stages. Mg deficient plants showed lower chlorophyll content, lower photosynthetic rate and therefore a lower capacity to chemically process light. At harvest sunburn fruits was 16% greater respect to non-deficient Mg plants. Zn foliar sprays increased photosynthetic pigments content and antioxidant capacity of sun exposed leaves, with an increase in superoxide dismutase enzyme activity. Therefore, apple plants with adequate Mg and Zn nutritional status could be more prepared to withstand high solar radiation in arid zones. The results obtained in this thesis generated information regarding apple

trees physiology under high solar radiation stress in Alto Valle of Río Negro that could be considered for crop management.

Índice General

Prefacio	i
Agradecimientos	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
Índice General	xiii
<i>Capítulo 1. Introducción general</i>	1
1. Estrés en plantas.....	3
2. Radiación Solar.....	4
3. Uso de la luz por parte de las plantas	6
4. Fotosíntesis en condiciones de alta radiación solar.....	10
4.1. Disipación del exceso de energía lumínica a nivel de PSII.....	11
4.1.1. <i>Quenching</i> energético, qE.....	12
4.2. Fotoinhibición	13
4.3. Efecto de la radiación UV en el metabolismo fotosintético	15
4.4. Efecto de la radiación infrarroja en el metabolismo fotosintético	16
5. Estudio de la etapa fotoquímica por fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	17
5.1. Fluorescencia directa de la clorofila <i>a</i> : fase rápida, curva OJIP	18
6. Estrés fotooxidativo	20
6.1. Especies reactivas de oxígeno.....	20
6.2. Daños por estrés fotooxidativo.....	22
6.3. Remoción de ROS.....	23
6.3.1. Sistema antioxidante enzimático.....	24
6.3.2. Sistema antioxidante no enzimático.....	25
7. Mecanismos de fotoprotección.....	26

8. Rol de algunos nutrientes en el estrés fotooxidativo	27
8.1. Importancia del magnesio en la disipación de la energía	27
8.2. Importancia del cinc en la actividad antioxidante	28
9. Estrés por alta radiación solar en plantas de manzano	29
9.1. Cultivo de manzano en los valles de la Norpatagonia	29
9.2. Asoleado de frutos de manzano	30
10. Fundamentación del estudio	32
<i>Objetivo general</i>	33
<i>Objetivos específicos</i>	33
11. Referencias	34
<i>Capítulo II. Materiales y métodos</i>	41
1. Localización y período de estudio	43
2. Caracterización del clima y suelo del área de estudio	44
3. Registro de las condiciones meteorológicas durante el periodo de estudio.	45
3.1. Radiación fotosintéticamente activa (PAR)	47
3.2. Temperatura ambiente y temperatura superficial de fruto y hoja.....	47
4. Material Vegetal.....	47
5. Diseño experimental.....	49
6. Contenido de nutrientes.....	50
7. Variables Respuestas.....	51
7.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos.....	51
7.1.1. Clorofila	51
7.1.2. Carotenos	52
7.2. Fotoquímica primaria evaluada por fluorescencia directa de la clorofila <i>a</i> . “Fase rápida”	52
7.2.1. Análisis JIP	53

7.3. Fotosíntesis neta y variables asociados	54
7.4. Contenido relativo de agua	55
7.5. Integridad de membranas	55
7.6. Daño oxidativo en membranas.....	56
7.7. Sistema antioxidante	57
7.7.1. Capacidad antioxidante total según inhibición del radical DPPH.....	57
7.7.2. Polifenoles totales.....	58
7.7.3. Enzimas antioxidantes.....	59
7.7.3.1. Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	59
7.7.3.2. Cuantificación de proteínas	60
7.8. Electroforesis de extracto proteico en gel desnaturizante. SDS-PAGE.....	60
7.9. Contenido de hidratos de carbono.....	61
7.9.1. Preparación de extractos	61
7.9.2. Azúcares	62
7.9.3. Almidón	62
7.10. Rendimiento a cosecha y tamaño de frutos	62
7.11. Incidencia de daño por sol en frutos.....	63
7.12. Madurez de frutos.....	64
8. Análisis estadístico.....	64
9. Referencias	65

Capítulo III. Efectos de la alta radiación solar y el desarrollo en la etapa fotoquímica en manzanos.....	67
1. Introducción	69
Objetivo	72
Hipótesis.....	73
2. Materiales y métodos	73

2.1. Material vegetal	73
2.2. Diseño experimental y determinaciones realizadas.	73
3. Resultados	75
3.1. Condiciones de radiación solar y temperatura	75
3.2. Resultados en hoja.....	77
3.2.1. Contenido de clorofila en hojas	77
3.2.2. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> y JIP-test en hojas	78
3.2.3. Daño oxidativo en membranas.....	82
3.3 Resultados en fruto	82
3.3.1 Contenido de clorofila en piel de frutos	82
3.3.2. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> y JIP test en frutos.	84
3.3.3. Daño oxidativo en membranas.....	90
4. Discusión.....	90
5. Conclusiones.....	100
6. Referencias	101

Capítulo IV. Efecto del nivel magnésico nutricional en el estrés oxidativo por alta radiación solar en manzanos	105
1. Introducción	107
Objetivo	111
Hipótesis.....	112
2. Materiales y métodos	112
2.1. Material vegetal	112
2.2. Diseño experimental y establecimiento de los tratamientos.....	112
2.3. Muestreos y determinaciones realizadas.....	114
2.3.1. Contenido nutricional	114
2.3.2. Determinaciones realizadas en hojas.....	114

2.3.3. Respuesta de los frutos a la alta radiación solar en condiciones controladas de temperatura e incidencia de la radiación.....	115
2.3.4. Evaluación de rendimiento y asoleado a cosecha.....	117
3. Resultados	117
3.1 Contenido nutricional	117
3.2 Determinaciones realizadas en hojas.....	119
3.3 Respuesta de los frutos a la alta radiación solar en condiciones controladas de temperatura e incidencia de la radiación.....	125
3.4 Asoleado y rendimiento a cosecha.....	128
4. Discusión.....	129
5. Conclusiones.....	141
6. Referencias	142

Capítulo V. Efecto de la aplicación de cinc en plantas de manzano en condiciones de estrés oxidativo por alta radiación solar 147

1. Introducción	149
Objetivo.....	153
Hipótesis.....	153
2. Materiales y métodos	154
2.1. Material vegetal.....	154
2.2. Diseño experimental y establecimiento de los tratamientos.....	154
2.3. Muestreos y determinaciones realizadas.....	155
2.3.1. Contenido de cinc en hojas y piel de frutos.....	155
2.3.2 Muestreo y determinaciones en hojas.....	155
2.3.3 Muestreo y determinaciones en piel de frutos.....	156
2.3.4. Evaluación de rendimiento y asoleado a cosecha.....	157
3. Resultados	157

3.1. Análisis en hojas.....	157
3.1.1. Contenido de cinc.....	157
3.1.2 Determinaciones realizadas en hojas.	158
3.2. Resultados de los muestreos en frutos.....	161
3.2.1. Contenido de cinc.....	161
3.2.2. Determinaciones realizadas en piel de frutos	162
3.3. Evaluación de rendimiento y asoleado a cosecha.	163
4. Discusión.....	163
5. Conclusiones.....	169
6. Referencias	170
<i>Capítulo VI. Síntesis y conclusión general.....</i>	<i>173</i>
Aspectos de interés para futuras líneas de estudio.....	177

Presentaciones a congresos asociados a esta tesis

- Blackhall V., Colavita G.M., Orioli G.A., 2014. Integridad del aparato fotosintético en frutos y hojas de manzana bajo condiciones de estrés por alta radiación solar. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 21-24 de septiembre, 2014. Mar del Plata, Argentina. Presentación de resumen y póster.
- Blackhall V., Colavita G.M., Mux M., Orioli G.A., 2014. Aliviación del estrés por alta radiación solar en manzanos mediante fertilización con Mn y Zn. XXXVII Congreso Argentino de Horticultura. 23-26 de septiembre, 2014. Mendoza, Argentina. Presentación de resumen y póster.
- Blackhall V., Colavita G.M., Orioli G.A., 2015. Solar spectrum radiation and temperature effects in apple peel oxidative damage. XV Congreso Brasileiro de Fisiología Vegetal (XV CBFV) y 1ra Conferencia Brasil-Israel de Ciencias de Plantas (1^a CBICP), Foz do Iguazú, Paraná, 28 de septiembre a 2 de octubre de 2015. Presentación de resumen y póster.
- Blackhall V., Curetti M., Orioli G.A., Colavita G.M. 2016. Influencia del contenido de magnesio en la capacidad fotosintética de las hojas de manzano. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 13-16 de noviembre, 2016. Ciudad de Corrientes, Argentina. Presentación de resumen y póster.

Blackhall V., Orioli G.A., Colavita G.M. 2016. Changes in apple leaf and fruit peel photosystem-II photochemistry under high light conditions. I International Apple Symposium. International Society of Horticultural Science. Yangling, Shaanxi, China. October 2016. Presentación de resumen y póster.

Blackhall V., Curetti M., Orioli G.A., Colavita G.M. 2017. Influence of the magnesium content in apple leaves photosynthetic capacity. VIII International symposium on mineral nutrition on fruits crops. International Society of Horticultural Science. Bozen-Bolzano, Italy, June 2017. Presentación de resumen y póster.

Artículos completos en actas de simposios asociados a esta tesis

Blackhall V., Curetti M., Orioli G.A., Colavita G.M. 2018. Influence of the magnesium content in apple leaves photosynthetic capacity. Acta Hort. (ISHS) 1217:151-158.

Blackhall V., Orioli G.A., Colavita G.M. Changes in apple leaf and fruit peel photosystem-II photochemistry under high light conditions. Acta Hort. I International Apple Symposium. International Society of Horticultural Science. EN PRENSA.

Capítulo I

Introducción general

1. Estrés en plantas

El estrés, en términos biológicos, se define como un factor externo que ejerce una influencia desfavorable en la planta (Taiz *et al.*, 2014). En general implica la desviación en la fisiología normal y el desarrollo, con efectos perjudiciales y en algunos casos daños irreversibles. Se puede evaluar en relación a la supervivencia de la planta, el rendimiento del cultivo, el crecimiento (acumulación de biomasa) o los procesos fisiológicos de asimilación primaria (CO₂ y absorción de minerales) relacionados con el crecimiento en general (Taiz *et al.*, 2014). El *tipo* de estrés que sufren las plantas puede ser clasificado en biótico o abiótico según el agente causal. Dentro del primer grupo podemos mencionar a los organismos vivos que parasitan a las plantas como los virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos, como también la competencia intra e interespecífica, la herbivoría y alelopatía. El estrés abiótico puede ser causado por factores físicos o químicos. Dentro de los factores físicos podemos mencionar las condiciones ambientales como las altas o bajas temperatura, déficit o exceso de agua, viento y radiación solar caracterizada por la intensidad y calidad lumínica. El estrés abiótico por factores químicos está dado por los nutrientes minerales, metales pesados, toxinas y salinidad, entre otros.

El estudio de la fisiología de las plantas en condiciones de estrés abiótico es de gran relevancia a nivel mundial. La interacción de las plantas con los factores ambientales permite analizar la distribución de especies en los distintos ecosistemas. Mientras que, desde un punto de vista más agronómico, permite comprender cómo el rendimiento y calidad de los cultivos se ve afectado en condiciones de estrés.

Hay una gran cantidad de estudios realizados sobre el efecto del estrés hídrico y estrés por temperaturas extremas en las plantas. Sin embargo, los efectos de la alta

intensidad lumínica, en general, han sido estudiados como una consecuencia de estos dos factores estresantes, al verse limitada o inhibirse la fotosíntesis. Pocos estudios profundizan en el estrés por alta radiación solar como factor estresante en sí mismo.

En las regiones áridas o semiáridas como el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, los cultivos se encuentran sometidos a estrés abiótico por condiciones de alta radiación solar, generando daños en los cultivos frutihortícolas. Como se detalla más adelante, se ha elegido este tipo de estrés como tema de estudio de la presente tesis fundamentalmente por su relevancia y su impacto en el cultivo de manzanos.

2. Radiación Solar

La radiación solar es la energía en forma de radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol. La energía radiante se mide en Joules (J) y su tasa se mide en J s^{-1} o watts (W). Por lo tanto, la tasa a la cual una superficie intercepta la energía radiante se expresa en W m^{-2} . El espectro de radiación electromagnética se caracteriza por ondas de distinta longitud de onda (λ) y frecuencia (ν). La radiación visible o luz, también denominada radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés), representa una pequeña porción del espectro de radiación, con una longitud de onda entre 400 y 700 nm (Figura 1.1) y constituye el 40 % de la radiación solar que llega a la superficie de la tierra. El resto de la energía solar que incide sobre la superficie terrestre está conformada por la radiación infrarroja (58 %, λ mayor a 700 nm) y radiación ultravioleta (1,9 %, λ menor a 400 nm) (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

De acuerdo a la teoría dual de la mecánica cuántica, la radiación puede ser descripta como ondas y como partículas (Taiz *et al.*, 2014). Las partículas de luz se

denominan fotones y su energía (E), denominada cuanto, depende de su frecuencia. La radiación solar es como una lluvia de fotones de diferente frecuencia y longitud de onda. La luz incidente efectiva para la fotosíntesis se puede expresar en términos de energía ($W m^{-2}$) o como densidad de flujo fotónico (PDF, μmol de fotones $m^{-2} s^{-1}$).

Alta intensidad de radiación solar implica alta intensidad lumínica o alta radiación PAR. La variación en la intensidad de la radiación solar está dada principalmente por cuestiones geográficas y meteorológicas. Días diáfanos, sin nubosidad y baja concentración de partículas en suspensión en la atmósfera, permiten el paso de la radiación solar directa, registrándose valores de radiación PAR elevados, entre 1200 y 1800 $\mu mol s^{-1} m^{-2}$ (dependiendo de la altitud), lo que en unidades de energía representa aproximadamente 400 $W m^{-2}$ (Fitter y Hay, 2002; Taiz *et al.*, 2014).

La radiación solar que incide sobre la superficie terrestre puede ser reflejada o absorbida por las moléculas. Un fotón absorbido, según su energía (o frecuencia), puede ionizar átomos, excitar electrones, disociar o hacer vibrar una molécula. A mayor energía (mayor frecuencia o menor longitud de onda) el cambio que produce en los átomos es mayor. La energía de un fotón que es utilizada para impulsar una transformación física o química en una molécula se denomina energía de excitación o excitón (Azcón-Bieto y Talón, 2008). A través de la energía de excitación de la radiación PAR las plantas pueden fijar CO_2 y sintetizar compuestos carbonados mediante el proceso de fotosíntesis. La radiación infrarroja, también denominada radiación térmica, es la responsable del calor al hacer vibrar las moléculas. Mientras que la radiación UV, de mayor energía, tiene la capacidad de producir grandes

cambios en las moléculas como romper enlaces químicos (Kovács y Keresztes, 2002).

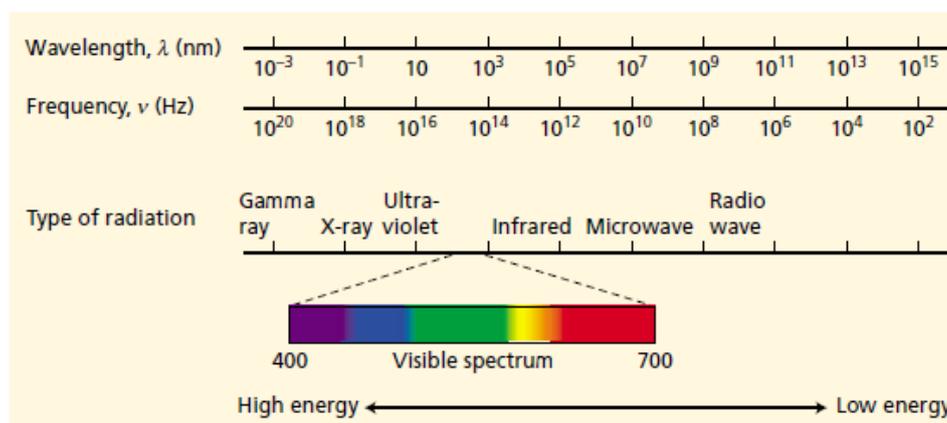


Figura 1.1. Espectro de radiación electromagnética. Longitud de onda (λ) y frecuencia (ν) son inversamente proporcional. El espectro de radiación visible, o radiación fotosintéticamente activa (PAR) se extiende desde los 400 nm (violeta) a los 700 nm (rojo). Extraído de Taiz y Zeiger (2006).

La conversión de energía solar en energía química a través de la fotosíntesis es indispensable para la vida en la tierra. Sin embargo, los organismos fotosintéticos no solo tienen que utilizar la energía solar para subsistir, sino que además deben lidiar con un exceso de energía de excitación potencialmente dañina para las biomoléculas. En la presente tesis se trabajará principalmente desde este enfoque, es decir, con el efecto de la alta radiación solar como exceso de energía de excitación o alta intensidad lumínica.

3. Uso de la luz por parte de las plantas

Las plantas convierten la energía de la luz en energía química a través del transporte de electrones entre el fotosistema II (PSII) y el fotosistema I (PSI) en las membranas de los tilacoides en los cloroplastos. En esta primera etapa de la fotosíntesis, denominada fase fotoquímica o reacción de Hill, se obtiene energía química en forma de ATP y NADPH, necesaria para la fijación de CO_2 en el ciclo de Calvin.

La luz es absorbida por pigmentos fotosintéticos, como la clorofila y carotenos, organizados en los complejos antena (LHC, Light Harvesting Complexes) asociados a los fotosistemas. La clorofila, pigmento fotosintético más importante, se caracteriza por tener en su estructura un anillo tetrapirrólico con un catión metálico de Mg^{+2} en el centro y una larga cadena hidrófoba de fitol (Azcón-Bieto y Talón, 2008). En su estructura posee una gran cantidad de dobles enlaces conjugados (enlaces dobles alternados con enlaces simples) confiriéndole a la molécula la capacidad de absorber luz en la zona del azul y el rojo. Cuando las moléculas de clorofila absorben un fotón, cambian su estado electrónico, pasando de un estado basal de mínima energía (S_0) a un estado excitado (S_1 o S_2) de mayor energía. La molécula excitada es muy inestable, por lo que tiene una marcada tendencia a ceder el exceso de energía y volver a su estado fundamental. La molécula de clorofila puede des-excitarse mediante diferentes vías alternativas (Figura 1.2, Azcón-Bieto y Talón, 2008):

1. La energía se puede liberar mediante relajación de la vibración dentro del mismo estado electrónico en forma de calor o energía no radiante (RV) o mediante saltos descendentes cortos entre estados electrónicos próximos de la misma molécula o moléculas cercanas, denominado conversión interna (CI).
2. Mediante la reemisión de un fotón de menor energía (λ mayor a 600 nm), proceso conocido como fluorescencia (FL).
3. Paso de la configuración electrónica de singlete (S) a triplete (T, inversión del espín del electrón excitado), denominado cruce intersistemas (IS). A su vez la relajación del estado triplete al estado singlete basal se puede

producir mediante la emisión de un fotón de luz, proceso muy poco frecuente denominado fosforescencia (FO).

4. Transferencia de energía de excitación a otra molécula lo suficientemente cercana. Esta vía se denomina transferencia excitónica (TE), y es la vía clave para el paso de energía entre distintas moléculas de clorofila, hasta llegar al centro de reacción del fotosistema, y permitir la conversión de energía lumínica en energía química de enlace a través del proceso conocido como fotoquímica primaria (Taiz y Zeiger, 2006).

El proceso de fotoquímica primaria sucede en los centros de reacción de los fotosistemas al producirse la primera separación de carga. Los centros de reacción, conformados por dos subunidades proteicas, D1 y D2, contienen moléculas de clorofila especiales denominadas P700 en el PSI y P680 en el PSII. Estas moléculas en su estado excitado tienen un nivel energético menor que el resto de las moléculas, por lo que actúan como sumidero o trampa energética (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Al recibir la energía de excitación por transferencia excitónica se convierten en un agente altamente reductor, dador de electrones. Cuando ceden un electrón a una molécula aceptora (feofitina) se convierten en agentes oxidantes, capaces de captar un electrón proveniente de la fotólisis del agua en el clúster de Mn_4Ca conocido también como el complejo dador de oxígeno (OEC por sus siglas en inglés). A su vez, la fotólisis del agua, libera O_2 molecular y protones (H^+) al lumen del tilacoide generando un gradiente de pH transtilacoidal. La conjugación entre moléculas dadoras yceptoras de electrones, permiten una serie de transformaciones electroquímicas redox en cadena, exergónicas y espontáneas porque van a favor del potencial redox, dando origen de esta forma a la cadena de transporte de electrones. La clave de este proceso es la existencia de estas clorofilas ubicadas en los centros

de reacción de los fotosistemas, capaces de absorber irreversiblemente un excitón, para convertirse en agentes altamente reductores y luego en agentes altamente oxidantes, permitiendo así el flujo de energía.

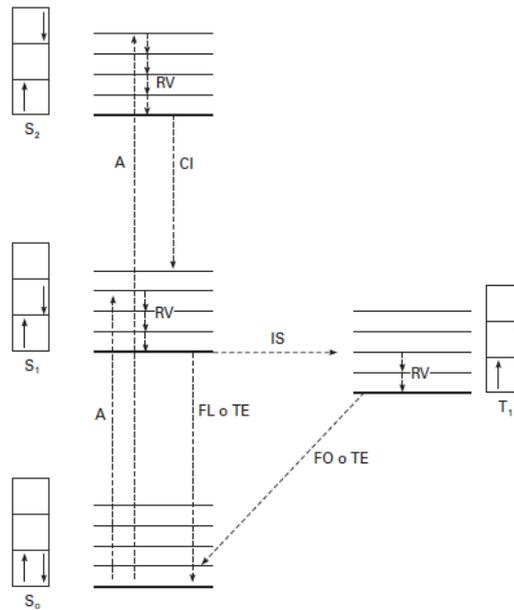


Figura 1.2. Representación de la configuración electrónica de un par de electrones periféricos de una molécula en su estado fundamental, de mínima energía (S₀), y de dos estados excitados consecutivos (S₁, S₂), de mayor contenido energético. Todos ellos son formas singlete, frente a la forma triplete (T₁), en la cual los electrones tienen el mismo espín. La energía absorbida (A) se libera mediante las transiciones RV, CI, FL, IS, FO, TE explicadas en el texto. Extraído de Azcón-Bieto y Talón (2008).

La cantidad de productos fotoquímicos obtenidos (como por ejemplo O₂) en función del número total de fotones absorbidos permite calcular la eficiencia cuántica de la fotosíntesis (Φ):

$$\Phi = \frac{\text{Número de productos fotoquímicos}}{\text{Número total de fotones absorbidos}}$$

A bajas intensidades lumínicas esta relación es de tipo lineal, pero a medida que aumenta la intensidad de flujo fotónico se produce una saturación de la etapa fotoquímica (Taiz y Zeiger, 2006). La eficiencia cuántica puede variar de 0 hasta 1.0 cuando cada fotón absorbido contribuye al proceso. En cloroplastos funcionales en

condiciones óptimas, el 97 % de los fotones absorbidos son utilizados en la etapa fotoquímica primaria, mientras que el 2,5 % son transformados en calor y 0,5 % son reemitidos como fluorescencia (González Moreno *et al.*, 2008). Si no ocurre la separación de carga en el centro de reacción, el 95-97 % de la energía absorbida se libera como calor y el 2,5-5.0 % restante en forma de fluorescencia. Cuando los centros de reacción absorben un excitón se dice que se encuentran momentáneamente “cerrados” hasta que recuperan su estado energético basal al recibir un electrón proveniente de la oxidación del agua (Kalaji *et al.*, 2016). Todas estas reacciones fotoelectroquímicas suceden coordinadas en el tiempo a velocidades muy rápidas, del orden de pico y nanosegundos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

4. Fotosíntesis en condiciones de alta radiación solar

La tasa fotosintética aumenta a medida que aumenta la intensidad lumínica. Sin embargo con valores de PDF superiores a $400 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ comienza a declinar progresivamente alcanzando la saturación entre los 500 y $1000 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Taiz *et al.*, 2014). Una vez alcanzado el punto de saturación incrementos en PDF no afectan la tasa fotosintética debido a la presencia de otros factores limitantes tales como el suministro de CO_2 , actividad de la enzima Rubisco o el metabolismo de triosas fosfato, produciéndose una acumulación de energía no utilizada. En la mayoría de las plantas, la fotosíntesis se satura a densidades de flujo fotónico inferiores a las que se encuentran sometidas.

El estrés lumínico o estrés por alta radiación solar resulta de un exceso de luz absorbida más allá de la utilizada en la fotosíntesis. El exceso de luz surge cuando la relación entre la densidad de flujo fotónico (PDF) y la fotosíntesis es alta. Esta

relación puede aumentar a medida que la PDF aumenta, o mediante la disminución de la fotosíntesis, como suele ocurrir en respuesta al estrés por frío o estrés hídrico (Demmig-Adams y Adams, 1992). Cuando las plantas se encuentran expuestas a un exceso de luz la eficiencia cuántica disminuye rápidamente (Fitter y Hay, 2002). Si el exceso de energía no es disipado puede causar grandes daños *fotoxidativos* en la estructura molecular del cloroplasto, con la consecuente inactivación del centro de reacción del PSII (Li *et al.*, 2009). Tanto la fotoprotección como la inactivación del PSII pueden ser cuantificadas al detectar la fluorescencia de la clorofila *a* emitida por el PSII (Fitter y Hay, 2002).

4.1. Disipación del exceso de energía lumínica a nivel de PSII

La energía lumínica absorbida puede ser destinada a la etapa fotoquímica ("*quenching*" fotoquímico, qP), o puede ser disipada en forma de calor ("*nonphotochemical quenching*" NPQ o qN) o mediante la emisión de fluorescencia. Estos tres procesos ocurren en forma simultánea, de tal forma que el aumento de uno de ellos implica la disminución del otro (Li *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2001; Demmig-Adams y Adams, 2006; González Moreno *et al.*, 2008). Estos procesos de disipación de energía suceden en todos los organismos fotosintéticos eucariontes y ayudan a proteger y regular la fotosíntesis en ambientes donde la absorción de energía lumínica excede su utilización. Según algunos autores el NPQ puede presentar tres componentes. El primer componente, predominante en plantas superiores, se denomina *quenching* energético o qE. Éste depende del gradiente de pH transtilacoidal y es rápidamente reversible (segundos a minutos) (Müller *et al.*, 2001). El segundo componente es el *quenching* transitorio o qT, el cual hace referencia a un desacoplamiento entre las proteínas del LHCII y el PSII, y se relaja en cuestión de minutos. En este "estado transitorio" las proteínas LHCII se fosforilan

y se redistribuyen lateralmente asociándose al PSI. Esta rápida reorganización reduce el tamaño de la antena y disminuye la emisión de fluorescencia, por lo que se considera un componente del NPQ (Müller *et al.*, 2001; Szabó *et al.*, 2005). Finalmente, el tercer componente es el *quenching* fotoinhibitorio o qI el cual se relaja lentamente (horas) pudiendo ser parcialmente irreversible. Este proceso está relacionado con el incremento de clorofila en estado triplete (a través del cruce intersistema) y su relajación mediante la formación de oxígeno singlete (1O_2) el cual es altamente reactivo y dañino. El qI está asociado al daño por alta intensidad lumínica y a procesos de fotoinhibición (Szabó *et al.*, 2005).

4.1.1. *Quenching* energético, qE

Cuando la absorción de la luz excede lo que puede ser utilizado en reacciones de asimilación de CO₂, se produce una rápida disminución del pH en el lumen tilacoidal a raíz de la transferencia de electrones lineal y del transporte cíclico alrededor del PSI (Johnson, 2011). Algunos estudios indican que la disminución del pH en lumen, también podría deberse a una disminución en la conductancia protónica a nivel de la ATPasa (Kanazawa y Kramer, 2002; Takizawa *et al.*, 2008). Este gradiente de pH activa rápidamente enzimas responsables de la interconversión de xantófilas (carotenoides oxigenados) en el conocido ciclo de las xantófilas o ciclo VAZ (Demmig-Adams y Adams, 1996; Müller *et al.*, 2001; Demmig-Adams y Adams, 2006). El ciclo de las xantófilas consiste básicamente en la depoxidación de la violaxantina en anteraxantina y luego en zeaxantina en condiciones de alta intensidad lumínica (Figura 1.3). Cuando la intensidad lumínica disminuye y el pH aumenta, el proceso es revertido. qE parece estar asociado preferentemente con un complejo de antena periférica del PSII, la proteína PsbS, perteneciente a la familia de las proteínas LCH (Li *et al.*, 2000; Niyogi *et al.*, 2005) la

cual tendría una función catalizadora al controlar cinéticamente el NPQ (Johnson y Ruban, 2010; Ruban *et al.*, 2012).

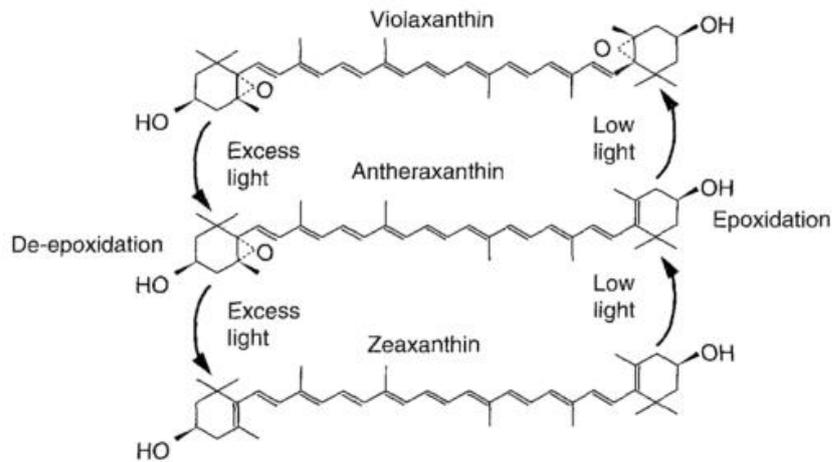


Figura.1.3 Esquema del ciclo de las xantófilas y su regulación por exceso o limitación de luz. La eliminación por etapas (de-epoxidación) de dos grupos epoxi en violaxantina da como resultado un alargamiento del sistema conjugado de dobles enlaces pasando de nueve a once dobles enlaces en zeaxantina. La des-epoxidación ocurre en minutos. La epoxidación ocurre en minutos u horas, pero puede llevar días bajo estrés adicional. Extraído de Demmig-Adams y Adams (1996).

El papel fotoprotector de las xantofilas a través de la disipación térmica en los procesos del NPQ ha sido ampliamente estudiado (Demmig-Adams y Adams, 1996; Niyogi *et al.*, 1998), sin embargo algunos autores hipotetizan además, del posible rol de la zeaxantina como antioxidante a través de la eliminación directa de especies reactivas del oxígeno (Havaux *et al.*, 2000; Havaux *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007).

4.2. Fotoinhibición

El término de fotoinhibición ha sido ampliamente debatido en los últimos años. A grandes rasgos describe el declive en la tasa fotosintética debido a la iluminación excesiva (Adir *et al.*, 2003). Cuando la energía lumínica no puede ser totalmente disipada de forma segura (a través de qP, NPQ o fluorescencia) puede producir grandes daños en el complejo del PSII. La fotoinhibición ocurre principalmente al inhibirse el transporte de electrones debido a un desbalance entre

el 'fotodaño' y la reparación de la estructura proteica (Murata *et al.*, 2007; Vass, 2012). Los principales mecanismos que inducen de forma directa o indirecta al *fotodaño* es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por un exceso de energía de excitación, y la formación de radicales oxidados (Tyr-Z^{••}, P680^{••}) debido a una insuficiencia en el flujo de electrones desde el complejo dador de electrones (el clúster de Mn₄Ca), sobre todo cuando las tasas de transporte de electrones son altas (Vass, 2012). El déficit en el flujo de electrones desde el complejo dador, está relacionado también con la inactivación del clúster de Mn₄Ca debido a la absorción de luz UV por los estados de valencia más altos de Mn, lo que conduce a la ruptura en la unión entre dos iones de Mn (Ruettinger *et al.*, 2000).

El blanco principal del *fotodaño* es la proteína D1 del PSII. Cuando esta proteína se ve afectada por la alta intensidad lumínica, es removida de la membrana tilacoidal y debe ser reemplazada por nuevas moléculas. Los otros componentes del PSII pueden ser reciclados sin ser removidos, por lo que la proteína D1 es la única que debe ser nuevamente sintetizada (Taiz *et al.*, 2014). El papel exacto de las ROS en la fotoinhibición no ha sido completamente aclarado. Por un lado, Hideg *et al.* (2007) observaron que las ROS causarían daño directamente a la estructura de la proteína D1 del PSII, mientras que Murata *et al.* (2007) proponen que las ROS contribuyen al *fotodaño* al inhibir la síntesis de nuevas proteínas D1 y la reparación del PSII.

La fotoinhibición debido a iluminación excesiva, no solo se observa en condiciones de alta intensidad de radiación solar, sino que es un fenómeno común ante diversos tipos de estrés abiótico. Todas las plantas absorben en algún momento más luz de la que pueden procesar, por lo que han desarrollado diversos mecanismos fotoprotectores.

4.3. Efecto de la radiación UV en el metabolismo fotosintético

La radiación UV representa una pequeña fracción del total de la radiación solar que llega a superficie terrestre. Sin embargo, en las últimas décadas, se han observado incrementos en el porcentaje de radiación UV recibida, principalmente debido a la disminución del espesor de la capa de ozono (Singh *et al.*, 2006; Lidon *et al.*, 2012). Cuando las condiciones meteorológicas favorecen la intensidad de radiación solar incidente, también se observa una mayor incidencia de radiación de tipo UV.

El efecto de la radiación UV en las plantas ha sido ampliamente estudiado. Este tipo de radiación, debido a su alta energía, genera daños a nivel molecular en las cadenas de ADN, ruptura y pérdida de funcionalidad de membranas, generación de radicales libres, e inhibición de numerosos procesos metabólicos como la fotosíntesis, absorción de nutrientes y síntesis de proteínas (Singh *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado que el daño de la radiación UV en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis está asociada a una reducción de la síntesis de pigmentos fotosintéticos y de proteínas estructurales del complejo antena del PSII (Fedina y Velitchkova, 2009; Lidon y Ramalho, 2011), y a la reducción del transporte de electrones debido a la inactivación del clúster de Mn₄Ca (Vass, 2012). Hakala-Yatkin *et al.* (2010) y Lidon y Ramalho (2011) registraron, además, reducciones en la eficiencia cuántica máxima del PSII a través del estudio de la fluorescencia de la clorofila. Por otro lado se han observado también alteraciones en la etapa de fijación de CO₂, debido a una disminución en síntesis de la enzimas ribulosa-1,5-bifosfato (Rubisco)(Takeuchi *et al.*, 2002) y a la reducción en la conductancia estomática afectando hasta un 80 % la tasa fotosintética (Lidon y Ramalho, 2011).

A pesar de los efectos deletéreos e inhibitorios, en los últimos años se ha enfocado el estudio del efecto de la radiación UV en la activación de mecanismos fotoprotectores y antioxidantes. Las plantas sufren varios cambios ante incrementos en la radiación UV, tales como la expresión de nuevos genes, síntesis de pigmentos que absorben los rayos ultravioletas (metabolitos secundarios) y síntesis de compuestos y enzimas antioxidantes (Singh *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2012; Hengari *et al.*, 2014; Klem *et al.*, 2015). Estos procesos combinados conducen a cambios morfológicos y, por lo tanto, las plantas serían capaces de tolerar situaciones de estrés (Singh *et al.*, 2006).

4.4. Efecto de la radiación infrarroja en el metabolismo fotosintético

La radiación infrarroja, también denominada radiación térmica, es la responsable del calor al hacer vibrar las moléculas. Altas intensidades de radiación solar implican alta intensidad de radiación infrarroja pudiendo someter a las plantas a condiciones de estrés térmico. Cuando las hojas interceptan una excesiva cantidad de radiación, su supervivencia dependerá de la disipación del calor mediante tres procesos principales: reflexión de la radiación, convección del exceso de calor y transpiración de agua (Fitter y Hay, 2002). Altas temperaturas foliares (>40 °C) en general se asocian al cierre estomático en respuesta a la sequía. La vegetación de climas áridos comúnmente experimenta una combinación de estrés hídrico, térmico y fotoquímico, dificultando la identificación del efecto individual de cada fenómeno en cultivos a campo (Fitter y Hay, 2002).

Temperaturas más altas que las óptimas reducen la fotosíntesis, aumentan la tasa de respiración y elevan la temperatura foliar. Por encima de 45 °C la mayoría de las plantas presentan daños irreversibles a la maquinaria fotosintética, mientras que entre 35 y 42 °C los efectos pueden ser reversibles (Zhang y Sharkey, 2009). La

inhibición de la fotosíntesis en condiciones de estrés térmico moderado (35-42 °C) es el resultado del daño a las membranas tilacoidales, afectando directamente a la etapa fotoquímica, y de la inactivación de la enzima Rubisco (Zhang y Sharkey, 2009). Además, el estrés térmico puede inhibir el complejo dador de oxígeno, desorganizar el clúster de Mn, estimular el flujo de electrones cíclico alrededor del PSI, estimular la reducción oscura de la plastoquinona y reducir la síntesis de pigmentos fotosintéticos entre otros (Sharkey, 2005; Zhang y Sharkey, 2009; Mathur *et al.*, 2014). La disminución de la actividad fotosintética implica una menor capacidad de disipar químicamente la energía lumínica potenciando aún más las condiciones de estrés por alta radiación.

5. Estudio de la etapa fotoquímica por fluorescencia de la clorofila *a*

El análisis de la fluorescencia de la clorofila *a* es una herramienta simple, no invasiva, no destructiva y rápida para estudiar la cadena de transporte de electrones fotosintética. Su medición proporciona información respecto al destino y la eficiencia en la utilización de la energía lumínica. Diversos factores ambientales afectan la función del PSII de manera directa o indirecta, modificando la emisión de fluorescencia, por lo que ha sido ampliamente difundida en el estudio de estrés abiótico (González Moreno *et al.*, 2008; Kalaji *et al.*, 2016).

Los primeros cambios en el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila se observaron por primera vez en 1960 por Kautsky y colaboradores (Stirbet y Govindjee, 2011). Ellos descubrieron que al exponer material fotosintético adaptado previamente a la oscuridad a una fuente de luz, se producía un rápido aumento en el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila durante un período de tiempo de alrededor de 1 segundo, seguido por una fase lenta de declive de la fluorescencia

durante varios minutos (Maxwell y Johnson, 2000). La "fase rápida" (designada O-J-I-P por cada una de sus inflexiones) está relacionada principalmente con eventos primarios del PSII. Por otro lado, la "fase lenta" (compuesta de las inflexiones P-S-M-T) está asociada principalmente con interacciones entre procesos de las membranas de los tilacoides y procesos metabólicos en el estroma del cloroplasto (González Moreno *et al.*, 2008).

A lo largo del tiempo se han desarrollado diversos instrumentales y protocolos para evaluar y estudiar las variaciones en la emisión de fluorescencia. Las metodologías más utilizadas son: (1) mediciones de la fluorescencia directa de la clorofila *a* representadas por la cinética en la fase rápida (Strasser *et al.*, 2000; Govindjee, 2004), y (2) fluorescencia modulada con el método del pulso saturante (PAM por sus siglas en inglés "pulse amplitude modulation", Brestic y Zivcak, 2013). En la presente tesis se estudió la etapa fotoquímica a través de la primera metodología.

5.1. Fluorescencia directa de la clorofila α : fase rápida, curva OJIP

Esta metodología se basa principalmente en el estudio de la cinética de la emisión de la fluorescencia en la fase rápida de la curva de Kautsky (curva OJIP) de una muestra fotosintética adaptada a la oscuridad, cuando es iluminada por un pulso de luz saturante. Cuando la intensidad de la fluorescencia emitida se grafica en función del logaritmo del tiempo, se observa una típica curva polifásica (Figura 1.4). La nomenclatura "OJIP" representa cuatro puntos importantes: O es la fluorescencia en el origen o fluorescencia basal (F_0); J e I representan dos puntos de inflexión a los 2 y 30 ms respectivamente; y P representa la fluorescencia máxima (F_m) la cual se produce aproximadamente luego de 1 s. El análisis de la curva OJIP a través del "JIP test" (Strasser *et al.*, 2000), el cual considera suposiciones teóricas y

probabilidades, deriva en diferentes parámetros fotosintéticos del estado y la eficiencia del sistema fotosintético de la muestra (Brestic y Zivcak, 2013; Kalaji *et al.*, 2014). Uno de los parámetros obtenidos más difundidos es la eficiencia cuántica máxima del PSII¹ (F_v/F_m), el cual se suele utilizar como un indicador de fotoinhibición y del estado de los complejos del PSII. En condiciones no estresantes su valor es de aproximadamente 0.88, mientras que en plantas en situación de estrés abiótico su valor se reduce marcadamente (Kalaji *et al.*, 2016). Para una mayor descripción de los parámetros obtenidos a través del *JIP test* ver Capítulo II. El estudio de la etapa fotoquímica a través de esta metodología en plantas de manzano se profundiza en el capítulo III de la presente tesis.

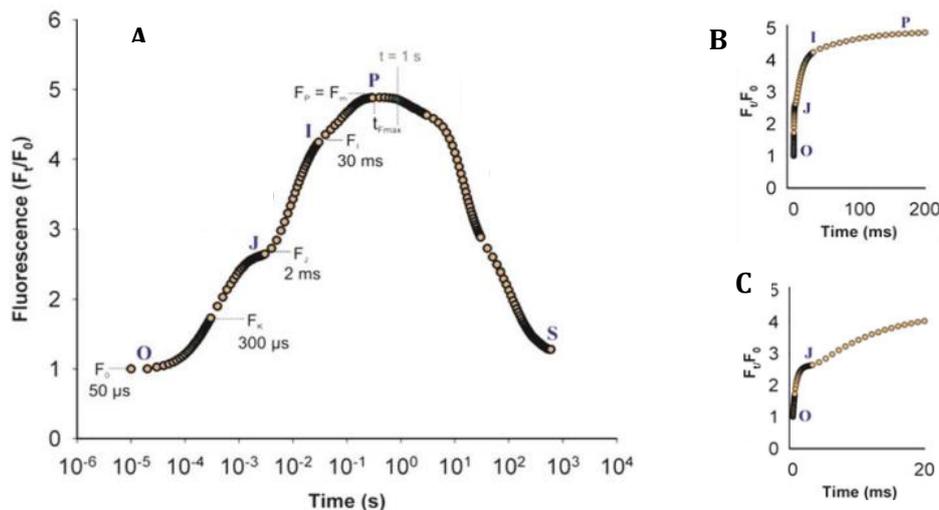


Figura 1.4. Curva OJIP típica, observada luego de la iluminación de una muestra fotosintética adaptada a la oscuridad, graficada en función del logaritmo del tiempo (A) y en función del tiempo en escala regular (B y C). Los valores de fluorescencia están expresados como F_t/F_0 , donde F_t es la intensidad de fluorescencia en cada intervalo de tiempo y F_0 representa la fluorescencia basal a los 50 ms. Extraído de Brestic y Zivcak (2013).

¹ La eficiencia cuántica máxima del PSII, F_v/F_m , se puede obtener tanto a través del estudio de la curva OJIP, como a través de la metodología PAM.

6. Estrés fotooxidativo

Uno de los efectos más dañinos del estrés abiótico en las plantas es el estrés oxidativo, el cual se caracteriza por la acumulación en los tejidos de especies reactivas de oxígeno (ROS) potencialmente dañinas. La generación de ROS dependiente de la luz se denomina *estrés fotooxidativo* (Foyer *et al.*, 1994). El estrés fotooxidativo en las plantas es inducido principalmente por la absorción de un exceso de energía de excitación que conduce a la sobrerreducción de las cadenas de transporte de electrones (Reddy y Raghavendra, 2006).

6.1. Especies reactivas de oxígeno

Las ROS son subproductos inevitables del metabolismo celular que normalmente se originan en los organismos aeróbicos a través de las reacciones de oxido-reducción. Son formas parcialmente reducidas de oxígeno producidas en los procesos vitales como la fotosíntesis, respiración y fotorrespiración (Mittler, 2002). En condiciones normales, la producción y remoción de ROS está bien regulada por el metabolismo celular, pero cuando este equilibrio sufre un desbalance, la acumulación de ROS puede causar grandes daños en los tejidos (Asada, 2006).

En condiciones de alta intensidad lumínica, las altas tasas de transporte de electrones operan en un ambiente rico en O_2 y la posible fuga del exceso de electrones conduce a la formación de ROS en los cloroplastos (Reddy y Raghavendra, 2006). Durante el proceso de la fotosíntesis se requieren cuatro electrones para la total reducción del O_2 . Las ROS generalmente resultan de la transferencia de uno, dos o tres electrones a la molécula de O_2 produciendo superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\bullet}) respectivamente. Otra ROS muy dañina es el oxígeno singlete (O_2^1) el cual resulta de la excitación de los electrones del oxígeno basal (Mittler, 2002).

Las ROS se producen en varios compartimentos celulares como la mitocondria, peroxisomas, glioxisomas, pared celular, membrana plasmática y apoplasto. Sin embargo, los cloroplastos serían el principal sitio de producción de ROS en condiciones de alta intensidad lumínica (Tabla 1.1).

Fuentes de producción de ROS durante la etapa fotoquímica:

- El $O_2^{\bullet-}$ se puede generar a partir de la reducción del O_2 por la ferredoxina y los clústeres hierro-sulfurosos (2Fe-2S y 4Fe-4S) en el PSI en lo que se conoce como reacción de Mehler. En el PSII, los sitios Q_A y Q_B también son fuentes potenciales de $O_2^{\bullet-}$ (Zhang *et al.*, 2003; Reddy y Raghavendra, 2006).
- El H_2O_2 puede ser producto de la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) presente en la membrana tilacoidal y en la matriz del cloroplasto. Además, la foto-inactivación o modificación del clúster de Mn por altas intensidades lumínicas puede conducir a una oxidación incompleta del agua dando como resultado H_2O_2 (Vass, 2012).
- El HO^{\bullet} se produce en presencia de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en una reacción catalizada por iones de metales de transición, como hierro y cobre. Estas reacciones se las conoce como reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Perl-Treves y Perl, 2002).
- El O_2^1 se genera en el PSII, mediante la transferencia de energía de excitación desde la clorofila triplete al oxígeno molecular. La clorofila triplete se puede formar por el cruce intersistemas de la clorofila singlete en el complejo de antenas PSII o por la recombinación de carga del par de radicales primarios [P680 + Pheo-] en el centro de reacción del PSII (Pospíšil, 2012).

Tabla 1.1. Especies reactivas de oxígeno producto del estrés fotooxidativo en cloroplastos, mecanismo de producción y agente antioxidante interviniente es su remoción (Mittler, 2002; Perl-Treves y Perl, 2002; Asada, 2006; Reddy y Raghavendra, 2006; Pospíšil, 2012).

Especie reactiva de oxígeno (ROS)		Mecanismo de producción	Remoción
Oxígeno singlete	O_2^1	Antena y centro de reacción del PSII	Carotenoides α -tocoferol
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Reacción de Mehler PSI y Q_A y Q_B en PSII	Superóxido dismutasa (SOD) Peroxidasas
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Dismutación del $O_2^{\bullet-}$ por medio de la SOD, modificación clúster Mn	Ascorbato peroxidasa (APX), Catalasa Ácido ascórbico Glutatión
Radical hidroxilo	HO^{\bullet}	Reacción de Fenton y de Haber-Weiss	-

6.2. Daños por estrés fotooxidativo

Las ROS son altamente citotóxicas y pueden reaccionar con biomoléculas vitales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, causando peroxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas y mutación de ADN respectivamente (Asada, 2006). Además, el $O_2^{\bullet-}$ y O_2^1 generan la destrucción de la clorofila y de proteínas D1 en el PSII. El H_2O_2 , si bien no es altamente reactivo, puede dañar las enzimas del ciclo de Calvin, el enlace cruzado entre las proteínas D1-D2 del PSII, y el clúster de Mn en el PSII (Niyogi, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Reddy y Raghavendra, 2006). El HO^{\bullet} es altamente reactivo, de corta vida y se transforma rápidamente produciendo daño general en todas las organelas celulares (Perl-Treves y Perl, 2002).

Las membranas son uno de los principales sitios de daño en las células y organelas debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados como los fosfolípidos. El ataque de ROS a este tipo de moléculas produce peróxidos lipídicos,

alterando su estructura hidrofílica. Las membranas biológicas aumentan su permeabilidad y pierden su funcionalidad. En los tejidos fotosintéticos se observa una primera respuesta con un aumento en la pérdida de electrolitos, seguido por una caída en la fotosíntesis por destrucción de la estructura tilacoidal. La determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) como producto secundario de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, permite estimar el nivel de daño oxidativo en los tejidos afectados (Hodges *et al.*, 1999).

Generalmente el estrés fotooxidativo se refleja, en una primera instancia, con la *fotoinactivación* del aparato fotosintético a nivel del PSII, y disminución de la función fotosintética la cual es referida como *fotoinhibición del PSII* por degradación de la proteína D1 (Reddy y Raghavendra, 2006). Si esta situación no es revertida se produce una gran acumulación de ROS, peroxidación de lípidos de membrana y un daño generalizado a nivel molecular. En casos extremos, los síntomas del estrés fotooxidativo son visibles, y se pueden observar con la aparición de un blanqueado, clorosis o necrosis en la epidermis de hojas y frutos (Havaux y Niyogi, 1999; Perl-Treves y Perl, 2002; Felicetti y Schrader, 2008; Racskó *et al.*, 2010; Racskó y Schrader, 2012; Muñoz y Munné-Bosch, 2018).

6.3. Remoción de ROS

Tal como se mencionó previamente la producción y remoción de ROS es producto del metabolismo normal en todos los organismos aeróbicos. El sistema de defensa antioxidante, para la detoxificación de ROS, es amplio y proporciona protección contra el daño oxidativo. En la tabla 1.1 se pueden observar las sustancias antioxidantes intervinientes en la remoción de las ROS. En el caso del HO• no se conoce antioxidante específico, al ser muy reactivo su vida es muy corta oxidando rápidamente cualquier molécula a su alrededor (Perl-Treves y Perl, 2002).

6.3.1. Sistema antioxidante enzimático

Los principales mecanismos enzimáticos antioxidantes en cloroplastos son el ciclo Agua-Agua (Asada, 1999) y el ciclo del ascorbato-glutati6n (Mittler, 2002) (Figura 1.5). Las enzimas m1s importantes, que intervienen en ambos procesos son las enzimas super6xido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX). La SOD, presente adem1s en casi todos los compartimentos celulares, act1a como primera l1nea de defensa al convertir $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Luego la enzima APX, detoxifica el H_2O_2 dando como producto final H_2O (Mittler, 2002). El ciclo del ascorbato-glutati6n, denominado tambi6n ruta de Halliwell-Asada, implica adem1s otras enzimas como dehidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR) y glutati6n reductasa (GR) (Azc6n-Bieto y Tal6n, 2008).

Existen otros mecanismos antioxidantes importantes en la remoci6n de ROS como el ciclo de la glutati6n peroxidasa, presente en citosol, mitocondrias y plastidios y la v1a de las catalasas (CAT) importante en peroxisomas (Mittler, 2002). La CAT es una enzima tipo peroxidasa que cataliza la conversi6n de H_2O_2 en agua y ox1geno molecular. En el estroma del cloroplasto, no se ha encontrado CAT. Sin embargo, se ha proporcionado varias l1neas de evidencia que el H_2O_2 ser1a eliminado por los complejos de manganeso y una hemo-catalasa unida a la membrana del tilacoide en las proximidades del PSII del lado lumenal (Asada, 2006; Posp1sil, 2012).

Para la s1ntesis y actividad de estas enzimas se requiere de distintos cofactores enzim1ticos como cobre, cinc, manganeso o hierro en el caso de la SOD y hierro o manganeso en el caso de la CAT y de la APX (Broadley *et al.*, 2012). En numerosos estudios se han registrado variaciones en las actividades de estas enzimas antioxidantes a trav6s del agregado de micronutrientes o en condiciones de deficiencias nutricionales (Cakmak *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 2002a; Kaur *et al.*,

2009; Pandey *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011; Weisany *et al.*, 2011; Bharti *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017)

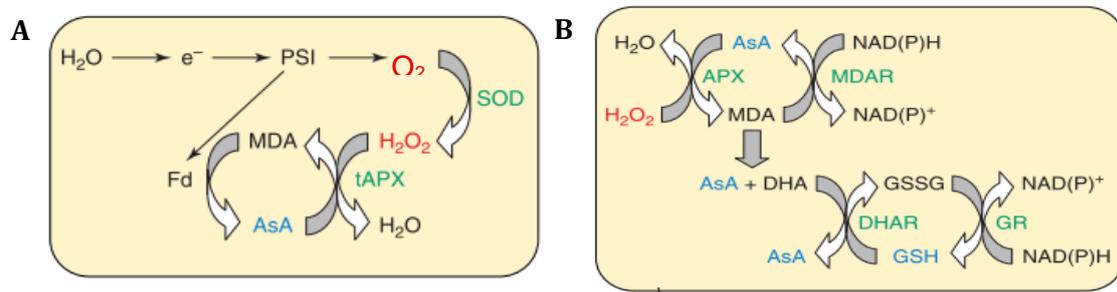


Figura 1.5. Mecanismos enzimáticos de remoción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cloroplastos (a) ciclo agua-agua y (b) ciclo de ascorbato-glutatión. En ambos casos la enzima superóxido dismutasa (SOD) actúa como primera línea de defensa convirtiendo O_2^- en H_2O_2 . Luego la enzima ascorbato peroxidasa (APX) convierte H_2O_2 en H_2O . La APX requiere de ascorbato (AsA) para regenerarse. Estos ciclos necesitan electrones que puede ser donados directamente del aparato fotosintético (a) o del NAD(P)H como poder reductor (b). Las ROS están indicadas en rojo, los compuestos antioxidantes en azul y las enzimas antioxidantes en verde. Abreviaturas: PSI, fotosistema I; MDA, monodehidroascorbato; MDAR, monodehidroascorbato reductasa; Fd, ferredoxina; DHA, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato reductasa; GSSH, glutatión oxidado; GSH, glutatión regenerado cíclicamente, GR, glutatión reductasa. Extraído de Mittler (2002).

6.3.2. Sistema antioxidante no enzimático

Los mecanismos antioxidantes no enzimáticos involucran sustancias necesarias para la regeneración de la actividad enzimática, tales como ascorbato (AsA) y glutatión (GSH), y sustancias capaces de secuestrar ROS. Los carotenoides (neoxantina, zeaxantina y β -caroteno) y prenilquinonas (α -tocoferol, plastoquinol) poseen una actividad antioxidante importante en el PSII al eliminar el efecto perjudicial del O_2^1 . La remoción del O_2^1 puede ser por transferencia de energía de excitación (carotenoides) o por la transferencia de electrones (prenilquinonas) modificando su estructura irreversiblemente por lo que deben ser constantemente regenerados (Niyogi, 1999; Pospíšil, 2012). Los compuestos fenólicos también poseen actividad antioxidante al secuestrar ROS. Su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones (Sang *et al.*, 2002). Los diversos agentes

antioxidantes poseen funciones parcialmente superpuestas y pueden compensarse funcionalmente entre sí.

7. Mecanismos de fotoprotección

Los organismos fotosintéticos han desarrollado múltiples mecanismos fotoprotectores para hacer frente a los efectos potencialmente dañinos de la luz (Niyogi, 1999; Takahashi y Badger, 2011). El desequilibrio entre la absorción y utilización de la luz conlleva a la generación inevitable de ROS y consecuentemente a la fotoinhibición.

Algunos de los mecanismo de fotoprotección implican evitar la absorción de luz excesiva mediante el movimiento de las hojas y los cloroplastos (Kasahara *et al.*, 2002). La síntesis de sustancias que actúan como pantallas solares, como las antocianinas y flavonoides, también disminuyen la absorción de energía de excitación (Gould *et al.*, 2010).

Cuando la energía absorbida supera lo que puede ser utilizado en la etapa fotoquímica, el exceso de energía debe ser disipado a través de mecanismos como el qE a nivel del PSII (descrito previamente en inciso 4.1.1) el cual puede implicar una reorganización de los complejo antena LHCII y el PSII en la membrana tilacoidal (Johnson *et al.*, 2011). El flujo de electrones cíclico (CEF) alrededor del PSI (Shikanai, 2007) y la ruta de la fotorrespiración (Takahashi *et al.*, 2007; Taiz *et al.*, 2014) también contribuyen a la disipación del exceso de energía. Si la energía no es disipada, incrementa la formación de ROS. En esta instancia son los mecanismos antioxidantes los encargados de secuestrar las ROS para atenuar el daño fotoxidativo. En general las plantas ponen en funcionamiento varios de estos mecanismos en forma simultánea para evitar o disminuir el estrés fotoxidativo.

8. Rol de algunos nutrientes en el estrés fotooxidativo

En todos los procesos metabólicos de las plantas la participación de los nutrientes minerales es esencial. Su carencia afecta el funcionamiento normal de la planta, y puede incrementar su susceptibilidad a los factores estresantes. En estudios previos, se ha citado que deficiencias de Mg y de Zn, incrementan el daño fotooxidativo en las plantas expuestas a alta intensidad lumínica (Marschner y Cakmak, 1989; Cakmak, 2000; El-Abdin Abdel-Kader, 2004; Cakmak y Kirkby, 2008; Frei *et al.*, 2010).

8.1. Importancia del magnesio en la disipación de la energía

Además de la función del Mg como átomo central de la clorofila, participa en la activación de diversas enzimas metabólicas, como la H⁺-ATPasa y ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, y en la exportación floemática de fotosintatos (Cakmak y Kirkby, 2008). Estas funciones lo hacen imprescindible para la normal disipación de la energía lumínica a través de la fotosíntesis. Se ha observado que deficiencias de Mg restringen la fijación de CO₂, produciendo un deterioro en el transporte de electrones en las membranas tilacoidales, generando una acumulación de energía y electrones no utilizados e incrementando la susceptibilidad al estrés fotooxidativo (Hermans y Verbruggen, 2005; Verbruggen y Hermans, 2013). Además, plantas deficientes en Mg incrementaron la capacidad antioxidante en las hojas, sugiriendo que la generación de ROS es estimulada por la deficiencia de Mg en cloroplastos (Cakmak y Marschner, 1992; Anza y Riga, 2001; Candan y Tarhan, 2003; Abdel-Kader, 2004; Kumar Tewari *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012; Meireles da Silva *et al.*, 2014).

Plantas deficientes en Mg son muy susceptibles a la alta intensidad lumínica (Cakmak y Kirkby, 2008; Cakmak y Yazici, 2010). Su exposición a la luz induce

rápidamente la aparición de clorosis y necrosis foliar (Marschner y Cakmak, 1989). Diversos estudios indican que el estrés fotooxidativo contribuye al desarrollo de la clorosis de las hojas deficientes de Mg, sugiriendo que las plantas bajo condiciones de alta intensidad lumínica tienen una mayor necesidad fisiológica de Mg (Cakmak y Kirkby, 2008). El efecto del contenido de Mg en plantas de manzano en condiciones de alta intensidad lumínica es discutido con mayor profundidad en el Capítulo IV.

8.2. Importancia del cinc en la actividad antioxidante

El Zn se considera un nutriente esencial por ser constituyente estructural o cofactor regulador de una amplia gama de enzimas y proteínas en muchas vías bioquímicas (Broadley *et al.*, 2012). Su deficiencia puede inhibir la actividad de varias enzimas del sistema antioxidante, lo que resulta en daño oxidativo extensivo a lípidos de membrana, proteínas, clorofila y ácidos nucleicos (Cakmak, 2000; Hacisalihoglu *et al.*, 2003).

En general se ha reportado que deficiencias de Zn disminuye la actividad de la enzima SOD, la capacidad antioxidante, el contenido de los pigmentos fotosintéticos, el crecimiento de las plantas y rendimiento de los cultivos, e incrementa el daño peroxidativo de membranas y la concentración de H₂O₂ (Cakmak *et al.*, 1997; Wang y Jin, 2005; Kösesakal y Ünal, 2009; Pandey *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011).

Según Cakmak (2000) las hojas deficientes de Zn son dañadas por fotooxidación en los cloroplastos y rápidamente se vuelven cloróticas y necróticas cuando son expuestas a alta intensidad lumínica, como resultado de la alteración de la fijación fotosintética de CO₂ y la actividad reducida de la enzima SOD. Esta hipótesis fue probada por Frei *et al.* (2010), demostrando que una mayor acumulación de antioxidantes en las hojas redujo los síntomas de bronceado foliar (Lee *et al.*, 2017).

El efecto del contenido de Zn en plantas de manzano en condiciones de alta intensidad lumínica es discutido con mayor profundidad en el Capítulo V.

9. Estrés por alta radiación solar en plantas de manzano (*Malus domestica* Borkh.)

9.1. Cultivo de manzano en los valles de la Norpatagonia

En Argentina, el 90 % de la fruta de pepita se produce en los valles irrigados de la Norpatagonia. Con un volumen aproximado de 950 mil toneladas por año, el 59 % de la manzana (*Malus domestica* Borkh.) se destina a consumo en fresco (34 % mercado interno y 25 % exportación) y el 41 % restante a la industria (MHyFP, 2016). El destino de la fruta está fuertemente condicionado por los estándares de calidad alcanzados. La manifestación de daños, originados durante el crecimiento o la conservación, reducen la calidad de los frutos limitando su destino.

El cultivo de manzana en esta región presenta características agroecológicas particulares. Los principales cultivares encontrados son Red Delicious (61,8 %), Gala (14,7 %), Granny Smith (14,4 %) y Cripp's Pink (4,5 %)(Senasa, 2016). En general las plantas son conducidas en espaldera, con densidades de plantaciones medias a altas (1000 a 1250 plantas/ha). Las necesidades hídricas del cultivo varían entre 880 y 1.000 mm anuales, los cuales son aportados mediante riego de tipo gravitacional o presurizado. El ciclo productivo se lleva a cabo durante los meses de primavera-verano, y requiere de diversas labores culturales tales como poda, raleo, fertilizaciones, control de plagas y enfermedades, y culmina con la cosecha de los frutos.

El clima en la región del Alto Valle de Río Negro se caracteriza según Thornthwait como árido a semiárido (Rodríguez y Muñoz, 2006). La zona se

caracteriza por tener una alta radiación solar global durante los meses estivales con valores por encima de los 800 W m^{-2} . La temperatura media anual es de 15°C , siendo el mes más caluroso enero con temperaturas medias de 24°C y máximas medias de 31°C . Estas condiciones de alta radiación solar y elevada temperatura durante los meses estivales, someten al cultivo a situaciones de estrés abiótico, con la consecuente pérdida de calidad de los frutos por daño por sol o “asoleado”. Estudios realizados en la zona han reportado hasta 40 % de frutos con daño de asoleado generando grandes pérdidas económicas (Colavita, 2004; Raffo Benegas y Rodríguez, 2007).

9.2. Asoleado de frutos de manzano

El asoleado es un desorden fisiológico, observado en manzanas y otras especies de frutas, causado por altas densidades de flujo de radiación solar. El exceso de radiación solar puede tener un efecto directo, por exposición a alta intensidad lumínica, o indirecto por el aumento de la temperatura superficial del fruto, generando en ambos casos daños de tipo oxidativo en los tejidos epidérmicos (Racskó y Schrader, 2012). Este tipo de desorden ocurre prácticamente en todas las regiones productoras de manzana del mundo, causando pérdidas severas en los cultivos cada año.

El asoleado afecta la epidermis de los frutos generando cambios a nivel estructural y morfológico, alterando la composición de pigmentos y la fotosíntesis. La epidermis de los frutos afectados presenta una decoloración, amarillamiento o muerte celular. Según la intensidad y el origen del daño se ha establecido tres tipos de síntomas en frutos: (a) necrosis; (b) bronceado; (c) y blanqueado fotooxidativo (Felicetti y Schrader, 2008) (Figura 1.6). En hojas de manzano también se han

documentado dos tipos de daño por sol: (a) amarillamiento y (b) bronceado (Racskó, 2010).



Figura 1.6. Tipos de daño por asoleado en frutos de manzano (*Malus domestica* Borkh.): necrosis (A, cultivar Cripp's Pink), bronceado (B, cultivar Honeycrisp) y blanqueado fotooxidativo (C, cultivar Golden Delicious). Imágenes extraídas de Racskó y Schrader (2012).

Ha sido ampliamente demostrado que el asoleado resulta de la generación de ROS intracelular (Chen *et al.*, 2008), siendo las fuentes más probables las reacciones fotosintéticas, la respiración y la actividad de enzimas como peroxidasas y oxidasas (Racskó y Schrader, 2012). Los frutos desarrollan múltiples mecanismos fisiológicos y bioquímicos como fotoprotección para minimizar el daño, tales como pigmentos fotoprotectores, enzimas y metabolitos antioxidantes, proteínas de choque térmico y el ciclo de la xantofila (Ma y Cheng, 2004; Li y Cheng, 2008; Chen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Bi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Estos mecanismos actúan en simultáneo para mitigar el daño, pero a menudo son inadecuados en condiciones de campo para protegerse completamente de las quemaduras solares. Así el hecho de que la piel de la fruta afectada tenga concentraciones más altas de malondialdehído (MDA) indica que el sistema antioxidante, a pesar del aumento de la actividad de las enzimas y metabolitos antioxidantes, no puede hacer frente al estrés fotooxidativo (Chen *et al.*, 2008).

La incidencia del asoleado está condicionada por múltiples factores ambientales, varietales y culturales. Además plantas sometidas a otros tipos de estrés abiótico como el déficit hídrico y nutricional serían más susceptibles a desarrollar esta fisiopatía (Racskó y Schrader, 2012; Makedredza *et al.*, 2013). Existen estudios y reportes de daño por asoleado en manzano que se remontan a principios del siglo XIX (Racskó y Schrader, 2012), sin embargo existe escasa bibliografía sobre en la relación entre el status nutricional de la planta de manzano y el asoleado.

10. Fundamentación del estudio

El adecuado funcionamiento de la etapa fotoquímica de la fotosíntesis es indispensable para disipar la energía lumínica y reducir posibles excesos de energía de excitación potencialmente dañina. Tanto las hojas como los frutos de plantas de manzano ubicados en el exterior de la canopia crecen expuestos a condiciones de alta radiación solar, y el funcionamiento de esta primera etapa fotosintética podría verse afectado por excesos de energía lumínica y consecuentemente presentar un mayor riesgo al daño fotooxidativo.

Al aliviar los efectos del estrés por alta radiación solar, la reducción de la producción de ROS puede ser tan importante como tener un sistema antioxidante activo (Mittler, 2002). Se cree que mantener un elevado estatus nutricional es esencial para evitar el estrés fotooxidativo (Cakmak y Kirkby, 2008), al favorecer el incremento de la capacidad fotosintetizadora de la planta y de los procesos de disipación de energía. Asegurar el estatus nutricional magnésico y de micronutrientes en plantas en condiciones de alta intensidad lumínica, parecería ser indispensable si se pretende mitigar efectos negativos del estrés fotooxidativo

manteniendo la capacidad de altos rendimientos productivos y la calidad de los frutos.

A través de esta tesis se plantea estudiar el funcionamiento de la etapa fotoquímica en hojas y frutos de manzano, y analizar el efecto de un adecuado estatus nutricional de magnesio y cinc en las plantas de manzano, sobre la reducción del estrés fotooxidativo, ya sea incrementando la disipación de energía o el sistema antioxidante. Para ello se determinaron distintos objetivos e hipótesis, desarrollados a lo largo de tres capítulos y un capítulo final de discusión general.

Objetivo general

Estudiar el efecto de la alta radiación solar en plantas de manzano (*Malus domestica* Borkh.), analizar el daño fotooxidativo en hojas y frutos, y evaluar la influencia del estatus nutricional de magnesio y cinc en la reducción del estrés.

Objetivos específicos

- 1) Analizar el proceso de fotoquímica en hojas y frutos de manzana bajo distinta condición de exposición a alta radiación solar, y su relación con el estado fotooxidativo de los mismos. Analizar si el desarrollo de los frutos afecta su capacidad de procesar químicamente la luz.
- 2) Determinar la influencia del estatus nutricional magnésico de las plantas de manzano en el estrés fotooxidativo de hojas y frutos, analizar la capacidad de disipar la energía a través de la fotosíntesis y evaluar el asoleado de los frutos.
- 3) Determinar el efecto de aplicaciones foliares de Zn en el estrés fotooxidativo y la respuesta antioxidante en hojas y frutos de plantas de manzano en condiciones de alta radiación solar.

Diagrama de la tesis

En el Capítulo II se describe detalladamente el área de estudio y las metodologías utilizadas en los ensayos. En el Capítulo III se aborda la etapa fotoquímica de la fotosíntesis a través de la fluorescencia directa de la clorofila *a* y el análisis de datos por medio del *JIP test* (Strasser *et al.*, 2004) en hojas y frutos de manzano. En el Capítulo IV se estudió el efecto de dos niveles nutricionales de Mg en hojas de manzano expuestas a alta radiación solar en su capacidad de procesar químicamente la luz a través de la fotosíntesis y su estado fotooxidativo. Además, se analizó si el nivel de magnesio tiene efecto en el estrés fotooxidativo de los frutos y en los niveles de asoleado. En el Capítulo V se evaluó el efecto de aplicaciones foliares de cinc en el estrés fotooxidativo y la capacidad antioxidante. Finalmente, en el Capítulo VI se sintetizan y se discuten los resultados generales obtenidos en esta tesis.

11. Referencias

- Abdel-Kader DZE-A (2004) Protective systems against active oxygen species in Spinach: response to high light stress and Mg-deficiency. *Egypt J Biol* 6: 62–71
- Adir N, Zer H, Shochat S, Ohad I (2003) Photoinhibition - A historical perspective. *Photosynth Res* 76: 343–370
- Anza M, Riga P (2001) Effect of magnesium deficiency in antioxidant enzymes from pepper plants (*Capsicum annum* L.). *Acta Hort* 559: 365–370
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391–396
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Biol* 50: 601–639
- Azcón-Bieto J, Talón M (2008) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid
- Bharti K, Pandey N, Shankhdhar D, Srivastava PC, Shankhdhar SC (2014) Effect of different zinc levels on activity of superoxide dismutases & acid phosphatases and organic acid exudation on wheat genotypes. *Physiol Mol Biol Plants* 20: 41–48
- Bi X, Zhang J, Chen C, Li P, Ma F (2014) Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. *Food Chem* 152: 205–209
- Brestic M, Zivcak M (2013) PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in plants: protocols and applications. *In* GR Rout, AB Das, eds, *Mol. Stress Physiol. Plants*. Springer India, India, pp 87–131
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F (2012) *Function of Nutrients* :

- Micronutrients. In P Marschner, ed, Marschner's Miner. Nutr. High. Plants, Third-20. Elsevier Ltd, USA, pp 191–248
- Cakmak I (2000) Tansley Review No.111: Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 146: 185–205
- Cakmak I, Kirkby EA (2008) Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. *Physiol Plant* 133: 692–704
- Cakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol* 98: 1222–1227
- Cakmak I, Öztürk L, Eker S, Torun B, Kalfa HI, Yilmaz A (1997) Concentration of zinc and activity of copper/zinc-superoxide dismutase in leaves of rye and wheat cultivars differing in sensitivity to zinc deficiency. *J Plant Physiol* 151: 91–95
- Cakmak I, Yazici AM (2010) Magnesium: A Forgotten Element in Crop Production. *Better Crop* 94: 23–25
- Candan N, Tarhan L (2003) Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg²⁺ deficiency in the *Mentha pulegium* leaves. *Plant Physiol Biochem* 41: 35–40
- Chen C, Li H, Di Z, Li P, Ma F (2013) The role of anthocyanin in photoprotection and its relationship with the xanthophyll cycle and the antioxidant system in apple peel depends on the light conditions. *Physiol Plant* 149: 354–366
- Chen C, Zhang D, Li P, Ma F (2012) Partitioning of absorbed light energy differed between the sun-exposed side and the shaded side of apple fruits under high light conditions. *Plant Physiol Biochem* 60: 12–17
- Chen L-S, Li P, Cheng L (2008) Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta* 228: 745–756
- Colavita GM (2004) Informe: Incidencia de daño por asoleado en frutos de Manzanas - Evaluación preliminar Secretaria de Fruticultura de Río Negro. Anexo Circ N° 40-04 CAFI 1–14
- Demmig-Adams B, Adams WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599–626
- Demmig-Adams B, Adams WW (2006) Photoprotection in an ecological context: The remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol* 172: 11–21
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1: 21–26
- Fedina IS, Velitchkova MY (2009) Physiological Responses of Higher Plants to UV-B Radiation. In SN Singh, ed, *Clim. Chang. Crop. Environ. Sci. Eng.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 283–305
- Felicetti DA, Schrader LE (2008) Changes in pigment concentrations associated with the degree of sunburn browning of “Fuji” apple. *J Am Soc Hortic Sci* 133: 27–34
- Fitter A, Hay R (2002) *Environmental physiology of plants*, Third edit. Academic Press, London, UK
- Foyer CH, Leiadais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 92: 696–717
- Frei M, Wang Y, Ismail AM, Wissuwa M (2010) Biochemical factors conferring shoot tolerance to oxidative stress in rice grown in low zinc soil. *Funct Plant Biol* 37: 74–84
- González Moreno S, Perales Vela H, Salcedo Alvarez MO (2008) La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev Educ Bioquímica* 27: 119–129
- Gould KS, Dudle DA, Neufeld HS (2010) Why some stems are red: Cauline anthocyanins

- shield photosystem II against high light stress. *J Exp Bot* 61: 2707–2717
- Govindjee (2004) Chlorophyll a Fluorescence: A Bit of Basics and History. In GC Papageorgious, Govindjee, eds, *Chlorophyll a Fluoresc. A Signat. Photosynth.* Vol 19. *Adv. Photosynth. ans Respir.* Springer, Netherlands, p 861
- Gupta B, Pathak GC, Pandey N (2011) Induction of oxidative stress and antioxidant responses in *Vigna mungo* by zinc stress. *Russ J Plant Physiol* 58: 85–91
- Hacisalihoglu G, Hart JJ, Wang Y-H, Cakmak I, Kochian L V (2003) Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat. *Plant Physiol* 131: 595–602
- Hakala-Yatkin M, Mntysaari M, Mattila H, Tyystjärvi E (2010) Contributions of visible and Ultraviolet parts of sunlight to photoinhibition. *Plant Cell Physiol* 51: 1745–1753
- Havaux M, Bonfils J-P, Lütz C, Niyogi KK (2000) Photodamage of the Photosynthetic Apparatus and Its Dependence on the Leaf Developmental Stage in the *npq1* Arabidopsis Mutant Deficient in the Xanthophyll Cycle Enzyme Violaxanthin De-epoxidase. *Plant Physiol* 124: 273–284
- Havaux M, Dall'Osto L, Bassi R (2007) Zeaxanthin Has Enhanced Antioxidant Capacity with Respect to All Other Xanthophylls in Arabidopsis Leaves and Functions Independent of Binding to PSII Antennae. *Plant Physiol* 145: 1506–1520
- Havaux M, Niyogi KK (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 96: 8762–8767
- Hengari S, Theron KI, Midgley SJE, Steyn WJ (2014) The effect of high UV-B dosage on apple fruit photosystems at different fruit maturity stages. *Sci Hortic (Amsterdam)* 170: 103–114
- Hermans C, Verbruggen N (2005) Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 56: 2153–2161
- Hideg É, Kós PB, Vass I (2007) Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiol Plant* 131: 33–40
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604–611
- Johnson GN (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1807: 906–911
- Johnson MP, Goral TK, Duffy CDP, Brain APR, Mullineaux CW, Ruban A V. (2011) Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. *Plant Cell* 23: 1468–1479
- Johnson MP, Havaux M, Triantaphylidès C, Ksas B, Pascal AA, Robert B, Davison PA, Ruban A V., Horton P (2007) Elevated zeaxanthin bound to oligomeric LHCII enhances the resistance of Arabidopsis to photooxidative stress by a lipid-protective, antioxidant mechanism. *J Biol Chem* 282: 22605–22618
- Johnson MP, Ruban A V. (2010) Arabidopsis plants lacking PsbS protein possess photoprotective energy dissipation. *Plant J* 61: 283–289
- Kalaji HM, Schansker G, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Ferroni L, Goltsev V, Guidi L, Jajoo A, Li P, et al (2016) Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth Res* 1–54
- Kalaji HM, Schansker G, Ladle RJ, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Dąbrowski P, et al (2014) Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: Practical issues. *Photosynth Res* 122: 121–158
- Kanazawa A, Kramer DM (2002) In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A 99: 12789–12794
- Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420: 829–832
- Kaur R, Bhardwaj R, Thukral AK, Narang U (2009) Uptake of heavy metals, and antioxidative enzymes in *Brassica juncea* L. seedlings as affected by Zn in binary combinations with other heavy metals. *Plant Stress* 3: 17–25
- Klem K, Holub P, Štroch M, Nezval J, Špunda V, Tříška J, Jansen MAK, Robson TM, Urban O (2015) Ultraviolet and photosynthetically active radiation can both induce photoprotective capacity allowing barley to overcome high radiation stress. *Plant Physiol Biochem* 93: 74–83
- Kösesakal T, Ünal M (2009) Role of zinc deficiency in photosynthetic pigments and peroxidase activity of tomato seedlings. *IUFS J Biol* 68: 113–120
- Kovács E, Keresztes (2002) Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron* 33: 199–210
- Kumar Tewari R, Kumar P, Nand Sharma P (2006) Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. *Sci Hortic (Amsterdam)* 108: 7–14
- Lee JS, Wissuwa M, Zamora OB, Ismail AM (2017) Biochemical indicators of root damage in rice (*Oryza sativa*) genotypes under zinc deficiency stress. *J Plant Res* 130: 1071–1077
- Li P, Cheng L (2008) The shaded side of apple fruit becomes more sensitive to photoinhibition with fruit development. *Physiol Plant* 134: 282–292
- Li XP, Björkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391–5
- Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK (2009) Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* 60: 239–260
- Lidon FC, Ramalho JC (2011) Impact of UV-B irradiation on photosynthetic performance and chloroplast membrane components in *Oryza sativa* L. *J Photochem Photobiol B Biol* 104: 457–466
- Lidon FJC, Reboredo FH, Leitão AE, Silva MMA, Duarte MP, Ramalho JC (2012) Impact of UV-B radiation on photosynthesis - an overview. *Emirates J Food Agric* 24: 546–556
- Ma F, Cheng L (2004) Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophyll cycle and the ascorbate–glutathione cycle. *Plant Sci* 166: 1479–1486
- Makeredza B, Schmeisser M, Elmi L, Steyn WJ (2013) Water Stress Increases Sunburn in “Cripps” Pink’ Apple. *HortScience* 48: 444–447
- Marschner H, Cakmak I (1989) High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of Zinc, Potassium, and Magnesium deficient bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *J Plant Physiol* 134: 308–315
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 51: 659–668
- Meireles da Silva D, Brandão IR, Alves JD, de Santos MO, de Souza KRD, de Silveira HRO (2014) Physiological and biochemical impacts of magnesium-deficiency in two cultivars of coffee. *Plant Soil* 382: 133–150
- MHyFP (2016) Informes de cadenas de valor. Frutícola - Manzana y Pera. Secretaría de Política Económica y Planificación del Desarrollo. Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas de la Nación.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405–410
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light

- energy. *Plant Physiol* 125: 1558–1566
- Muñoz P, Munné-Bosch S (2018) Photo-oxidative stress during leaf, flower and fruit development. *Plant Physiol* 176: 104–1014
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1767: 414–421
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333–359
- Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121–1134
- Niyogi KK, Li XP, Rosenberg V, Jung HS (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J Exp Bot* 56: 375–382
- Pandey N, Pathak GC, Singh AK (2010) Differential sensitivity of maize to zinc and high light intensity. *Plant Stress* 4: 18–24
- Pandey N, Pathak GC, Singh AK, Sharma CP (2002a) Enzymic changes in response to zinc nutrition. *J Plant Physiol* 159: 1151–1153
- Pandey N, Singh AK, Pathak GC, Sharma CP (2002b) Effect of zinc on antioxidant response in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Indian J Exp Biol* 40: 954–956
- Perl-Treves R, Perl A (2002) Oxidative stress: Introduction. *In* D Inzé, MV Montago, eds, *Oxidative Stress plants*. Taylor and Francis Publishers, Nueva York, USA, pp 1–32
- Pospíšil P (2012) Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1817: 218–231
- Prado FE, Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M (2012) UV-B Radiation, Its Effects and Defense Mechanisms in Terrestrial Plants. *In* P Ahmad, MNV Prasad, eds, *Environ. Adapt. Stress Toler. Plants Era Clim. Chang.* Springer, pp 57–83
- Racskó J (2010) Sunburn assessment: A critical appraisal of methods and techniques for characterizing the damage to apple fruit. *Int J Hortic Sci* 16: 7–14
- Racskó J, Schrader LE (2012) Sunburn of Apple Fruit: Historical Background, Recent Advances and Future Perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci* 31: 455–504
- Racskó J, Szabó T, Nyéki J, Soltész M, Nagy PT, Miller D., Szabó Z (2010) Characterization of sunburn damage to apple fruits and leaves. *Int J Hortic Sci* 16: 15–20
- Raffo Benegas MD, Rodriguez A (2007) Factores que afectan el porcentaje de fruta asoleada en manzanos Cv. Fuji en el alto valle de Río Negro y Neuquén. *Ria* 36: 131–146
- Reddy A, Raghavendra A (2006) Photooxidative stress. *In* KV Madhava Rao, AS Raghavendra, A Janardhan Reddy, eds, *Physiol. Mol. Biol. Stress Toler. Plants*. Springer, Netherlands, pp 157–186
- Rodriguez A, Muñoz A (2006) Síntesis Agrometeorológica para el período 1990 - 2004 EEA INTA Alto Valle. *Boletín Divulg. Técnicas* N°53, EEA Alto V. EEA Alto Valle. CR Patagonia Norte. General Roca, Argentina, pp 1–50
- Ruban A V, Johnson MP, Duffy CDP (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1817: 167–181
- Ruettinger W, Yagi M, Wolf K, Bernasek S, Dismukes GC (2000) O₂ evolution from the manganese-oxo cubane core Mn₄O₄6⁺: a molecular mimic of the photosynthetic water oxidation enzyme? *J Am Chem Soc* 122: 10353–10357
- Sang S, Lapsley K, Jeong WS, Lachance PA, Ho CT, Rosen RT (2002) Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J Agric Food Chem* 50: 2459–2463
- Senasa (2016) Anuario Estadístico 2015. Centro Regional Patagonia Norte, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

- Shikanai T (2007) Cyclic Electron Transport Around Photosystem I: Genetic Approaches. *Annu Rev Plant Biol* 58: 199–217
- Singh SS, Pankaj-Kumar, Ashwani KR (2006) Ultraviolet radiation in stress: Molecular and physiological adaptations in trees. *In* A K.Rai, Teruhiro-Takabe, eds, *Abiotic Stress plants*. Springer, Netherlands, pp 91–110
- Stirbet A, Govindjee (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol B Biol* 104: 236–257
- Strasser RJ, Merope Tsimilli M, Srivastava A (2004) Analysis of the Fluorescence Transient. *In* Springer, ed, *Chlorophyll a Fluoresc*. Springer Netherlands. Netherlands, pp 321–362
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynth. Mech. Regul. Adapt*. pp 445–483
- Szabó I, Bergantino E, Giacometti GM (2005) Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Rep* 6: 629–634
- Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A (2014) *Plant physiology and development*, 6th Editio. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., EUA.
- Takahashi S, Badger MR (2011) Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci* 16: 53–60
- Takahashi S, Bauwe H, Badger M (2007) Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144: 487–494
- Takeuchi A, Yamaguchi T, Hidema J, Strid A, Kumagai T (2002) Changes in synthesis and degradation of Rubisco and LHCII with leaf age in rice (*Oryza sativa* L.) growing under supplementary UV-B radiation. *Plant, Cell Environ* 25: 695–706
- Takizawa K, Kanazawa A, Kramer DM (2008) Depletion of stromal Pi induces high “energy-dependent” antenna exciton quenching (qE) by decreasing proton conductivity at CF₀-CF₁ ATP synthase. *Plant, Cell Environ* 31: 235–243
- Vass I (2012) Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1817: 209–217
- Verbruggen N, Hermans C (2013) Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant Soil* 368: 87–99
- Wang H, Jin JY (2005) Photosynthetic rate, chlorophyll fluorescence parameters, and lipid peroxidation of maize leaves as affected by zinc deficiency. *Photosynthetica* 43: 591–596
- Weisany W, Sohrabi Y, Heidari G, Siosemardeh A, Ghassemi- K (2011) Physiological responses of soybean (*Glycine max* L.) to zinc application under salinity stress. *Aust J Crop Sci* 5: 1441–1447
- Yang G-H, Yang L-T, Jiang H-X, Li Y, Wang P, Chen L-S (2012) Physiological impacts of magnesium-deficiency in Citrus seedlings: photosynthesis, antioxidant system and carbohydrates. *Trees* 26: 1237–1250
- Zhang J, Niu J, Duan Y, Zhang M, Liu J, Li P, Ma F (2015) Photoprotection mechanism in the “Fuji” apple peel at different levels of photooxidative sunburn. *Physiol Plant* 154: 54–65
- Zhang S, Weng J, Pan J, Tu T, Yao S, Xu C (2003) Study on the photo-generation of superoxide radicals in PhotosystemII with EPR spin trapping techniques. *Photosynth Res* 75: 41–48

Capítulo II

Materiales y métodos

1. Localización y período de estudio

Los estudios se desarrollaron en la zona del Alto Valle de Río Negro, Argentina (latitud 38° Sur y longitud 67° Oeste, Figura 2.1) durante los años 2013 a 2017. Los ensayos se llevaron a cabo en las parcelas experimentales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue (FCA-UNCo) en la localidad de Cinco Saltos, y en la Estación Experimental Alto Valle del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Alto Valle - INTA) ubicado en Contralmirante Guerrico, localidad de Allen. En ambos casos, los cultivos se desarrollaban con las pautas de manejo acordes a lo recomendado para la región, confirmando seguridad en cuanto a la representatividad del material usado y los datos obtenidos. Los trabajos de mediciones a campo y extracciones de muestras se realizaron durante las temporadas de crecimiento 2013-2014, 2014-2015, 2015-2016 y 2016-2017.

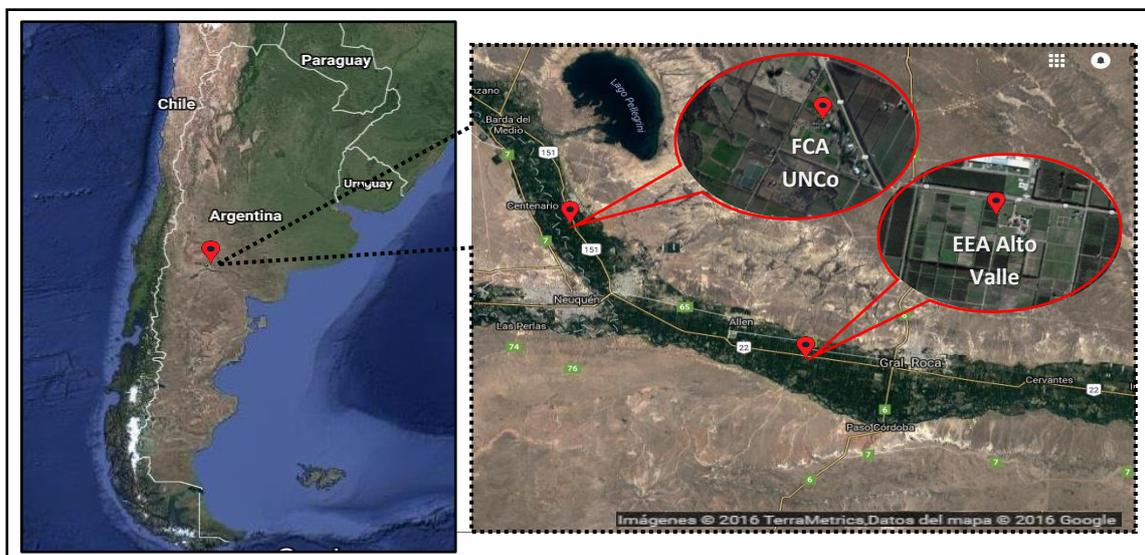


Figura 2.1. Ubicación geográfica de la zona donde se realizaron los estudios. Datos del mapa: Google, DigitalGlobe.

2. Caracterización del clima y suelo del área de estudio

El clima en la región del Alto Valle de Río Negro se caracteriza según Thornthwait como árido a semiárido, mesotermal y con lluvias deficientes todo el año. De acuerdo con Köppen la zona se clasifica como Bwk: clima seco, desértico fresco (Rodríguez y Muñoz, 2006).

La zona se caracteriza por tener una alta radiación solar global a partir de octubre hasta finalizar el verano con valores por encima de los 800 W m⁻². La temperatura media anual es de 15°C, siendo el mes más caluroso enero con temperaturas medias de 24°C y máximas medias de 31°C. La necesidad de frío invernal de los frutales de hoja caduca es normalmente satisfecha alcanzando valores superiores a las 1.200 horas. La evaporación es importante durante el mes de enero con un valor medio de 7 mm por día, siendo la pérdida de agua por evaporación anual de 1.400 mm. Sin embargo, la precipitación media anual es de 244 mm, por lo que resulta indispensable el aporte de agua por riego en todas las actividades frutihortícolas. La humedad relativa media anual es de 65%. El viento se presenta todo el año, con velocidades medias entre 5 y 9 km h⁻¹ y dirección predominante del oeste y suroeste. En los meses de octubre a diciembre ocurre la mayor frecuencia de vientos fuertes, con velocidades superiores a los 40 km h⁻¹ (Rodríguez y Muñoz, 2006).

Los suelos de la región del Alto Valle de Río Negro son típicos de desierto con baja meteorización. Su origen es aluvional, presentando texturas entre arenosas y franco limosas, con escasa presencia de materia orgánica (menor al 1% en los primeros 25 cm de suelo), velocidades de infiltración media a alta y con un perfil profundo sin gran desarrollo edáfico (CFI, 2008).

3. Registro de las condiciones meteorológicas durante el periodo de estudio.

Durante la ejecución de los ensayos se tomaron los datos de la estación meteorológica de la EEA –Alto valle – INTA (Tabla 2.1). El clima se caracterizó por ser caluroso, registrándose temperaturas máximas absolutas (en termómetro con abrigo) superior a los 38°C en enero 2014 y 2015 y hasta 40°C en enero 2016. En todas las temporadas de crecimiento el mes de enero superó la temperatura máxima media histórica, observándose una situación similar en el mes de diciembre 2013, 2015 y 2016. La radiación global máxima en los tres meses de la temporada 2014-2015 y 2015-2016, y en enero de las temporadas 2013-2014 y 2016-2017, superó los valores máximos históricos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Registros meteorológicos obtenidos de la estación meteorológica de la EEA Alto Valle - INTA, durante los meses de ejecución de los ensayos y promedios históricos.

Variables meteorológicas	Meses		
	Dic	Ene	Feb
	Promedio Histórico ⁽¹⁾		
Temperatura media (°TC)	21,7	23,0	21,4
Temperatura máx. media (°TC)	29,7	29,7	31,3
Radiación global media (W m ⁻²)	696,1	678,8	627,0
Radiación global máxima (W m ⁻²)	890,1	849,3	874,2
Humedad Relativa (%)	41,8	53,8	46,1
	2013-2014		
Temperatura media (°TC)	24,3	23,1	20
Temperatura máx. media (°TC)	32,4	31,4	27,7
Radiación global media (W m ⁻²)	690,7	662,1	612,7
Radiación global máxima (W m ⁻²)	873,0	853,0	864,0
Humedad Relativa (%)	35	36	51
	2014-2015		
Temperatura media (°TC)	20,7	22,7	20,8
Temperatura máx. media (°TC)	29,1	31,8	29,3
Radiación global media (W m ⁻²)	696,3	667,0	616,0
Radiación global máxima (W m ⁻²)	904,0	920,0	885,0
Humedad Relativa (%)	42	45	55

	2015-2016		
Temperatura media (°TC)	21,5	22,7	21,9
Temperatura máx. media (°TC)	30,0	31,3	30,3
Radiación global media (W m⁻²)	699,0	678,7	608,5
Radiación global máxima (W m⁻²)	897,0	924,0	922,0
Humedad Relativa (%)	40	52	54
	2016-2017		
Temperatura media (°TC)	22,0	23	22,6
Temperatura máx. media (°TC)	31,1	32,7	32,1
Radiación global media (W m⁻²)	688,8	673,5	627,8
Radiación global máxima (W m⁻²)	843,0	890,0	818,0
Humedad Relativa (%)	41	42	53

⁽¹⁾ Promedio histórico para la estación EEA Alto Valle-INTA, período 1990-2016 para temperatura y humedad, y 2004-2016 para radiación global.

Durante las cuatro temporadas de ensayos, las variables meteorológicas medias del verano en general se encontraron dentro de los promedios históricos. Sin embargo, las temperaturas máximas y la radiación global máxima superaron los valores máximos medios históricos durante al menos 20 días en el mes de enero para las cuatro temporadas analizadas (Tabla 2.2). Por lo tanto, se considera que durante las temporadas de ensayos las plantas estuvieron sometidas a condiciones de estrés climático característico de la zona.

Tabla 2.2. Número de días con temperatura máxima y radiación global máxima superior a los valores máximos medios históricos.

	Temporada	Dic	Ene	Feb
Días con temperatura máx. superior a temperatura máx. media histórica ⁽¹⁾	2013-2014	25	21	6
	2014-2015	13	25	9
	2015-2016	17	21	14
	2016-2017	18	24	17
Días con radiación global máx. superior a radiación global máx. media histórica ⁽¹⁾	2013-2014	4	20	9
	2014-2015	12	23	6
	2015-2016	12	24	8
	2016-2017	12	22	9

⁽¹⁾ Promedio histórico para la estación EEA Alto Valle-INTA período 1990-2015. ⁽²⁾ Promedio histórico para la estación EEA Alto Valle-INTA período 2012-2017.

3.1. Radiación fotosintéticamente activa (PAR)

Al momento de los ensayos y muestreos se registró la radiación fotosintéticamente activa (PAR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con ceptómetro Cavadevises con sensor de barra de 1 metro y en algunos casos se utilizó sensor puntual externo. Los datos de PAR de cada ensayo se informan en el apartado de materiales y métodos de cada capítulo.

3.2. Temperatura ambiente y temperatura superficial de fruto y hoja.

Al momento de los ensayos y muestreos se registró la temperatura ambiente y la temperatura superficial de hoja y/o fruto mediante termocuplas de tipo T registrando los datos en un datalogger Lutron BTM4208SD. Los datos de temperatura de cada ensayo se informan en el apartado de materiales y métodos de cada capítulo.

4. Material Vegetal

Los estudios se realizaron en hojas y frutos de plantas de manzano (*Malus domestica* Borkh.) cultivar *Red Delicious* clon Atwood 34 sobre portainjerto MM111, y cultivar Cripp's Pink sobre portainjerto MM111. Los ensayos realizados a campo fueron llevados a cabo en la parcela 8B FCA – UNCo, en *Red Delicious* y en la parcela 5N3 EEA Alto Valle – INTA, en Cripp's Pink. Las principales características de las parcelas se detallan en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Principales características de las parcelas frutales empleadas.

Parcela	Cultivar/ Portainjerto	Año de plantación	Marco de plantación	Sistema de conducción	Tipo de riego
8B FCA – UNCo	Red Delicious/ MM111	2000	3 x 4 m	Espaldera orientación noreste-suroeste	Manto
5N3 EEA Alto Valle INTA	Cripp's Pink / MM111	2009	4 x 1.5 m	Espaldera orientación este-oeste	Micro aspersión

En ambos casos el suelo presentaba texturas de tipo franco, y un porcentaje de materia orgánica entre 1,7 y 1,8%. La caracterización detallada de los primeros 30 cm del suelo en cada parcela se puede observar en la Tabla 2.4. El manejo nutricional, cultural y sanitario de las parcelas fue el adecuado para garantizar parcelas en plena producción (Alvarez *et al.*, 2004).

Tabla 2.4. Características del suelo entre 0 - 30 cm de profundidad.

Parámetro	Parcela	
	8B, FCA - UNCo ⁽¹⁾	5N3, EEA Alto Valle INTA ⁽²⁾
Textura	Franco	Franco
pH en H₂O (1/2,5)	7,63	8,0
CE mS cm⁻¹	0,2	0,41
Materia orgánica total %	1,70	1,88
Nitrógeno total %	0,93	0,12
Calcio meq /100g ⁽³⁾	sd	11,1
Magnesio meq /100g ⁽³⁾	sd	7,5
Potasio meq /100g ⁽³⁾	sd	2,7
Sodio meq /100g ⁽³⁾	sd	4,0

⁽¹⁾ Fuente: Laboratorio de Suelos y Aguas, Facultad de Ciencias Agrarias, UNCo, ⁽²⁾ Fuente: CFI (2008),

⁽³⁾ Bases intercambiables en complejo de cambio.

sd: sin dato.

La fenología de los cultivos, principalmente la fecha de plena floración varía según las condiciones climáticas de la temporada (Tabla 2.5). La edad promedio del fruto al momento de cosecha comercial se mide en días después de plena floración (DDPF) y difiere según el cultivar. El momento óptimo de inicio de cosecha de cada cultivar está determinado por una serie de índices de madurez que varían a medida que el fruto evoluciona en la planta tales como: firmeza de pulpa, sólidos solubles, acidez y degradación de almidón. En el caso de Red Delicious la edad promedio al momento de cosecha es de 135 DDPF y en Cripp's Pink es de 185 DDPF.

Tabla 2.5. Fecha de plena floración y de inicio de cosecha comercial.

Cultivar	Fecha de plena floración	Fecha de inicio de cosecha
2013-2014		
Red Delicious	7-oct	20-feb
Cripp's Pink	9-oct	10-abr
2014-2015		
Red Delicious	18-sept	14-feb
Cripp's Pink	19-sept	3-abr
2015-2016		
Red Delicious	9-oct	19-feb
Cripp's Pink	10-oct	7-abr
2016-2017		
Red Delicious	20-sept	14-feb
Cripp's Pink	18-sept	2-abr

5. Diseño experimental

Se realizaron 3 ensayos para dar respuesta a los 3 objetivos específicos.

Para el estudio de la etapa fotoquímica primaria, objetivo específico número 1 (Capítulo III), se trabajó en con plantas de cultivar Red Delicious en la parcela experimental 8B FCA-UNCo, durante la temporada de crecimiento 2013-2014 y 2015-2016. El estudio se realizó en dos sistemas experimentales: (A) en hojas en tres condiciones de exposición a la luz (H-E: hojas expuestas, H-NE: hojas no expuestas y H-AE: hojas abruptamente expuestas); y (B) en frutos en tres condiciones de exposición a la luz (F-E: fruto expuesto, F-NE: fruto no expuesto y F-AE: fruto abruptamente expuesto) y en tres momentos del desarrollo (65, 110 y 140 DDPF). Para una descripción más detallada ver Capítulo III.

La evaluación del efecto del nivel magnésico nutricional en el estrés por alta radiación solar, objetivo específico número 2 (Capítulo IV), se llevó a cabo en plantas de cultivar Cripp's Pink, en la parcela experimental 5N3 EEA Alto Valle – INTA, durante las temporadas de crecimiento 2014-2015, 2015-2016 y 2016-2017. Para dicho estudio se establecieron dos tratamientos según el contenido nutricional de magnesio (+Mg: control no deficiente de Mg y -Mg: deficiente de Mg). Los análisis se realizaron en hojas en dos condiciones de exposición a la luz (H-E: hojas expuestas, H-NE: hojas no expuestas) y en frutos sometidos a condiciones estresantes de radiación solar en condiciones controladas. Para una descripción más detallada ver Capítulo IV.

La evaluación del efecto de la aplicación de cinc (Zn) en condiciones de alta radiación solar, objetivo específico número 3 (Capítulo V), se llevó a cabo en plantas de cultivar Red Delicious, en la parcela experimental 8B FCA-UNCo, durante las temporadas de crecimiento 2014-2015 y 2015-2016. Para dicho estudio se establecieron dos tratamientos según el contenido nutricional de Zn (+Zn: control no deficiente de Zn y -Zn: deficiente de Zn). Los análisis se realizaron en hojas en dos condiciones de exposición a la luz (H-E: hojas expuestas, H-NE: hojas no expuestas) y en frutos sanos expuestos a la radiación solar. Para una descripción más detallada ver Capítulo V.

6. Contenido de nutrientes

Para la determinación del estado nutricional de las plantas se tomaron muestras de hojas y de piel de frutos² y se enviaron a laboratorios especializados

² Se define como piel de los frutos de pomo al epicarpio conformado por una cutícula gruesa con cera, la epidermis y por las primeras capas de del mesocarpo del fruto (Ghafir *et al.*, 2009; Arbo y Gonzalez, 2012).

para determinar la concentración de nutrientes según Kalra (1998). El contenido de nitrógeno se determinó según la metodología de Kjeldhal, el contenido de fósforo se determinó por el método de azul de molibdeno por espectrofotometría UV-Vis, y el resto de los macro y micronutrientes se determinó por espectrofotometría de absorción atómica.

7. Variables Respuestas

Las determinaciones fisiológicas y bioquímicas fueron realizadas en hojas y en piel de frutos dependiendo del objetivo específico estudiado. En cada capítulo, en el apartado de materiales y métodos, se especifica el material vegetal utilizado y qué variables respuesta se realizaron. A continuación, se describe en detalle la metodología de cada una de ellas.

7.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos

7.1.1. Clorofila

El contenido de clorofila *a* (Chl_a), clorofila *b* (Chl_b) y clorofila total (Chl_{a+b}) se cuantificó mediante espectrofotometría según Barnes *et al.* (1992). Para su determinación en hoja se utilizaron 2 discos extraídos con sacabocado de 1 cm de diámetro los cuales fueron incubados con 4 ml de dimetil-sulfoxido (DMSO) a 65°C durante 2 horas. En el caso de la piel de fruto se utilizaron 3 discos de 1 cm de diámetro y de 1 mm de espesor y fueron incubados con 2 ml de DMSO. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) a 664.9 y 648.2 nm y se calculó el contenido de Chl_a , Chl_b y Chl_{a+b} según Barnes *et al.* (1992).

$$Chl_a [\mu g ml^{-1}] = 14.85 A_{664.9} - 5.14 A_{648.2}$$

$$Chl_b [\mu g ml^{-1}] = 25.48 A_{648.2} - 7.36 A_{664.9}$$

$$Chl_{a+b} [\mu g ml^{-1}] = 7.49 A_{664.9} + 20.34 A_{648.2}$$

Donde,

$A_{664.9}$: Absorbancia a 664,9 nm

$A_{648.2}$: Absorbancia a 648,2 nm

7.1.2. Carotenos

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

$$C_{x+c} [\mu g ml^{-1}] = (1000 A_{470} - 1.29 Chl_a - 53.68 Chl_b) \frac{1}{220}$$

Donde,

A_{470} : Absorbancia a 470 nm

Chl_a : contenido de clorofila a [$\mu g ml^{-1}$]

Chl_b : contenido de clorofila b [$\mu g ml^{-1}$]

7.2. Fotoquímica primaria evaluada por fluorescencia directa de la clorofila α .

“Fase rápida”.

Para evaluar la etapa fotoquímica de las hojas y piel de frutos se midió la curva de inducción de fluorescencia de la Chl α , conocida como “cinética de Kautsky”. La iluminación de muestras fotosintéticas adaptadas a la oscuridad, con un pulso de luz saturante, muestra una fase de incremento rápido de fluorescencia en el primer segundo de iluminación seguida por una fase lenta de declive de la fluorescencia por varios segundos. La “fase rápida”, conocida también como curva OJIP (por cada una de las etapas), está relacionada principalmente con los eventos primarios del PSII (González Moreno *et al.*, 2008).

Para realizar dichas mediciones se utilizó un fluorímetro Hansatech Pocket PEA (Hansatech Instruments Limited, Norfolk, UK). Las medidas se realizaron según Strasser *et al.*, (1995), en hojas o en discos de piel de frutos de 1 cm de diámetro y 5 mm de espesor, previamente adaptados a la oscuridad durante 30 minutos (con

clips para adaptación a oscuridad). En las mediciones a campo en condiciones de radiación solar directa, los clips fueron sombreados con papel aluminio para evitar el calentamiento de los mismos y no alterar las medidas por alta temperatura (Giorio, 2011). La densidad de flujo fotónico fue de $3500 \mu\text{mol (fotón) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 1 segundo. Cada medición se realizó con una resolución de 120 datos s^{-1} , registrados cada $10 \mu\text{s}$ durante los primeros $300 \mu\text{s}$, y luego en intervalos más amplios a medida que la cinética de la señal de fluorescencia disminuyó. Los datos de la curva OJIP fueron analizados según Strasser *et al.* (2004) mediante el análisis JIP.

7.2.1. Análisis JIP

Para el análisis de los datos se utilizó el software PEA Plus versión 1.10 © Copyright 2011. Los parámetros medidos (F_o , F_m , $F_{300\mu\text{s}}$, F_J , F_I , tF_m *etc.*) fueron utilizados para calcular una serie de parámetros derivados que permiten obtener información acerca de la etapa fotoquímica primaria. En la tabla 2.6 se describe cada uno de los parámetros medidos y calculados de acuerdo a Strasser *et al.* (2004).

Tabla 2.6. Parámetros obtenidos mediante el análisis JIP

Parámetros medidos	Descripción
F_t	Fluorescencia a $t \mu\text{s}$ luego de pulso de luz saturante
F_o	Fluorescencia mínima, cuando todos los centros de reacción (RCs) del PSII se encuentran abiertos
F_m	Fluorescencia máxima, cuando todos los RCs del PSII se encuentran cerrados
F_{50} , F_{100} y F_{300}	Intensidad de fluorescencia a 50, 100 y 300 μs respectivamente
F_J y F_I	Intensidad de fluorescencia en la etapa J (2 ms) y en la etapa I (30 ms) respectivamente
Area	Área total complementaria sobre la curva OJIP: expresa el tamaño del pool de plastoquinona reducido
Parámetros derivados	Descripción
<i>Parámetros OJIP seleccionados</i>	
$V_t = (F_t - F_o) / (F_m - F_o)$	Fluorescencia variable relativa a tiempo t
$V_J = (F_{2\text{ms}} - F_o) / (F_m - F_o)$	Fluorescencia variable relativa a 2 ms (etapa J)

<i>Eficiencias cuánticas</i>	
$\phi_{P_0} = TR_0/ABS = 1 - F_0/F_m = F_v/F_m$	Eficiencia cuántica máxima de fotoquímica primaria a $t=0$
$\phi_{E_0} = ET_0/ABS = (F_v/F_m)(1 - V_j)$	Eficiencia cuántica de transporte de electrones a $t=0$
$\Psi_{E_0} = ET_0/TR_0 = 1 - V_j$	Probabilidad (a $t=0$) con la que un excitón atrapado mueve un electrón en la cadena de transporte de electrones después de Q_A^-
$\phi_{D_0} = DI_0/ABS = 1 - \phi_{P_0} = F_0/F_m$	Rendimiento cuántico máximo de disipación de energía a $t=0$
$\delta_{R_0} = RE_0 / ET_0 = (1 - V_j)/(1 - V_j)$	Eficiencia con la que un electrón se puede mover desde el intersistema aceptor de electrones reducido al último aceptor del PSI
<i>Flujos específicos por centro de reacción (RC) al momento 0</i>	
$ABS/RC = M_0/V_j/\phi_{P_0}$	Flujo de fotones absorbidos por antena
$TR_0/RC = M_0/V_j$	Flujo de energía atrapada por antena: es la energía transferida de la antena al RC
$DI_0/RC = ABS/RC - TR_0/RC$	Flujo de energía no atrapada por RC: energía disipada como calor o a través de otro sistema no fluorescente
$ET_0/RC = M_0/V_j$ $\Psi_{E_0} = (M_0/V_j) (1 - V_j)$	Flujo de transporte de electrones por RC después de Q_A
$RE_0/RC = (RE_0/ET_0) (ET_0/RC)$	Reducción de los últimos aceptores del lado del PSI por RC
<i>Actividades o flujos específicos por área seccional excitada (CS) al momento 0</i>	
$ABS/CS_0 = F_0$	Flujo de fotones absorbidos por CS
$TR_0/CS_0 = (ABS/CS_0) \phi_{P_0}$	Flujo de energía atrapada por CS
$DI_0/CS_0 = ABS/CS_0 - TR_0/CS_0$	Flujo de energía no atrapada por CS
$ET_0/CS_0 = (ABS/CS_0) \phi_{E_0}$	Flujo de transporte de electrones después de Q_A por CS
$RE_0/CS_0 = (RE_0/ET_0) (ET_0/CS_0)$	Reducción de los últimos aceptores del lado del PSI por CS
<i>Densidad de centros de reacción (RC) por área seccional excitada (CS)</i>	
$RC_0/CS_0 = \phi_{P_0}(ABS/CS_0) (V_j/M_0)$	Cantidad de centros de reacción del PSII activos
<i>Índices de vitalidad</i>	
$PI_{abs} = (RC/ABS) (\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0})) (\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0}))$	Índice de performance de la actividad fotoquímica en base a la absorción
$PI_{total} = (RC/ABS) (\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0})) (\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0})) (\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0}))$	Índice de performance de la actividad fotoquímica total hasta los últimos aceptores de electrones del PSI

7.3. Fotosíntesis neta y variables asociados

La fotosíntesis neta se evaluó en hojas mediante análisis infrarrojo de gases (IRGA) en sistema abierto de tipo diferencial con un medidor Ciras-2 (PP System, Amesbury, EE. UU.). Las mediciones se realizaron en condiciones de luz natural en hojas expuestas y no expuestas a plena radiación solar (PAR 1800 y 700 $\mu\text{moles m}^{-2}$

s⁻¹ respectivamente), a partir de las 13 horas y con una concentración de CO₂ de referencia de 390 ppm. El área foliar evaluada fue de 2,5 cm² y la temperatura media del aire en la cámara de análisis fue de 32±2°C. Las variables obtenidas fueron fotosíntesis neta (PN), tasa de transpiración (EVAP) y conductancia estomática (GS).

7.4. Contenido relativo de agua

La determinación del contenido relativo de agua (CRA) en hojas se realizó según Barr y Weatherley (1962). Para ello se tomaron muestras de hojas y se colocaron rápidamente en bolsas herméticas para evitar la deshidratación. En el laboratorio se extrajeron dos discos de 1 cm² con sacabocado y se registró su peso fresco (PF). Luego se sumergieron los discos en agua destilada durante 48 hs y fueron nuevamente pesados para obtener el peso a turgencia máxima (PTM). Finalmente se llevaron a estufa a 65°C durante 72 hs y se pesaron para obtener el peso seco (PS). El contenido relativo de agua se expresó en porcentaje según la siguiente formula:

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

7.5. Integridad de membranas

La integridad de membrana se evaluó según Hodges *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Su cálculo se realizó través de los cambios en pérdida de electrolitos medidos según la conductividad eléctrica de tejidos en solución acuosa. Se extrajeron dos discos de 1 cm² de hojas o piel de frutos y fueron colocados en tubos con 30 ml de agua destilada. Las muestras se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 24 horas, para luego medir la conductividad eléctrica inicial con conductímetro (OHAUS modelo ST10 C-B). Luego las muestras fueron incubadas en baño termostatzado a 100°C durante 30 minutos, y se las dejó reposar durante 24

horas a temperatura ambiente previo a medir la conductividad eléctrica final. Los valores de esta última medición se consideraron como la conductividad total o 100% del tejido. La integridad de la membrana, a partir de la pérdida de electrolitos, se calculó como el porcentaje de la conductividad inicial respecto a la conductividad final.

7.6. Daño oxidativo en membranas

El daño oxidativo en membranas se realizó según Hodges *et al.* (1999) mediante la cuantificación por espectrofotometría de especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBA) producidas durante la peroxidación de lípidos. Se utilizaron 0,2 g de tejido vegetal fresco (hoja o piel de fruto) triturados con nitrógeno líquido en mortero y homogenizados con 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% [m v⁻¹]. El homogenato fue centrifugado a 10,000 g y 4°C por 5 minutos. Luego se separaron alícuotas de 500 µl del sobrenadante y se les agregó 2 ml del medio de reacción (TBA 0.1 % [m v⁻¹] y TCA 20 % [m v⁻¹] (TBA+)) y fueron incubadas a 95°C por 30 minutos. La reacción se detuvo rápidamente en baños de hielo. Las muestras se centrifugaron a 10,000 g a 4°C durante 10 minutos y se procedió a medir la absorbancia en espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) a 532 nm, 600 nm y a 440 nm para eliminar interferencia de sacarosa. El TBA forma complejos color rojizo con aldehídos de bajo peso molecular como el malondialdehído (MDA), un subproducto del proceso de peroxidación de lípidos. Para eliminar la interferencia de las antocianinas se realizó el mismo procedimiento con alícuotas de 500 µl de sobrenadante incubadas con 2 ml de TCA 20% [m v⁻¹] (TBA-) y se midió su absorbancia a 532 y 600 nm. La concentración del complejo MDA/TBA fue calculada según se observa en la siguiente ecuación.

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

Donde,

c: coeficiente de extinción a 532 nm = 157,000 mM⁻¹cm⁻¹ (Hodges *et al.* 1999).

e: absorción molar de azúcares a 532 nm / absorción molar de azúcares a 440 nm = 0.057142857 (Hodges *et al.* 1999).

7.7. Sistema antioxidante

Para evaluar el sistema antioxidante no enzimático se realizó un extracto metanólico de las muestras. Se utilizaron 0,2 g de tejido vegetal fresco (hoja o piel de fruto) triturados con nitrógeno líquido en mortero y homogenizados con 2 ml de solución metanólica ácida (metanol 79,5%, HCl (32%) al 5%). Se agitó el homogenato durante 2 horas a 150 rpm en oscuridad y luego se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue conservado a -20°C para posteriores determinaciones.

7.7.1. Capacidad antioxidante total según inhibición del radical DPPH

La capacidad antioxidante total se evaluó según Brand-Williams *et al.* (1995) a partir de la reacción rápida de reducción del radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ante la presencia de compuestos antioxidantes como ácido ascórbico, ácido isoascórbico, isoeugenol, ácido rosmarínico y α-tocoferol. El radical DPPH, de color azul-violeta, presenta un máximo de absorción a 516 nm, pero al reducirse se decolora a amarillo pálido. El cálculo de la capacidad antioxidante de las muestras se evaluó por la diferencia de absorbancia con un testigo (sin muestra) determinándose el porcentaje de inhibición del radical.

Para esta determinación se utilizó el extracto metanólico obtenido previamente. Se incubaron durante 30 minutos 20 µl del extracto diluido (al 25%) con 780 µl de solución de DPPH 0,1 mM en metanol. La incubación se realizó en

oscuridad y a temperatura ambiente. Luego se procedió a medir la absorbancia en espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) a 516 nm. La actividad antioxidante expresada como el porcentaje de inhibición del radical se calculó según se observa en la siguiente ecuación.

$$\% \text{ inhibición DPPH} = \frac{(A_t - A_m)}{A_t} \times 100$$

Donde,

A_t = Absorbancia del testigo (sin muestra)

A_m = Absorbancia muestra

7.7.2. Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó por espectrofotometría según Škerget *et al.* (2005), basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. Este método se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con un agente oxidante, como el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm.

Para esta determinación se utilizó el extracto metanólico obtenido previamente. El medio de reacción estaba compuesto por 20 μ l de extracto diluido (al 25%), 100 μ l de reactivo de Foulín-Ciocalteu, 1,58 ml agua bidestilada y finalmente se agregó 300 μ l de Na_2CO_3 20%. Se dejó incubar durante dos horas a temperatura ambiente y luego se midió su absorbancia en espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) a 765 nm. Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico por gramo de tejido fresco (mg A.g^{-1} peso fresco) a partir de una curva de calibración patrón de ácido gálico (Škerget *et al.*, 2005).

7.7.3. Enzimas antioxidantes

Para evaluar la actividad enzimática se realizó un extracto proteico no desnaturalizado de las muestras. Se trituraron 0,2 g de peso fresco con nitrógeno líquido en mortero y se homogenizaron con 2 ml de buffer de extracción compuesto por fosfato de potasio 100 mM (pH 7,8), PVPP 0,05% y EDTA ácido 0,01 mM. Se centrifugaron a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se procedió a determinar la actividad enzimática. El extracto proteico se mantuvo refrigerado constantemente.

7.7.3.1. Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad enzimática de SOD fue medida en base a la inhibición de la oxidación de NADH mediante radicales superóxido en presencia de SOD según Paoletti *et al.*, (1986). La reacción de oxidación, en presencia de EDTA Mn^{2+} y 2-mercaptoetanol, se produce por una reacción en cadena de radicales libres que involucra la oxidación de grupos tiol y reducción univalente de O_2 . Cuando en el medio de reacción hay enzima SOD (aportada por la muestra) la velocidad de la oxidación del NADH se ve disminuida ya que la enzima SOD compite con el NADH por los radicales superóxido. A medida que se incrementa la concentración de SOD la velocidad de reacción será menor.

El medio de reacción estaba conformado por 800 μ l de trietanolamina-dietanolamina (TEA-DEA) 100 mM pH 7,4, 100 μ l solución $MnCl_2$ 12,5 mM – EDTA 12,5 mM, 40 μ l NADH 7,5 mM, 100 μ l 2-mercaptoetanol 10 mM, y 5-25 μ l de extracto proteico diluidos al 10%. Se dejó reposar 7 minutos y luego se midió el decaimiento de la absorbancia a 340 nm por 3 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 utilizó la siguiente fórmula:

$$V_{SOD} = \frac{V_{Max}}{\left[1 + \frac{Vol}{K_{0,5}}\right]}$$

Donde,

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

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

Vol: volumen de muestra empleado.

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

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

$$\frac{1}{V_{SOD}} = \frac{1}{V_{Max}} + \left[\frac{1}{(V_{Max} \times K_{0,5})} \times Vol \right]$$

Las determinaciones se realizaron en al menos 3 volúmenes diferentes de cada muestra. Las unidades SOD se expresaron por g de peso fresco o por g de proteína.

7.7.3.2. Cuantificación de proteínas

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

7.8. Electroforesis de extracto proteico en gel desnaturizante. SDS-PAGE

Se realizó una separación de proteínas según peso molecular en condiciones desnaturizantes según Laemmli (1970). Para la obtención del extracto se trituraron 0,2 g de peso fresco de la muestra con nitrógeno líquido en mortero y se homogenizaron con 1 ml de buffer de extracción compuesto por Hepes 10 mM (pH 7,4), cloruro de magnesio 1,5 mM, cloruro de potasio 10 mM, ditioneitol 0,5 mM, inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) 0,1% y PVPP 1%. Se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se separó 500 µl de sobrenadante y se agregó 100 µl de buffer cracking compuesto por Tris-HCl 350 mM (pH 6,9), glicerol 0,3 %, sodio-dodecil-

sulfato (SDS) 10%, azul de bromofenol y 2-mercaptoetanol 17%. Se incubó en agua hirviendo por 5 minutos y se conservó a -20°C.

Se utilizó un equipo Tetra Cell (Bio Rad®) para geles verticales tanto para la separación electroforética como para la transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa. Para la separación electroforética se sembraron 80 µg de proteína en gel de poliacrilamina 20%, SDS 10%, persulfato de amonio 10% y 1,2-Bis-dimetilamino-etano (TEMED). En el mismo gel se sembró 6 µl de marcador molecular de 8 a 220 KDa (Sigma-Aldrich®). Se dejó correr durante dos horas a 70 volts. La transferencia a membrana de nitrocelulosa se realizó por campo eléctrico durante 2 horas a 70 volts y luego se realizó la tinción de las bandas con Rojo Ponceau. Se analizaron las imágenes de las bandas para obtener información del contenido de proteínas según tamaño de bandas entre los 12 a 20 KDa (correspondiente a las subunidades de SOD).

7.9. Contenido de hidratos de carbono

7.9.1. Preparación de extractos

La extracción de carbohidratos se realizó según Zanandrea *et al.* (2009). Para ello se pesaron 80 mg de materia seca de hojas y se homogeneizaron con 2 ml de buffer fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0). Los extractos se incubaron en baño termostático a 40°C durante 30 minutos y luego se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos. Luego se separó el sobrenadante y se repitió el proceso dos veces combinando los sobrenadantes. Los sobrenadantes fueron utilizados para la cuantificación de azúcares y el pellet se utilizó para la determinación de contenido de almidón.

7.9.2. Azúcares

Los extractos obtenidos previamente fueron enviados a laboratorio para la separación y cuantificación de azúcares mediante HPLC e índice de refracción según la metodología del Laboratorio de Análisis Especiales, Innova T, delegación Tucumán.

7.9.3. Almidón

La cuantificación de almidón se realizó por espectrofotometría según McGrance *et al.* (1998) basándose en la reacción colorimétrica del almidón con el yodo. Para esta determinación se resuspendió el pellet obtenido previamente en dimetil sulfóxido acidificado e incubó en baño termostatzado a 85 °C durante 60 minutos. Luego de centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos, se separó el sobrenadante. Para la reacción se utilizaron 100 µl del sobrenadante los cuales se dejaron reaccionar con 100 µl de yodine al 25% (solución yodine madre: yodo 1,27 % p/v, yoduro de potasio 2,5 % p/v) en 2 ml de agua destilada. Se dejó reaccionar 10 minutos y luego se midió su absorbancia en espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) a 600 nm. Los resultados se expresaron en miligramos de almidón por gramo de tejido seco (mg Almidón.g⁻¹ peso seco) a partir de una curva de calibración patrón de almidón al 0,5%.

7.10. Rendimiento a cosecha y tamaño de frutos

Al momento de la fecha de cosecha comercial se cosechó la totalidad de la fruta de cada planta y se pesó cada fruto para obtener una distribución según tamaños comerciales. La escala utilizada para los tamaños comerciales corresponde a la cantidad de frutas que entran en una caja estándar de 18 kilos (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Tabla de tamaños comerciales de manzana según rango de peso (g), para caja estándar de 18 kilos

Tamaño Comercial	Rango de peso de fruto (g)
T<175	<101
T175	101-108
T165	108-116
T150	116-129
T135	129-144
T120	144-159
T110	159-175
T100	175-193
T90	193-216
T80	216-245
T70	245-283
T60	283-316
T56	316-338
T>56	>338

7.11. Incidencia de daño por sol en frutos

Simultáneamente con el análisis de rendimiento se clasificó visualmente cada fruto según el nivel de daño en su superficie (Figura 2.2):

- Fruto sano: frutos que no presentaban ningún signo de daño o deterioro.
- Fruto con daño leve: frutos que presentaban una leve a moderada coloración bronceada-amarillenta en la zona afectada. Este nivel de daño está asociado a lo que en la región se conoce como “reflejo de sol”.
- Fruto con daño grave: frutos que presentaban desde coloración bronceada a necrosis en la zona afectada. Este nivel de daño está asociado a lo que en la región se lo conoce como “asoleado”.

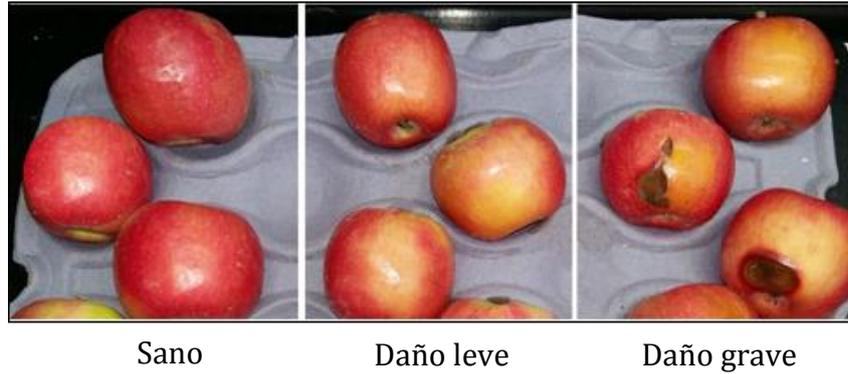


Figura 2.2. Nivel de daño por sol en frutos.

7.12. Madurez de frutos

Al momento de la fecha de cosecha se tomaron muestras de 40 frutos por tratamiento y se evaluaron los índices de madurez firmeza de pulpa (lb) y sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) según Mitcham *et al.* (1996). Para determinar el porcentaje de degradación de almidón según tinción de pulpa con lugol se utilizó como referencia las tablas de degradación de almidón publicadas por el INTA EEA Alto Valle (2010).

8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016). En todos los casos se realizó un análisis de la varianza uni o bifactorial (con interacción) y luego se realizaron comparaciones de medias a posteriori con la prueba DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$). El cumplimiento de los supuestos fue corroborado mediante la prueba de Shapiro Wilks (modificado) en base a los residuos para el caso de la distribución normal, y la prueba de Levene (análisis de la varianza de los residuos absolutos) para el caso de la homogeneidad de las varianzas.

Los resultados de los p-valores son reportados mediante símbolos según su nivel de significancia:

No significativo ns: p-valor > 0,1

Significativo •: p-valor: 0,1-0,05

Significativo *: p-valor: 0,05-0,01

Altamente significativo **: p-valor: 0,01-0,001

Altamente significativo ***: p-valor < 0,001

9. Referencias

- Alvarez J, Ginnobili J, Gómez G, Moratti P, Rodríguez R, Santagni A, Vidiri JM, Villarreal P, Zaffino R (2004) Pautas tecnológicas : frutales de pepita. Centro Regional Patagonia Norte, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Clmte. Guerrico, Argentina
- Arbo MM, Gonzalez AM (2012) 24.6. Anatomía del Fruto. Morfol. Plantas Vasc. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Corrientes, Argentina., pp 504–527
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW (1992) A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environ Exp Bot* 32: 85–100
- Barr HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Aust J Biol Sci* 15: 413–428
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
- Brand-Williams, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Sci Technol* 28: 25–30
- CFI (2008) Estudio del impacto de la producción frutícola sobre la calidad de los suelos del Alto Valle del Río Negro. Informe de Avance. Área Piloto 1. Consejo Federal de Inversiones, Provincia de Río Negro, Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Instituto .
- Ghafir SAM, Gadalla SO, Murajei BN, El-nady MF (2009) Physiological and anatomical comparison between four different apple cultivars under cold-storage conditions. *Acta Biol Szeged* 53: 21–26
- Giorio P (2011) Black leaf-clips increased minimum fluorescence emission in clipped leaves exposed to high solar radiation during dark adaptation. *Photosynthetica* 49: 371–379
- González Moreno S, Perales Vela H, Salcedo Alvarez MO (2008) La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev Educ Bioquímica* 27: 119–129
- Grupo de poscosecha - INTA EEA Alto Valle (2010) Test de degradación de almidón.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604–611
- Hodges DM, Forney CF, Wismer WV (2001) Antioxidant responses in harvested leaves of

- two cultivars of spinach differing in senescence rates. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126:
- Jiang H-X, Chen LS, Zheng J-G, Han S, Tang N, Smith BR (2008) Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiol* 28: 1863–71
- Kalra Y (1998) Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, INC. CRC Press, Boca Raton, USA
- Laemmli UK (1970) Glycine-SDS-PAGE for separation of proteins. *Nature* 227: 680
- McGrance SJ, Cornell HJ, Rix CJ (1998) A Simple and Rapid Colorimetric Method for the Determination of Amylose in Starch Products. *Starch - Stärke* 50: 158–163
- Mitcham B, Cantwell M, Kader A (1996) Methods for Determining Quality of Fresh Commodities. *Perishables Handl Newsl* 1–5
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 154: 536–541
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C (2016) InfoStat versión 2013, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Di Rienzo JA, Guzman AW, Casanoves F (2002) A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J Agric Biol Environ Stat* 7: 129–142
- Rodriguez A, Muñoz A (2006) Síntesis Agrometeorológica para el período 1990 - 2004 EEA INTA Alto Valle. Boletín Divulg. Técnicas N°53, EEA Alto V. EEA Alto Valle. CR Patagonia Norte. General Roca, Argentina, pp 1–50
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 89: 191–198
- Strasser RJ, Merope Tsimilli M, Srivastava A (2004) Analysis of the Fluorescence Transient. *In* Springer, ed, Chlorophyll a Fluoresc. Springer Netherlands. Netherlands, pp 321–362
- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61: 32–42
- Wellburn AR (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J Plant Physiol* 144: 307–313
- Zanandrea I, Alves JD, Deuner S, Goulart PDFP, Henrique PDC, Silveira NM (2009) Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. *Aust J Bot* 57: 661–669

Capítulo III

***Efectos de la alta radiación solar y el desarrollo
en la etapa fotoquímica en manzanos***

1. Introducción

Los frutos de manzana que crecen expuestos a alta radiación solar son susceptibles a un desorden fisiológico, como consecuencia del daño fotooxidativo en la piel, conocido como *asoleado* o *sunburn* (Racskó y Schrader, 2012). Sin embargo, se ha reportado que frutos que crecen no expuestos al sol tienden a ser más susceptibles al daño fotooxidativo cuando son abruptamente expuestos a la radiación solar directa (Ma y Cheng, 2004; Li y Cheng, 2008). Este tipo de daño puede ocurrir durante el raleo tardío, la poda en verde, o incluso en la cosecha o durante el transporte, si los frutos son dejados al sol sin protección (Schrader *et al.*, 2003). Las hojas de las plantas de manzano que crecen en las mismas condiciones, no suelen presentar este tipo de daño, a no ser que se encuentren sometidas a otros tipos de estrés como deficiencias nutricionales (Cakmak y Kirkby, 2008).

La radiación solar que incide sobre las plantas puede ser reflejada o absorbida por los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) ubicados en el complejo antena de las membranas fotosintéticas. A medida que los frutos se desarrollan suceden numerosos cambios en la composición de sus pigmentos. Mientras nuevos pigmentos se sintetizan (como las antocianinas), los cloroplastos de la piel de los frutos se desintegran y pierden su función fotosintética gradualmente (Blanke y Lenz, 1989; Li y Cheng, 2008). Además los estomas se transforman en lenticelas, restringiendo aún más el intercambio gaseoso vía epidermis (Blanke y Lenz, 1989) y la fijación de dióxido de carbono. El exceso de radiación solar también causa cambios significativos en la composición de los pigmentos (Racskó, 2010). Estudios realizados en manzana (*Malus domestica* Borkh.) cultivar “Fuji” han reportado una disminución en el contenido de clorofila *a*, *b* y antocianinas a medida que el daño por sol aumenta (Felicetti y Schrader, 2008).

La energía absorbida por estos pigmentos fotosintéticos puede ser canalizada por tres rutas de desexcitación: a) pérdida de energía como calor, b) transferencia de energía al centro de reacción del fotosistema II (etapa fotoquímica) y c) liberación de energía radiante como fotón visible de menor energía (fluorescencia, González Moreno *et al.*, 2008). La distribución de energía en estos tres procesos ocurre simultáneamente, por lo que la disminución de uno implicará el aumento de uno o los otros dos. Por lo tanto, a través de la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila *a* se puede obtener información de la eficiencia fotoquímica y la disipación de exceso de energía absorbida (Maxwell y Johnson, 2000).

El fotosistema II (PSII), como pieza fundamental de la etapa fotoquímica primaria, tiene una función clave en la respuesta de la fotosíntesis a las perturbaciones ambientales (Yang *et al.*, 2012). Mediciones de la fluorescencia directa de la clorofila *a* (*fase rápida* o curva OJIP), permiten investigar varios parámetros biofísicos de la fotoquímica primaria del PSII. Tales parámetros incluyen estimaciones de los flujos de energía absorbida, energía atrapada, transporte de electrones, y energía disipada, incluyendo la reducción de los últimos aceptores de electrones (Strasser *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012). Tanto la fotoquímica primaria del PSII como los flujos de energía, son alterados en condiciones de estrés ambiental. Esto conduce a un deterioro de la fotosíntesis y consecuente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son generadas durante el metabolismo normal en las células, pero grandes cantidades de éstas moléculas pueden resultar en estrés oxidativo causando peroxidación de lípidos de las membranas y destrucción de las células (Mittler, 2002).

La fotoquímica del PSII analizada mediante mediciones de inducción de fluorescencia directa en función del tiempo, muestra un incremento polifásico donde se identifican las etapas O, J, I y P (Strasser *et al.*, 1995; Strasser *et al.*, 2004). La etapa O refleja la fluorescencia mínima (F_0) cuando todos los aceptores de electrones primarios (quinona a , QA) se encuentran oxidados. La etapa P es el máximo de fluorescencia emitida (F_m) y corresponde al estado en que todos los QA se encuentran reducidos. El incremento entre la etapa O y J refleja la reducción de QA, y está asociado con las reacciones fotoquímicas primarias del PSII. El incremento entre la etapa intermedia I y la etapa final P refleja la existencia de centros de plastoquinona (PQ) de reducción rápida y lenta, así como diferentes estados redox del centro de reacción (Strasser *et al.*, 1995). En base a este modelo de respuesta sencillo, se han desarrollado modelos matemáticos más complejos para el análisis y la interpretación de la curva OJIP o “*fluorescencia transitoria*” (Strasser *et al.*, 1995; Strasser *et al.*, 2004), conocido como “JIP-test”. Los puntos de inflexión principales de la curva OJIP, son utilizados en este test para el cálculo de varios parámetros, caracterizando la estructura y la actividad fotoquímica de muestras fotosintéticas (Zivcak *et al.*, 2014).

La curva de fluorescencia transitoria OJIP es una señal rica y compleja, y se ha demostrado ser un método sensible y fiable para la detección y cuantificación de varios estreses ambientales en plantas, tales como sequía (Li y Ma, 2012; Mishra *et al.*, 2012; Brestic y Zivcak, 2013), calor (Chen *et al.*, 2009, 2008; Chen y Cheng, 2009), nutrición mineral (Hermans *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012) y estrés lumínico (Chen *et al.*, 2008; Pollastrini *et al.*, 2011; Kalaji *et al.*, 2012; Zivcak *et al.*, 2014).

Hasta donde sabemos, sólo unos pocos estudios han aplicado esta técnica para investigar las respuestas del PSII que conducen al daño oxidativo y asoleado de los

frutos en condiciones de alta radiación solar. Estudios llevados a cabo en piel de frutos, simulando alta radiación solar en condiciones controladas, indicaron que la alta intensidad lumínica conjugada con las altas temperaturas daña los complejos del PSII tanto del complejo dador como del aceptor de electrones (Chen *et al.*, 2008). En las mismas condiciones se ha demostrado también que, cuando los frutos de manzana son expuestos a alta radiación, la partición de la energía lumínica absorbida difiere entre la cara que crece expuesta y la cara que crece no expuesta al sol (Chen *et al.*, 2012).

En este capítulo se presentan los resultados de cómo la exposición a la radiación solar en hojas y frutos, y el estadio de desarrollo de los frutos, afecta la etapa fotoquímica del PSII y el estado de estrés oxidativos en los tejidos analizados. Para ello se plantearon cuatro preguntas como eje de este capítulo: 1) ¿Cómo procesan la alta intensidad de radiación solar, durante la etapa fotoquímica, las hojas y la piel de los frutos de manzano?; 2) ¿Qué cambios se producen en el proceso fotoquímico durante el desarrollo de los frutos?; 3) ¿Qué sucede en el proceso fotoquímico cuando una hoja o fruto es expuesto abruptamente a la alta intensidad de radiación?; 4) Las condiciones de radiación solar estudiadas ¿Producen estrés oxidativo en hojas y frutos?. Para responder a estas preguntas se trabajó con hojas y frutos de manzano adheridos a la planta a campo, es decir en condiciones reales de alta radiación solar.

Objetivo

Analizar el proceso de fotoquímica en hojas y en piel de frutos de manzana bajo distinta condición de exposición a alta radiación solar, y su relación con el estado fotooxidativo de los mismos. Analizar si el desarrollo de los frutos afecta su capacidad

de procesar químicamente la luz. Este objetivo responde al objetivo específico número 1 de la presente tesis.

Hipótesis

- La exposición a la alta radiación solar directa, tanto en hojas como en frutos de manzano, afecta el proceso fotoquímico de los mismos, así como el estado oxidativo de los tejidos.

- La capacidad de procesar químicamente la radiación solar de los frutos varía según su estadio de desarrollo.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Se trabajó con hojas y frutos de plantas de manzano (*Malus domestica* Borkh.) cultivar Red Delicious clon Atwood 34 en la parcela 8B FCA – UNCo durante las temporadas de crecimiento 2013-2014 y 2015-2016 (descripción parcela en Capítulo II, Tabla 2.3).

2.2. Diseño experimental y determinaciones realizadas.

El estudio se realizó en dos sistemas experimentales:

- Hojas adultas. A los 103 DDPF (20/1/2016) y en el momento de mayor radiación solar (entre las 12:00 y las 14:00 hs) se tomaron hojas de la parte superior de la canopia que crecían expuestas a la radiación solar (H-E) y hojas del interior de la canopia que crecían no expuestas a la radiación solar (H-NE). Además, en el mismo día de muestreo a las 10:30 hs, se seleccionaron hojas H-NE y se expusieron abruptamente a la radiación solar (H-AE) sin ser desprendidas de la planta. Estas hojas se mantuvieron en condiciones de plena radiación durante tres horas antes de ser recolectadas. Luego de extraídas fueron llevadas inmediatamente al laboratorio

para su análisis. Las condiciones ambientales en los momentos de muestreo se pueden observar en la tabla 3.1.

En las hojas seleccionadas, antes de ser desprendidas de las plantas, se evaluó la fotoquímica primaria por fluorescencia directa de la clorofila *a* y análisis JIP (ver Capítulo II, Tabla 2.5). Luego se tomaron las hojas y se llevaron rápidamente a laboratorio para realizar determinaciones de contenido de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$) y daño oxidativo de membrana según peroxidación de lípidos (nmol MDA g^{-1} PF). Las metodologías se encuentran detalladas en el Capítulo II.

- Piel de frutos. En tres estadios de desarrollo del fruto correspondientes a los 65 (12/12/2013), 110 (25/1/2014) y 140 DDPF (23/2/2014) y en el momento de mayor radiación solar (entre las 12:00 y las 14:00 hs) se tomaron frutos de la parte superior de la canopia que crecían expuestos a la radiación solar (F-E) y frutos del interior de la canopia que crecían no expuestos a la radiación solar (F-NE). Además, en el mismo día de muestreo a las 10:30 hs, se seleccionaron frutos F-NE y se expusieron abruptamente a la radiación solar (F-AE) sin ser desprendidos de la planta. Estos frutos se mantuvieron en condiciones de plena radiación durante tres horas antes de ser recolectados. Se trabajó siempre con frutos visiblemente sanos, es decir sin síntoma de asoleado aparente. Las condiciones ambientales en los momentos de muestreo se pueden observar en la tabla 3.1. El tamaño promedio de los frutos en cada momento de muestro se puede observar en la tabla 3.2.

Los frutos seleccionados fueron cosechados y llevados inmediatamente al laboratorio para su análisis. Las determinaciones se realizaron sobre la piel de los frutos. Se determinó la fotoquímica primaria por fluorescencia directa de la clorofila *a* y análisis JIP (ver Capítulo II, Tabla 2.5), contenido de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$) y daño

oxidativo de membrana según peroxidación de lípidos (nmol MDA g⁻¹ PF). Las metodologías se encuentran detalladas en el Capítulo II.

Tabla 3.1. Condiciones ambientales registradas durante los muestreos de hoja (103 DDPF) y fruto (65, 110 y 140 DDPF) de manzano Red Delicious.

Variables meteorológicas	Momento de muestreo (DDPF)			
	Hoja	Frutos		
	103	65	110	140
Máxima radiación solar (W m ⁻²)	790	780	790	723
Temperatura media (T°C)	34,3	34,8	31,1	32,9
Radiación PAR expuesto al sol (μmoles m ⁻² s ⁻¹)	1825	1780	1803	1796
Radiación PAR sombra (μmoles m ⁻² s ⁻¹)	840	752	786	795

Tabla 3.2. Tamaño promedio de los frutos durante los muestreos (65, 110 y 140 DDPF) de manzano Red Delicious.

Tamaño evaluado según	Momento de muestreo (DDPF)		
	65	110	140
Peso (g)	54,6 ± 2,3	145,3 ± 6,0	180,2 ± 6,1
Diámetro (mm)	48,1 ± 0,7	68,6 ± 1,1	74,2 ± 1,0

Los datos corresponden a la media ± E.E (n=5).

Todas las determinaciones en hoja y frutos se realizaron con 4-5 repeticiones. Los datos del muestreo se analizaron con un análisis de la varianza unifactorial en el caso de las hojas, y bifactorial en el caso de los frutos. La comparación de medias a posteriori se realizó mediante DGC test (Di Rienzo *et al.*, 2002), con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$).

3. Resultados

3.1. Condiciones de radiación solar y temperatura

La radiación fotosintéticamente activa (PAR) se mantuvo más o menos constante a lo largo de las 3 horas de muestreo, con una reducción del 54 % en el interior de la canopia (Figura 3.1).

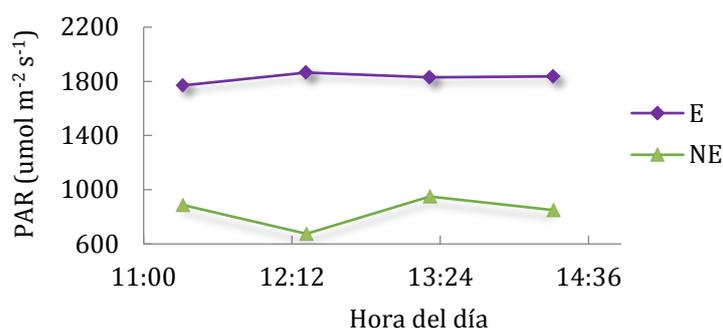


Figura 3.1. Variación promedio de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) durante los muestreos, en condiciones de plena exposición a radiación solar (E) y en el interior de la canopia no expuesto a la radiación solar (NE).

Las temperaturas fueron en incremento a lo largo del muestreo (Figura 3.2). En el caso de la temperatura superficial de las hojas (TS-H), la menor temperatura se registró en las H-NE, manteniéndose incluso por debajo de la temperatura ambiente (Figura 3.2 A). Mientras que la TS-H en H-E siempre fueron superior a la temperatura ambiente, superándola en 2,5°C a las 13 hs. Las H-AE mantuvieron una temperatura superficial similar a H-NE durante una hora y media, a partir de la cual su TS comenzó a aumentar hasta alcanzar 37,1°C (Figura 3.2 A).

La evolución de la temperatura superficial promedio de los frutos (TS-F) se presenta en la figura 3.2 B. La TS-F en F-NE se mantuvo similar a la temperatura ambiente a lo largo de todo el muestreo (Figura 3.2 B). En cambio, desde el inicio del muestreo la TS-F de F-E superaban en 5°C a la temperatura ambiente y la TS-F de F-NE, alcanzando una diferencia máxima de 10,8°C a las 13:30 hs con 42 °C. La TS-F de los F-AE comenzó a incrementar gradualmente desde el momento es que los frutos fueron expuestos a la radiación solar, igualando la TS-F de F-E luego de 1 hora de haber sido expuestos (Figura 3.2 B).

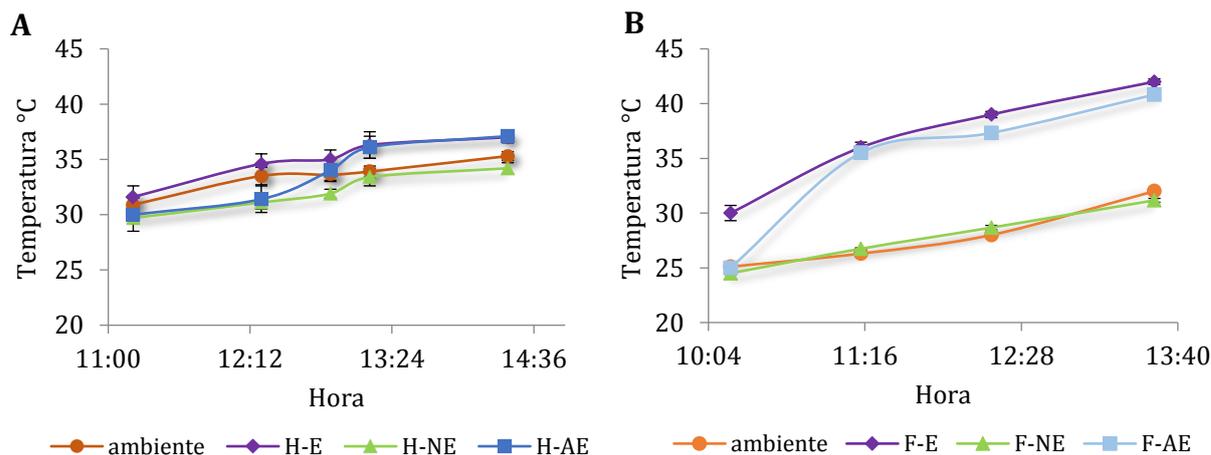


Figura 3.2. Temperatura ambiente y temperatura superficial de hojas (A) y piel de frutos (muestreo correspondiente a los 110 DDPF, B) de manzana Red Delicious expuestas (H-E / F-E), no expuestas (H-NE / F-NE) y abruptamente expuestas (H-AE / F-AE) a la radiación solar. Los datos corresponden a la media \pm E.E (n=4).

3.2. Resultados en hoja

3.2.1. Contenido de clorofila en hojas

El contenido de clorofila (*a*, *b* y total) en hojas de manzana fue afectado por la exposición al sol (Tabla 3.3). Hojas H-E presentaron 28,1, 34,0 y 29,4 % menos contenido de clorofila *a*, *b* y total respectivamente con respecto a H-NE. La relación clorofila *a/b* fue mayor en H-E que en H-NE, debido al mayor porcentaje de reducción de la clorofila *b*. Las hojas H-AE presentaron una reducción en el contenido de clorofila con respecto a H-NE, aunque no fue estadísticamente significativa (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Contenido de clorofila (*Chl a*, *b* y total) y relación clorofila *a/b* en hojas de manzana Red Delicious expuestas (H-E), no expuestas (H-NE) y abruptamente expuestas (H-AE) a la radiación solar.

Exposición	Contenido de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$)			
	<i>Chl a</i>	<i>Chl b</i>	<i>Chl total</i>	<i>Chl a/b</i>
H-NE	41,3 \pm 2,6 ^b	12,0 \pm 0,6 ^b	53,3 \pm 3,3 ^b	3,4 \pm 0,1 ^b
H-E	29,6 \pm 1,3 ^a	7,9 \pm 0,3 ^a	37,6 \pm 1,5 ^a	3,7 \pm 0,1 ^a
H-AE	38,6 \pm 0,2 ^b	11,2 \pm 0,3 ^b	49,7 \pm 1,1 ^b	3,5 \pm 0,1 ^b
<i>p</i> (Exposición)	*	**	*	*

Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

3.2.2. Fluorescencia de la clorofila *a* y JIP-test en hojas

La inducción de fluorescencia de la clorofila *a* en hojas manifestó un incremento típico, incluyendo las etapas O, J, I, y P, tanto en hojas H-NE como en H-E y H-AE (Figura 3.3). La exposición a la luz afectó la intensidad de fluorescencia con una reducción en la etapa P (Figura 3.3 A). Cuando los datos fueron normalizados por F_0 (F_t/F_0) se observa que las hojas H-AE presentaron menos fluorescencia variable que H-E (Figura 3.3 B).

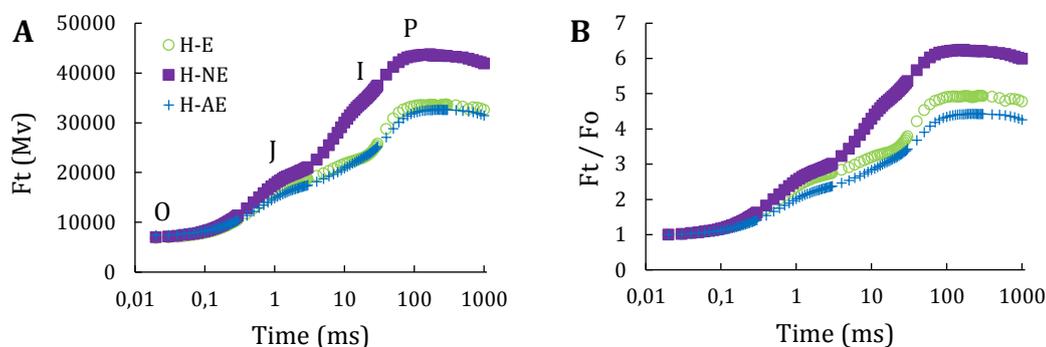


Figura 3.3. Inducción de la fluorescencia de la clorofila *a* (fase “rápida”, etapas O, J, I, P) en función del logaritmo del tiempo en milisegundos (ms) en hojas de manzana Red Delicious expuesta (H-E), no expuesta (H-NE) y abruptamente expuesta (H-AE) a la radiación solar, expresada como fluorescencia de la clorofila *a* total (F_t , A) y normalizada en la fluorescencia mínima (F_t/F_0 , B). Los datos corresponden a la media ($n=5-6$).

Tanto la fluorescencia mínima (F_0), la fluorescencia variable relativa en la etapa J (2 ms ; V_j), como el pool de plastoquinona reducido expresado como el área bajo la curva, no fueron estadísticamente afectadas por la exposición a la luz en las hojas de manzano (Figura 3.4 A, B, F). Sin embargo, en el caso de F_0 , se observó una tendencia a un incremento durante la exposición abrupta. La fluorescencia máxima (F_m) fue 22,7 y 25,4 % menor con respecto a H-NE en H-E y H-AE respectivamente (Figura 3.4 C). La eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria (F_v/F_m) y el rendimiento cuántico máximo de disipación de exceso de energía (F_0/F_m) fueron significativamente afectados por la exposición al sol (Figura 3.4 D, E). La mayor F_v/F_m y consecuentemente, menor F_0/F_m se registró en H-NE. Mientras que en H-E

se observó una disminución del 5,0 % en F_v/F_m y un aumento del 25,0 % en F_o/F_m con respecto a H-NE. Las hojas abruptamente expuestas fueron las más afectadas con una disminución del 7,7 % en F_v/F_m y un incremento del 43,8 % en F_o/F_m (Figura 3.4 D, E).

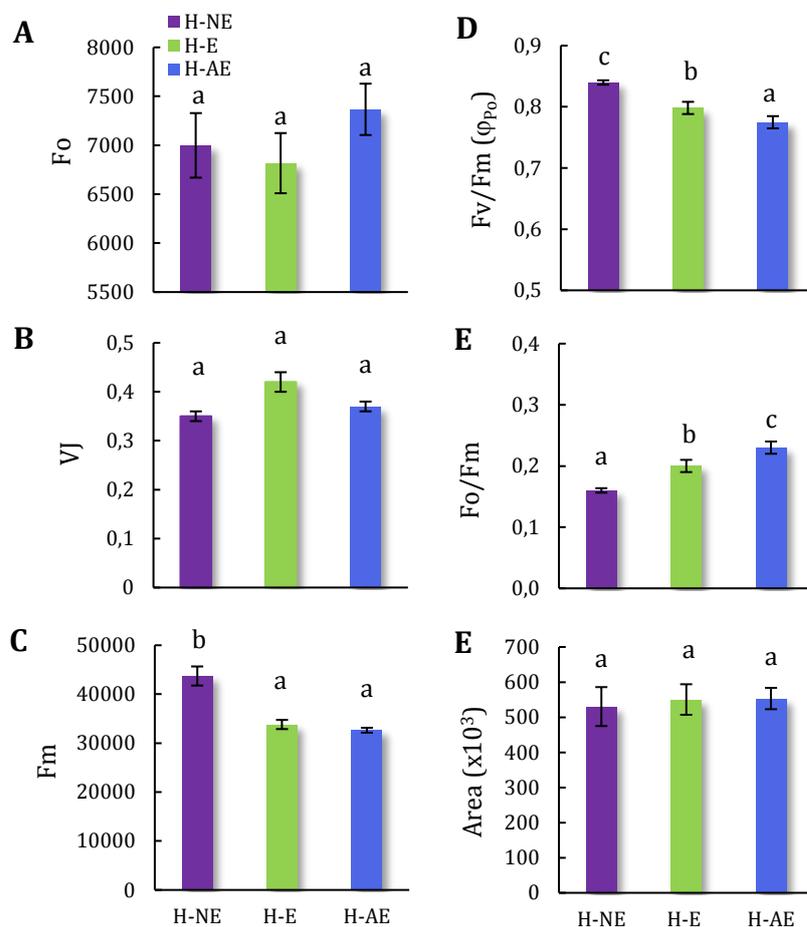


Figura 3.4. Fluorescencia mínima (F_o , Fig. A), fluorescencia variable relativa a los 2 ms (V_j , Fig. B), fluorescencia máxima (F_m , Fig. C), eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria (F_v/F_m , Fig. D), rendimiento cuántico máximo de disipación de energía (F_o/F_m , Fig. E) y tamaño del pool de plastoquinona reducida (Área, Fig. F) en hojas de manzano Red Delicious expuestas (H-E), no expuestas (H-NE) y abruptamente expuestas (H-AE) a la radiación solar. Los datos corresponden a la media \pm E.E. ($n=5$). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p<0,05$).

La exposición a de las hojas de manzano a la radiación solar, no afecto la densidad de centros de reacción del PSII activos por área seccional excitada (RC/CS_o, Figura 3.5). Sin embargo, los flujos de energía no atrapada (Dl_o/CS_o) y la

reducción de los últimos aceptores del lado del PSI por área seccional excitada fueron mayor en H-E y H-AE con respecto a H-NE (Figura 3.5).

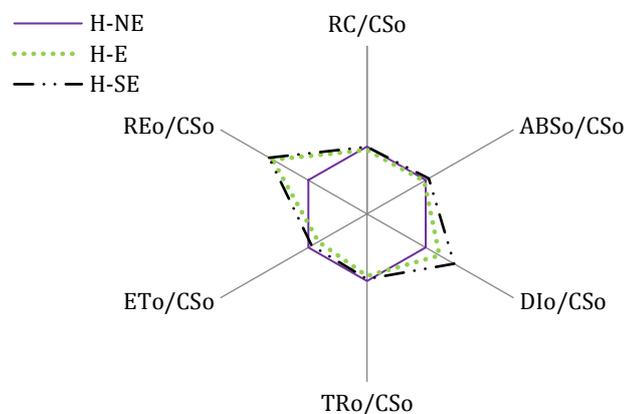


Figura 3.5. Gráfico radar de la cantidad de centros de reacción del PSII activos (RC/CSO), flujo de energía absorbido (ABS/CSO), flujo de energía disipada (Dio/CSO), flujo de energía atrapada (TRo/CSO), flujo de transporte de electrones (ETo/CSO) y reducción de los últimos aceptores del lado del PSI por área seccional excitada (REo/CSO) en hojas de manzano Red Delicious no expuestas (H-NE), expuesta (H-E) y abruptamente expuesta a la radiación solar (H-AE). Todos los valores son relativos a H-NE dentro de cada momento.

Cuando se analizaron los flujos de energía por centro de reacción, se observó que la energía disipada (Dio/RC) y la energía transportada en la cadena de transporte de electrones por centro de reacción (ETo/RC) fueron afectadas por la exposición de las hojas a la radiación solar (Figura 3.6 B, D). Tanto en el caso de H-E, como H-AE, presentaron mayor Dio/RC que H-NE (Figura 3.6 D). Únicamente las hojas H-E se diferenciaron de H-NE en la ETo/RC con una disminución del 12,8 % (Figura 3.6 D). Sin embargo, la eficiencia cuántica de transporte de electrones (ϕ_{Eo}) fue significativamente menor tanto en H-E como en H-AE (Figura 3.6 E). En contraposición, la eficiencia con la que un electrón se puede mover desde el intersistema aceptor de electrones reducido al último aceptor del PSI (δ_{Ro}) fue menor en H-NE (Figura 3.6 G).

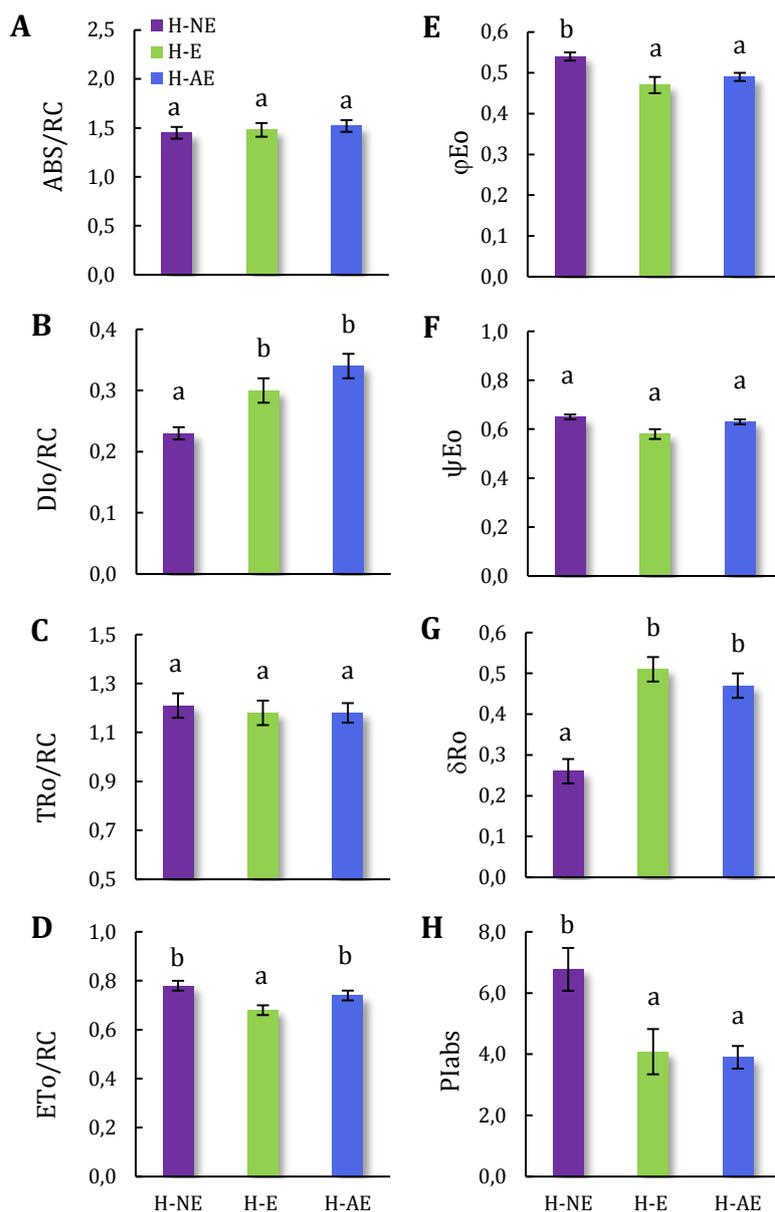


Figura 3.6. Flujo de energía absorbido (ABS/RC, Fig. A), flujo de energía disipada (Dio/RC, Fig. B), flujo de energía atrapada (TRo/RC, Fig. C) y flujo de transporte de electrones por centro de reacción (ETo/RC, Fig. D). Eficiencia cuántica de transporte de electrones (ϕEo , Fig. E), probabilidad con la que un excitón atrapado mueve un electrón en la cadena de transporte de electrones después de Q_A^- (ψEo , Fig. F), eficiencia con la que un electrón se puede mover desde el intersistema aceptor de electrones reducido al último aceptor del PSI (δRo , Fig. G) e índice de performance de la actividad fotoquímica en base a la absorción (PI_{abs}, Fig. H) en hoja de manzano Red Delicious expuestas (H-E), no expuestas (H-NE) y abruptamente expuestas (H-AE) a la radiación solar. Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC (p<0,05).

El índice de performance de la actividad fotoquímica en base a la energía absorbida (PI_{abs}) fue significativamente afectado por la exposición de las hojas de manzano a la radiación solar (Figura 3.6 H). Se observó una reducción del 39,7 y 42,4 % del PI_{abs} en hojas H-E y H-AE respectivamente, con respecto a H-NE.

3.2.3. Daño oxidativo en membranas

La exposición de las hojas de manzano a la radiación solar incrementó el daño oxidativo en membranas (Figura 3.7). Las hojas H-E y H-AE presentaron un incremento en el daño oxidativo de membranas del 21,0 y 11,7 % respectivamente, con respecto a H-NE.

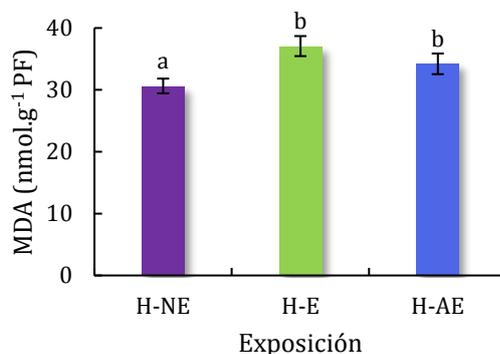


Figura 3.7. Daño oxidativo en membranas medido según contenido de MDA en hojas de manzana Red Delicious expuestas (H-E), no expuestas (H-NE) y abruptamente expuestas (H-AE) a la radiación solar. Los datos corresponden a la media \pm E.E. ($n=5$). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p<0,05$).

3.3 Resultados en fruto

3.3.1 Contenido de clorofila en piel de frutos

En todos los estadios de desarrollo, los frutos F-NE presentaron mayor contenido de clorofila *a*, clorofila total y relación clorofila *a/b* que F-E (Tabla 3.4). El contenido de clorofila *b* fue significativamente afectado por la exposición al sol únicamente a los 110 y 140 DDPF. A los 110 DDPF, y luego de 3 horas de exposición a plena radiación, los frutos F-AE mostraron una degradación significativa del 20% en el contenido de clorofila *a*, *b* y total con respecto a F-NE. Sin embargo, este

comportamiento no se observó a los 65 y 140 DDPF, donde los contenidos de clorofila de F-AE disminuyeron de forma no significativa con respecto a F-NE (Tabla 3.4).

El contenido de clorofila (*a*, *b* y total) en piel de frutos disminuyó a medida que aumentaron los DDPF en los tres tipos de exposición al sol (Tabla 3.4). La única excepción se observó en F-AE, donde no se registraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de clorofila (*a*, *b* y total) en la piel de los frutos entre los 110 y 140 DDPF. La relación entre clorofila *a/b* en F-E disminuyó con el aumento de los DDPF entre los 110 y 140 DDPF, observándose esto también en F-NE entre los 65 y 110 DDPF. La tasa de degradación durante el desarrollo fue de 87,9, 68,2 y 60,1% para la clorofila *a*; 63,3, 55,1 y 56,8% para la clorofila *b*; y 79,1, 64,2 y 59,0% para la clorofila total en frutos E, NE y AE respectivamente (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Contenido de clorofila (Chl *a*, *b* y total) y relación clorofila *a/b* en piel de manzana Red Delicious expuestas (F-E), no expuestas (F-NE) y abruptamente expuestas (F-AE) a la radiación solar, a los 65, 110 y 140 días después de plena floración (DDPF).

DDPF	Exposición	Contenido de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$)			
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl total	Chl <i>a/b</i>
65	F-NE	4,7 \pm 0,1 ^e	2,1 \pm 0,1 ^d	6,7 \pm 0,2 ^e	2,3 \pm 0,0 ^c
	F-E	3,2 \pm 0,2 ^d	1,8 \pm 0,1 ^d	4,9 \pm 0,3 ^d	1,8 \pm 0,1 ^b
	F-AE	4,2 \pm 0,3 ^e	2,0 \pm 0,1 ^d	6,2 \pm 0,4 ^e	2,0 \pm 0,1 ^b
110	F-NE	2,4 \pm 0,1 ^c	1,3 \pm 0,1 ^c	3,7 \pm 0,2 ^c	1,9 \pm 0,1 ^b
	F-E	1,6 \pm 0,1 ^b	1,1 \pm 0,1 ^b	2,7 \pm 0,2 ^b	1,5 \pm 0,1 ^b
	F-AE	1,9 \pm 0,1 ^b	1,0 \pm 0,1 ^b	2,9 \pm 0,2 ^b	1,8 \pm 0,1 ^b
140	F-NE	1,5 \pm 0,2 ^b	0,9 \pm 0,1 ^b	2,4 \pm 0,2 ^b	1,6 \pm 0,2 ^b
	F-E	0,4 \pm 0,0 ^a	0,6 \pm 0,1 ^a	1,0 \pm 0,1 ^a	0,6 \pm 0,1 ^a
	F-AE	1,7 \pm 0,3 ^b	0,9 \pm 0,1 ^b	2,5 \pm 0,5 ^b	1,9 \pm 0,2 ^b
	<i>p</i> (DDPF)	***	***	***	
	<i>p</i> (Exposición)	***	***	***	
	<i>p</i> (DDPF x Exposición)	•	ns	ns	**

Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns ($p > 0,1$), • ($0,1 < p > 0,05$), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

3.3.2. Fluorescencia de la clorofila *a* y JIP test en frutos.

Durante el análisis de la fase rápida de la curva de inducción de fluorescencia de la clorofila *a*, se observó un incremento típico, incluyendo las etapas O, J, I, y P tanto en F-NE como en F-E y F-AE (Figura 3.8). La exposición a la radiación solar y el desarrollo de los frutos afectó la intensidad de fluorescencia de la clorofila *a*, con una importante reducción de la etapa P, y un leve incremento de la etapa O (Figura 3.8 A, B y C). Las diferencias en la fluorescencia variable se pueden observar en la normalización por F_0 , graficado como F_t/F_0 (Figura 3.8 D, E y F). Los frutos F-NE mostraron la mayor fluorescencia variable durante todo su desarrollo con respecto a F-E y F-AE. La mayor reducción por exposición al sol se observó a los 110 DDPF, principalmente en los frutos F-AE (Figura 3.8 E).

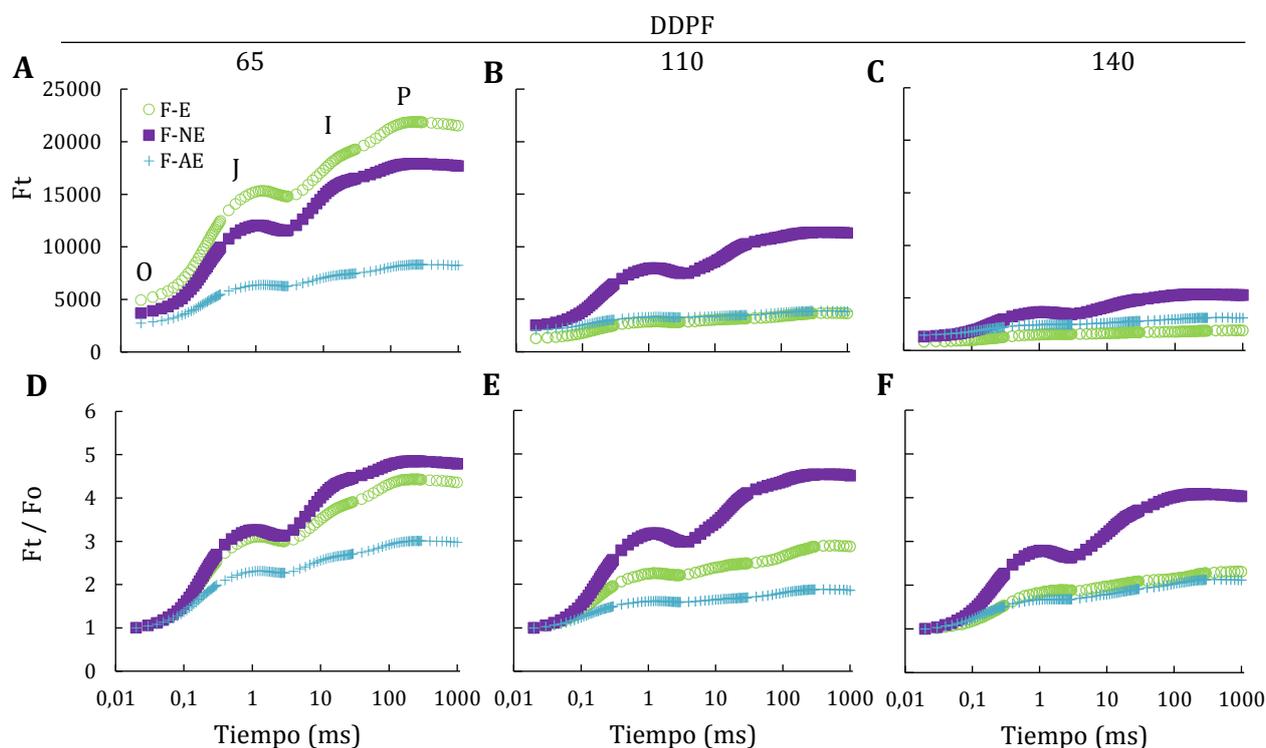


Figura 3.8. Inducción de la fluorescencia de la clorofila *a* (fase “rápida”, etapas O, J, I, P) en función del logaritmo del tiempo en milisegundos (ms) en piel de manzana Red Delicious expuesta (F-E), no expuesta (F-NE) y abruptamente expuesta (F-AE) a la radiación solar, expresada como fluorescencia de la clorofila *a* total (F_t) a los 65 (Fig. A), 110 (Fig. B) y 140 (Fig. C) días después de plena floración (DDPF) y normalizada en la fluorescencia mínima (F_t/F_0), a los 65 (Fig. D), 110 (Fig. E) y 140 DDPF (Fig. F). Los datos corresponden a la media ($n=5$).

La fluorescencia mínima (F_o) y fluorescencia máxima (F_m), fueron afectadas por la exposición de la luz y el desarrollo de los frutos (Figura 3.9 A, C). A los 65 DDPF, F_o y F_m fueron mayores en F-E con respecto a F-NE y F-AE. Sin embargo, este comportamiento no se mantuvo a lo largo del desarrollo de los frutos. F_o y F_m fueron menores en F-E con respecto a F-NE y F-AE a los 110 y 140, con diferencias estadísticamente significativas solo a los 110 DDPF. A los 110 DDPF F_o en F-AE fue similar a F-NE, mientras que F_m fue similar a F-E. La fluorescencia variable relativa en la etapa J (2 ms; V_j) a los 65 DDPF fue mayor en frutos F-AE con respecto a F-E y F-NE. A los 110 DDPF V_j aumenta en frutos F-E, mientras que a los 140 DDPF V_j disminuye en F-AE (Figura 3.9 B). V_j se mantuvo constante durante el desarrollo en frutos F-NE.

La eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) en F-E fue 2,5, 22 y 32 % significativamente menor que F-NE a los 65, 110 y 140 DDPF respectivamente (Figura 3.9 D). Mientras que en F-AE los porcentajes de reducción de F_v/F_m con respecto a F-NE fueron de 32, 45 y 41 % a los 65, 110 y 140 DDPF (Figura 3.9 D). El comportamiento opuesto se observa al analizar el rendimiento cuántico máximo de disipación de energía (F_o/F_m , Figura 3.9 E). La mayor disipación de energía con respecto a la energía absorbida se observa en F-AE en los tres estadios de desarrollo, mientras que en F-E se observa un aumento de F_o/F_m a partir de los 110 DDPF (Figura 3.9 E).

El área bajo la curva OJIP, considerado como un indicador del pool de plastoquinona reducido, fue significativamente mayor en F-E a los 65 DDPF (Figura 3.9 F). Sin embargo, este parámetro presentó una reducción drástica del 67 % en F-E a los 110 DDPF. En F-NE, el pool de plastoquinona reducido se mantuvo constante durante los primeros estadios de desarrollo. A los 140 DDPF se observó una

disminución general del pool de plastoquinona reducido en las tres exposiciones al sol (Figura 3.9 F).

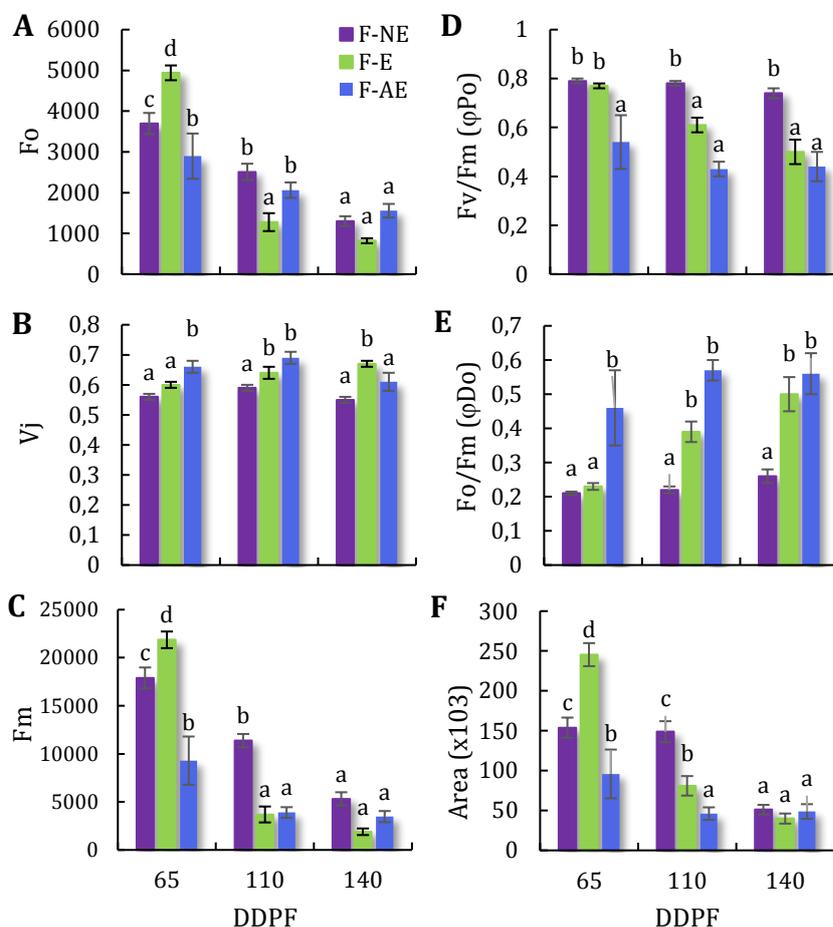


Figura 3.9. Fluorescencia mínima (F_o , Fig. A), fluorescencia variable relativa a los 2 ms (V_j , Fig. B), fluorescencia máxima (F_m , Fig. C), eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria (F_v/F_m , Fig. D), rendimiento cuántico máximo de disipación de energía (F_o/F_m , Fig. E) y tamaño del pool de plastoquinona reducida (Área, Fig. F) en piel de manzana Red Delicious expuestas (F-E), no expuestas (F-NE) y abruptamente expuestas (F-AE) a la radiación solar a los 65, 110 y 140 días después de plena floración (DDPF). Los datos corresponden a la media \pm E.E. ($n=5$). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p<0,05$).

Tanto en F-E como en F-NE, los flujos específicos de energía por área seccional excitada (CS) se redujeron a medida que los DDPF aumentaron (Figura 3.10 A, B). Así mismo, la densidad de centros de reacción del PSII activos por área seccional (RC_o/CS_o) también se redujo durante el desarrollo. Estas reducciones, cuando son analizadas en valores relativos a los 65 DDPF, fueron mayor en F-E con respecto a F-NE (Figura 3.10 A, B). Los efectos de la exposición al sol sobre los flujos de energía

específicos variaron según el estadio de desarrollo (Figura 3.11). A los 65 DDPF, RC_o/CS_o y el resto de los flujos de energía analizados fueron mayor en F-E con respecto a F-NE (Figura 3.11 A). Sin embargo, en F-AE, se observó un incremento en la energía disipada (DI_o/CS_o) acompañado por una reducción en el flujo de energía absorbida (ABS/CS_o), atrapada (TR_o/CS_o) y en el flujo de transportes de electrones (ET_o/CS_o , Figura 3.11 A). A los 110 DDPF, los flujos de energía F-E se redujeron por la exposición al sol, con respecto a NE, a pesar del mayor número de centros de reacción del PSII activos (Figura 3.11 B). En todos los estadios de desarrollo, se observó un incremento de DI_o/CS_o en los frutos AE, siendo este más pronunciado a los 110 y 140 DDPF (Figura 3.11 A, B, C).

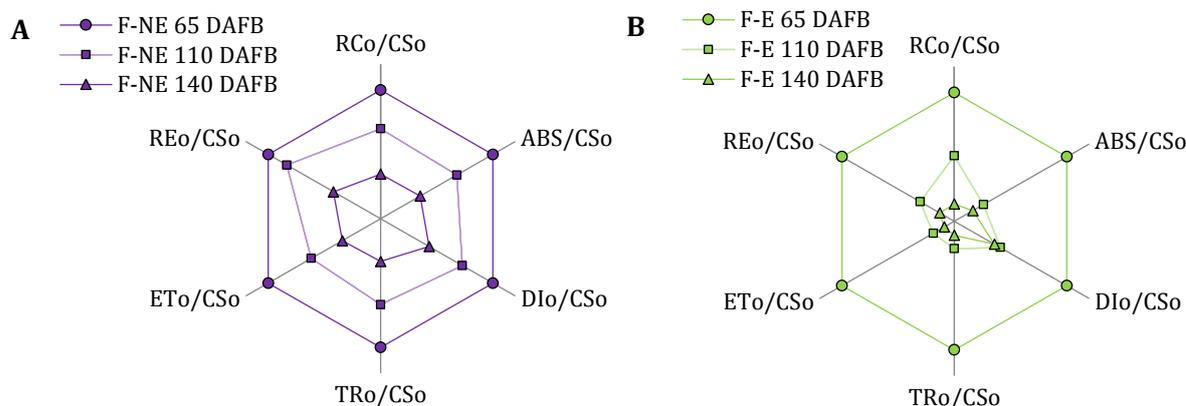


Figura 3.10. Gráfico radar de la cantidad de centros de reacción del PSII activos (RC/CS_o), flujo de energía absorbido (ABS/CS_o), flujo de energía disipada (DI_o/CS_o), flujo de energía atrapada (TR_o/CS_o), flujo de transporte de electrones (ET_o/CS_o) y reducción de los últimos aceptores del lado del PSI por área seccional excitada (RE_o/CS_o) en piel de manzana Red Delicious no expuestas (F-NE, Fig. A) y expuesta (F-E, Fig. B) a la radiación solar, a los 65, 110 y 140 días después de plena floración (DDPF). Todos los valores son relativos a 65 DDPF dentro de cada exposición al sol.

Cuando se analizaron los flujos de energía por centro de reacción, se observó que la energía absorbida (ABS/RC) y disipada (DI_o/RC) fue mayor en F-AE, diferenciándose estadísticamente de F-NE en todos los estadios de desarrollo, y de F-E solo a los 65 y 110 DDPF (Figura 3.12 A, B). Los frutos F-E presentaron un comportamiento similar a F-NE en cuanto a ABS/RC y DI_o/RC a los 65 DDPF,

registrándose un aumento de estos parámetros en F-E a medida que avanzó el desarrollo de los frutos (Figura 3.12 A, B). En cambio, en F-NE, todos los flujos de energía por centro de reacción analizados se mantuvieron constantes a lo largo del desarrollo (Figura 3.12 A, B, C, D).

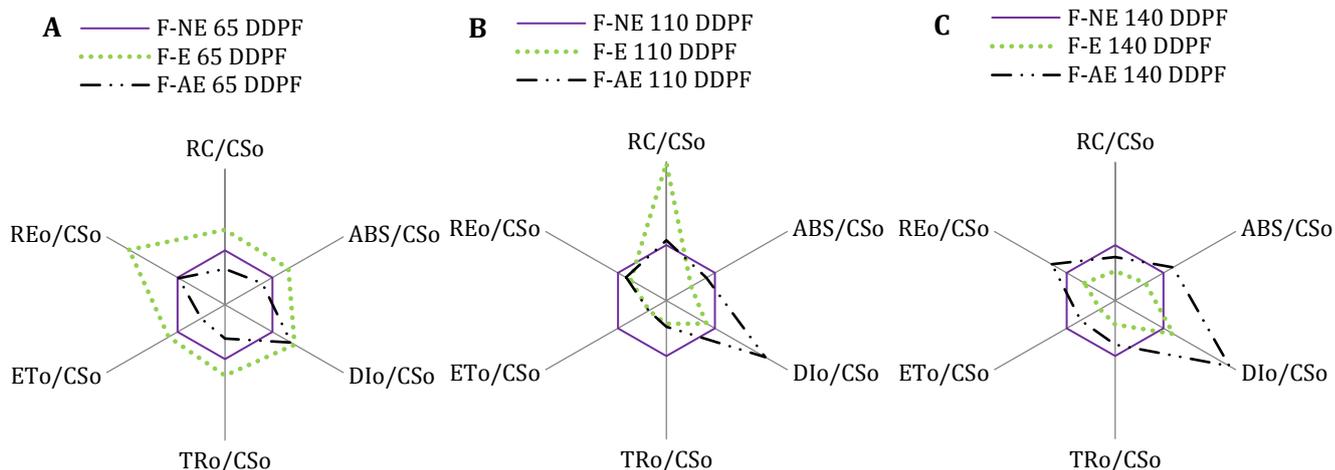


Figura 3.11. Gráfico radar de la cantidad de centros de reacción del PSII activos (RC/CSO), flujo de energía absorbido (ABS/CSO), flujo de energía disipada (Dio/CSO), flujo de energía atrapada (TRo/CSO), flujo de transporte de electrones (ETo/CSO) y reducción de los últimos aceptores del lado del PSI por área seccional excitada (REo/CSO) en piel de manzana Red Delicious no expuestas (F-NE), expuesta (F-E) y abruptamente expuesta a la radiación solar (F-AE), a los 65 (Fig. A), 110 (Fig. B) y 140 días después de plena floración (DDPF, Fig. C). Todos los valores son relativos a F-NE dentro de cada momento.

La eficiencia cuántica de transporte de electrones (φ_{Eo}) fue menor en F-AE, con respecto a F-NE, en todos los estadios de crecimiento, manteniéndose constante en F-NE durante todo el periodo analizado (Figura 3.12 E). Un comportamiento similar se observó en la probabilidad con la que un excitón atrapado mueve un electrón en la cadena de transporte de electrones después de Q_A^- (Ψ_{Eo} ; Figura 3.12 F) salvo a los 140 DDPF donde se observa un aumento de Ψ_{Eo} en F-AE. La mayor eficiencia con la que un electrón se puede mover desde el intersistema aceptor de electrones reducido al último aceptor del PSI (δ_{Ro}) se observó en F-AE en todos los estadios de desarrollo analizados y en F-E a partir de los 110 DDPF (Figura 3.12 G).

El índice de performance de la actividad fotoquímica en base a la absorción PI_{abs} se vio afectado por la exposición al sol y por el desarrollo, sobre todo en frutos

F-E y F-AE (Figura 3.12 H). En F-NE el PI_{abs} se redujo levemente con el desarrollo del fruto, pero sin detectar diferencias estadísticamente significativas entre los estadios analizados (Figura 3.12 H).

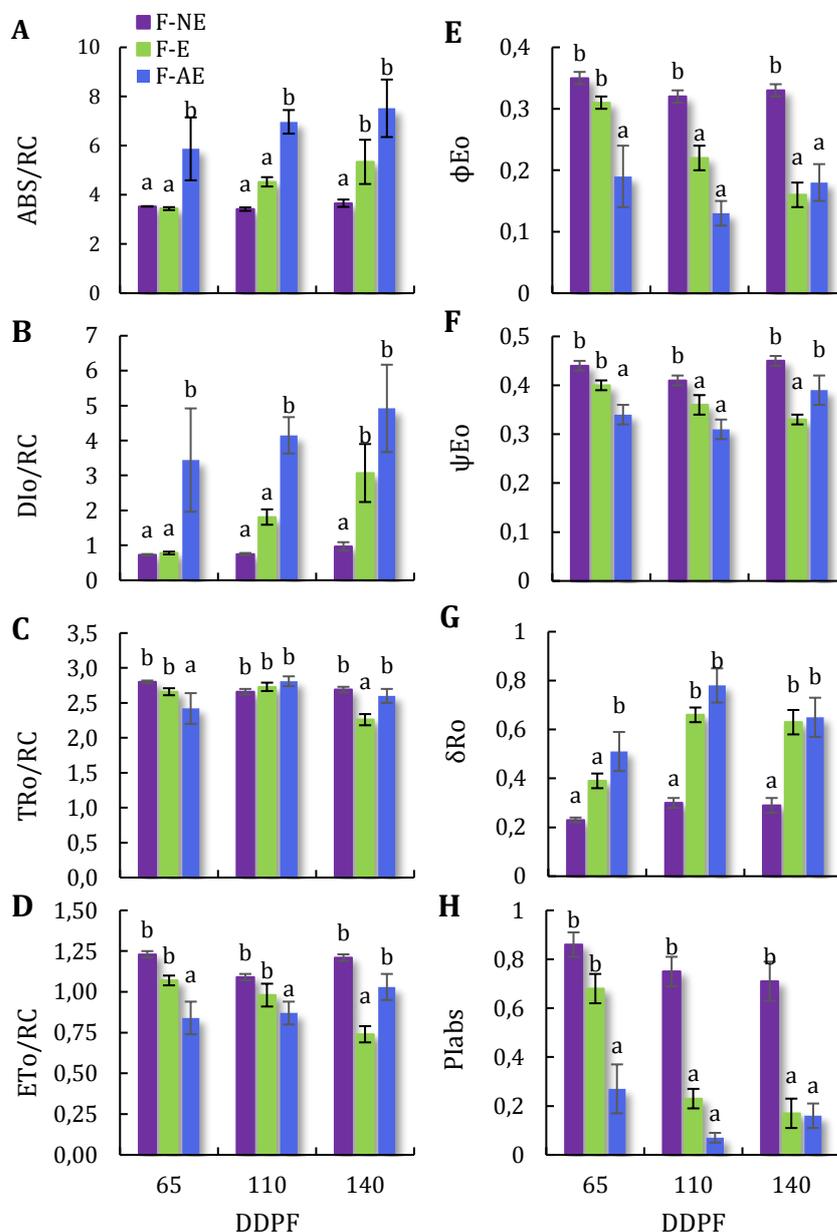


Figura 3.12. Flujo de energía absorbido (ABS/RC, Fig. A), flujo de energía disipada (Dio/RC, Fig. B), flujo de energía atrapada (TRo/RC, Fig. C) y flujo de transporte de electrones por centro de reacción (ETo/RC, Fig. D). Eficiencia cuántica de transporte de electrones (ϕEo , Fig. E), probabilidad con la que un excitón atrapado mueve un electrón en la cadena de transporte de electrones después de QA^- (ψEo , Fig. F), eficiencia con la que un electrón se puede mover desde el intersistema aceptor de electrones reducido al último aceptor del PSI (δRo , Fig. G) e índice de performance de la actividad fotoquímica en base a la absorción (PI_{abs} , Fig. H) en piel de manzana Red Delicious expuestas (F-E), no expuestas (F-NE) y abruptamente expuestas (F-AE) a la radiación solar a los 65, 110 y 140 días después de plena floración (DDPF). Los datos corresponden a la media \pm E.E. ($n=5$). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p < 0,05$).

3.3.3. Daño oxidativo en membranas

El daño en membranas fue 129,4, 74,8, y 228,8 % mayor en F-E con respecto a F-NE a los 65, 110 y 140 DDPF respectivamente (Figura 3.13). En F-AE se observó un incremento del 64,2 y 88,0 % con respecto a F-NE a los 65 y 110 DDPF, mientras que a los 140 DDPF se observó un incremento con respecto a F-NE, pero no fue significativo. En frutos F-NE y F-E el daño oxidativo de membranas fue constante durante el desarrollo en el periodo analizado (Figura 3.13).

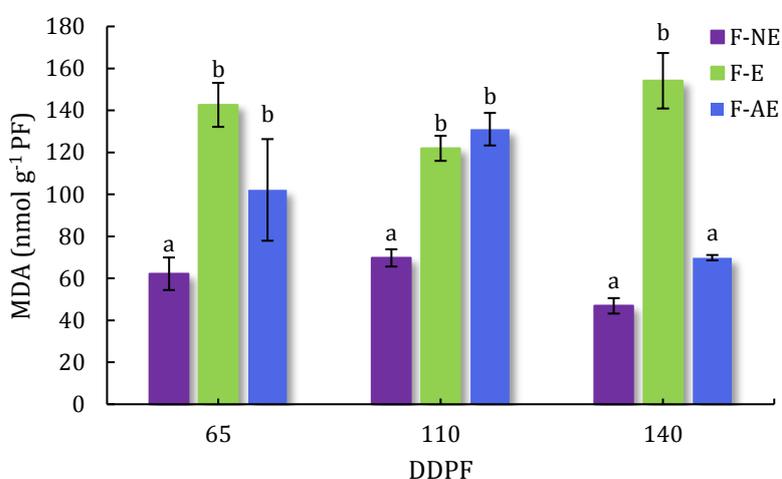


Figura 3.13. Daño oxidativo en membranas medido según contenido de MDA en piel de manzana Red Delicious expuestas (F-E), no expuestas (F-NE) y abruptamente expuestas (F-AE) a la radiación solar a los 65, 110 y 140 días después de plena floración (DDPF). Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p < 0,05$).

4. Discusión

Las condiciones ambientales registradas durante los muestreos fueron las esperadas para la región. El comportamiento de la temperatura superficial no fue similar en hojas y frutos. Mientras que las H-E superaron la temperatura ambiente por 2,5°C, los F-E alcanzaron hasta 10°C por encima de la temperatura ambiente. La diferencia entre la temperatura del aire y la temperatura superficial de frutos depende en gran medida de los factores atmosféricos, especialmente la radiación neta, la velocidad del viento y nubosidad (Naschitz *et al.*, 2015). Además, la baja

capacidad de transpiración de los frutos, y por ende de refrigeración, contribuye a este fenómeno. Es ampliamente sabido que el síntoma de asoleado es causado por la acción conjunta de dos factores externos: luz y calor, los cuales afectan el proceso de fotosíntesis de modo que la energía luminosa se redirige hacia procesos fotodinámicos perjudiciales (Schrader *et al.*, 2003). Estudios realizados en manzana en condiciones controladas simulando la temperatura y luz de campo, establecieron que el umbral de temperatura de fruto para el desarrollo de asoleado es de 41°C (Naschitz *et al.*, 2015). En nuestro ensayo ese umbral fue superado, sin embargo, no observamos daño visual.

La absorción y utilización de la energía lumínica está relacionado con el contenido de pigmentos fotosintéticos. La exposición al sol afectó el contenido de clorofila tanto en hojas como en frutos. La condición NE, tanto para hojas como para frutos, presentó mayor contenido de clorofila *a* y clorofila total que la condición E. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas, en donde se reportó cambios en la concentración de pigmentos y estrés fotooxidativo en hojas de diversas especies y en frutos de manzana expuestos a niveles crecientes de radiación solar (Demmig-Adams, 1998; Ma y Cheng, 2004, 2003; Felicetti, 2009). Sin embargo, estudios realizados para caracterizar hojas de sol y hojas de sombra, indican que el contenido de clorofila por unidad de superficie en hojas que crecen adaptadas al sol, es mayor con respecto a las hojas de la sombra (Lichtenthaler *et al.*, 1981; Lichtenthaler *et al.*, 2007; Zivcak *et al.*, 2014). Esto no se observó en este estudio y en otros ensayos realizados en hojas de manzana durante esta tesis. Esto estaría indicando que las hojas expuestas al sol analizadas no estaban adaptadas al sol y se encontraban en condición de estrés con degradación de la clorofila *a*. La relación clorofila *a/b* también se vio afectada por la exposición al sol. Mientras que en hojas

se observó una mayor relación clorofila a/b en la condición E con respecto a NE, en los frutos se observó la situación opuesta. Es ampliamente conocido que, en condiciones de alta intensidad lumínica, las plantas usualmente presentan un complejo antena del PSII de menor tamaño (Zivcak *et al.*, 2014). Mientras que en condiciones de baja intensidad de radiación solar, el tamaño del complejo antena del PSII es mayor: normalmente la cantidad de las proteínas de la antena del PSII más externas (periféricas) cambian en respuesta a las condiciones de luz, mientras que las otras proteínas de la antena del PSII, es decir, las proteínas del núcleo del complejo antena, permanecen sin cambios (Tanaka y Tanaka, 2000; Zivcak *et al.*, 2014). Por lo tanto, es esperado una relación clorofila a/b menor en hojas no expuestas o de sombra, tal como se observó en los análisis de hojas en este estudio y como ha sido documentado en numerosos estudios realizados en especies de bosques (Lichtenthaler *et al.*, 2007). En frutos se observó la situación inversa. En los tres momentos del desarrollo analizados, la relación clorofila a/b fue mayor en los frutos que crecían no expuestos (F-NE). Lo que estaría indicando que, en condición de plena exposición al sol en los frutos, se está produciendo una mayor degradación de la clorofila a , y, posiblemente, de las proteínas centrales del complejo antena del PSII (Zivcak *et al.*, 2014).

El contenido de clorofila en la piel de los frutos de manzana Red Delicious, disminuyó durante su desarrollo, lo que concuerda con estudios previos realizados en el cultivar Gala (Li y Cheng, 2008) y Golden Delicious (Chen *et al.*, 2012). Esta tendencia es exactamente opuesta a lo que sucede en hojas durante su desarrollo, pero concuerda con el decaimiento en la capacidad fotosintética de los frutos a medida que envejecen (Li y Cheng, 2008). La tasa de degradación de clorofila durante el desarrollo fue más alta en los frutos E que en los frutos NE. Indicando que

los frutos que crecen expuestos no solo tienen que lidiar con mayores intensidades de luz, sino que además sus pigmentos fotosintéticos se degradan más rápidamente a medida que crecen.

Los frutos que no estaban adaptados a las altas intensidades de luz y fueron abruptamente expuestos (F-AE) redujeron significativamente su contenido de clorofila sólo a los 110 DDPF. Debido a que la intensidad de radiación solar fue similar durante los tres momentos de muestreos, suponemos que los frutos abruptamente expuestos a la radiación solar serían más susceptibles a la degradación de la clorofila en estadios medios de desarrollo.

La curva de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* fue afectada por la exposición al sol tanto en hojas como en frutos. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en condiciones controladas en manzana expuesta a altas intensidades de luz artificial (Chen *et al.*, 2008), y en hojas de *Alhagi sparsifolia* (Li *et al.*, 2015) y de cebada (*Hordeum vulgare*) (Kalaji *et al.*, 2012; Zivcak *et al.*, 2014) en condiciones de estrés lumínico. La exposición a la radiación solar afectó la fluorescencia variable (F_t/F_0) en condición E y AE, incluso desde estadios iniciales del crecimiento de los frutos. Sin embargo, la mayor reducción de la etapa P se observó a los 110 DDPF en frutos no adaptados a la exposición del sol y que fueron abruptamente expuestos (F-AE). La fluorescencia variable en hojas AE disminuyó con respecto a NE, pero en menor medida que lo observado en frutos.

En general, una disminución en F_0 , o incluso si se mantiene igual, indica un mecanismo regulador o protector (Demmig *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2008), mientras que un incremento de F_0 indicaría fotoinhibición (Uhrmacher *et al.*, 1995). Esto último fue claramente observado en F-E solo en los estadios iniciales de desarrollo (65 DDPF). Sin embargo, es probable que la disminución de F_0 en respuesta a la

exposición al sol en F-E y F-AE a los 110 y 140 DDPF, se asocia con daños irreversibles en el complejo de oxígeno (OEC), como se observó en estudios previos en piel de manzana en condiciones de estrés por luz y altas temperaturas (Chen *et al.*, 2008).

La intensidad de fluorescencia máxima transitoria (etapa J e I) observada en la curva de inducción de la fluorescencia de la clorofila *a*, representa un cuello de botella cinético de la cadena de transporte de electrones, lo que conduce a acumulaciones máximas momentáneas de Q_A^- (Strasser *et al.*, 2004). En este estudio, el hecho de que V_J haya incrementado en F-E y F-AE sugiere que hubo una mayor reducción del lado aceptor del PSII en condiciones de alta intensidad de radiación. La fase I-P final podría reflejar la velocidad de reducción de ferredoxina y se considera como una medida de la abundancia relativa de PSI con respecto a PSII (Bussotti *et al.*, 2011; Zivcak *et al.*, 2014).

La alta intensidad de radiación afectó la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) en hojas y frutos, lo que indica una lesión en los complejos del PSII (Brestic y Zivcak, 2013) debido a un aumento de F_o y una disminución de F_m . Resultados similares fueron reportados en piel de manzana (Chen *et al.*, 2009, 2008) y en hojas de cebada (Kalaji *et al.*, 2012; Zivcak *et al.*, 2014). Sin embargo, se observó que F_v/F_m fue similar en F-E y F-NE en estadios temprano del desarrollo (65 DDPF). Esto indica que la susceptibilidad del complejo PSII de los frutos que crecen expuestos (F-E) podría desarrollarse en etapas subsiguientes del crecimiento. Además, se observó que el impacto sobre F_v/F_m fue mayor en frutos y hojas abruptamente expuestos al sol (F-AE y H-AE), que en aquellos creciendo constantemente bajo estas condiciones (F-E y H-E).

A pesar de las disminuciones en los contenidos de clorofila durante su desarrollo, no se observaron diferencias en F_v/F_m en frutos que crecían no expuestos a la radiación solar (F-NE). Según Dinç et al. (2012) F_o y F_m no se relacionan con el contenido de clorofila, por lo tanto, la relación que existe entre ellos (F_v/F_m) tampoco. En F-NE F_o y F_m decrecieron de manera proporcional a lo largo del desarrollo indicando una pérdida en la capacidad fotosintética independientemente del contenido de clorofila presente en la piel de los frutos.

El rendimiento cuántico máximo de disipación de energía (F_o/F_m) indica cuánta energía no es atrapada y se disipa como calor o es transferida a otros sistemas no fluorescentes. Representa la inversa de F_v/F_m , por lo que tanto hojas como frutos expuestos a la radiación presentaron un aumento de F_o/F_m .

El Área sobre la curva OJIP, a pesar de que su interpretación como el pool de plastoquinona reducido presenta algunas limitaciones, puede ser considerada como un indicador de la capacidad de transporte de electrones (Kalaji et al., 2016). La reducción de este indicador observado en etapas medias del desarrollo en F-E y etapas tardías en F-NE explica parcialmente la disminución en la capacidad de procesar químicamente la luz. La reducción del Área debido a exposición a la radiación solar, observada en frutos, coincide con reportes previos realizados en cebada en condición de estrés lumínico (Kalaji et al., 2012).

La reducción en la capacidad de procesar químicamente la luz durante el desarrollo del fruto también se puede observar, claramente, en la disminución del número de centros de reacción activos por área seccional excitada (RC/CS_o) en frutos F-E y F-NE. Los flujos de energía específicos por área seccional excitada también se redujeron como resultado del avance en el desarrollo de los frutos. Sin embargo, esta reducción fue más rápida en F-E que en frutos F-NE. Cuando se

analizaron los flujos específicos por sección transversal excitada entre las exposiciones solares en cada etapa de desarrollo del fruto, se observó que las actividades a los 65 DDPF fueron mayores en F-E que F- NE. Sin embargo, estas relaciones se invirtieron a los 110 DDPF a pesar del mayor número de RC/CSo. Esta disminución en los flujos específicos por área seccional excitada se correlaciona con el menor F_v/F_m observado en F-E en esta etapa de desarrollo. En los análisis realizados en las hojas, los flujos específicos por área seccional excitada prácticamente no se vieron afectados con la exposición de la luz. Únicamente, y como era lógico de esperar, se observó un incremento en el flujo de energía no atrapada o disipada (D_{Io}/CS), denotando un exceso de radiación solar recibida en H-E y H-AE, y además un incremento en la reducción de los últimos aceptores del PSI (R_{Eo}/CS).

La exposición a la radiación solar abrupta en frutos (F-AE) afectó principalmente al complejo antena del PSII, y no al centro de reacción. Esto se observó por el mayor incremento del flujo de energía absorbido (ABS/RC) y del flujo de energía disipada por centro de reacción activo (D_{Io}/RC) y por el flujo de energía atrapada sin cambios (T_{Ro}/RC) al comparar F-AE con respecto a F-NE. Un mayor valor de ABS/RC en estos frutos parece indicar un aumento del tamaño de antena por centro de reacción activo (Strasser *et al.*, 2004; Stirbet y Govindjee, 2011; Zivcak *et al.*, 2014). Según Jiang *et al.* (2008) la fotoinhibición se identifica con mayor precisión como un aumento de D_{Io}/RC y una disminución de la probabilidad que un excitón atrapado mueva un electrón en la cadena de transporte de electrones después de Q_A⁻ (Ψ_{Eo}). En este estudio la exposición a la radiación solar aumentó D_{Io}/RC y disminuyó Ψ_{Eo} en frutos. Esto concuerda con la idea de que la fotoinhibición ocurrió

en F-AE en las tres etapas analizadas³, y a los 110 y 140 DDPF en F-E. Sin embargo, recién en la última etapa (140 DDPF), se observó una reducción de la actividad de los centros de reacción del PSII en F-E debido a la disminución del flujo de energía atrapada (TRo/RC) y el flujo de transporte de electrones por centro de reacción (ETo/RC). La susceptibilidad a la fotoinhibición durante el desarrollo, en frutos abruptamente expuestos a luz, concuerda con estudios previos realizados en condiciones controladas (Li y Cheng, 2008). En hojas, a pesar del incremento de D_{Io}/RC y la disminución de F_v/F_m en condiciones de exposición a la radiación solar, no se observó variación en ΨE_o, por lo que no habría indicios de fotoinhibición.

La vitalidad de la planta puede ser caracterizada por el índice de performance de la actividad fotoquímica en base a la absorción (PI_{abs}, Strasser *et al.*, 2004). Es un índice muy sensible utilizado ampliamente para comparar toda la reacción fotoquímica en condiciones de estrés (Chen y Cheng, 2009). Este índice refleja la funcionalidad de ambos fotosistemas (PSII y PSI) y proporciona información sobre el performance de la planta bajo condiciones de estrés (Strasser *et al.*, 2004). En este estudio el PI_{abs} fue afectado por la exposición a la radiación solar en hojas y frutos, y por el estadio de desarrollo en frutos. En frutos F-NE el PI_{abs} se mantuvo constante a lo largo del desarrollo, a pesar de la disminución en su capacidad fotosintética. Mientras que en frutos F-E PI_{abs} disminuyó a partir de estadios medios de desarrollo, en frutos F-AE la reducción del PI_{abs} se observó desde estadios iniciales. Tanto la reducción del PI_{abs} como el incremento de D_{Io}/RC en hojas y frutos en condiciones de alta radiación solar estarían indicando un exceso de energía de excitación que no puede ser procesada fotoquímicamente.

³ ΨE_o en frutos F-AE disminuyó en las tres etapas analizadas, sin embargo, a los 140 DDPF esta disminución no fue estadísticamente significativa. A pesar de todo, creemos que la tendencia a la disminución de ΨE_o a los 140 DDPF es suficiente para deducir la posible fotoinhibición.

El exceso de energía de excitación puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) conduciendo al daño oxidativo de las membranas y los componentes celulares (Racskó y Schrader, 2012). La exposición de los frutos y hojas de manzano a la alta intensidad de radiación solar aumentó el daño peroxidativo en membranas. En los frutos F-E y F-AE se registró un incremento importante del daño oxidativo indicando que el sistema antioxidante fue insuficiente para hacer frente a la fotooxidación provocada por la alta intensidad de radiación solar. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en manzana (Chen *et al.*, 2008). En cambio, en hojas H-E y H-AE el incremento en daño oxidativo registrado fue menor con respecto a los frutos, pudiendo indicar tanto una menor producción de ROS, como la presencia de sistemas fotoprotectores más robustos.

El daño peroxidativo en membranas en frutos F-E y F-NE no varió durante el desarrollo. En F-AE no se observó lo mismo. Los frutos F-AE mostraron un aumento de daño peroxidativo estadísticamente significativo, con respecto a F-NE, únicamente en los estadios temprano y medio del desarrollo (65 y 110 DDPF). A los 140 DDPF el incremento no fue significativo a pesar de observarse fotoinhibición, y que varios parámetros del análisis de la etapa fotoquímica del PSII fueron afectados, tales como F_v/F_m , los flujos energéticos específicos y PI_{abs} entre otros.

La presencia de sustancias y mecanismos fotoprotectores ha sido ampliamente estudiado en manzanas (Li y Cheng, 2008; Merzlyak *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013). Entre ellos se destacan el ciclo de las xantófilas, la presencia de un sistema antioxidante y la acumulación de flavonoides como las antocianinas hacia el final del periodo de crecimiento. Las antocianinas juegan un rol fundamental en las plantas en condiciones de estrés por alta radiación solar (Hoch *et al.*, 2003; Li y Cheng, 2008;

Zhang *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2012). La acción fotoprotectora de las antocianinas puede ser atribuida a dos aspectos, protegiendo los cloroplastos del exceso de luz al absorber luz azul-verde (Merzlyak *et al.*, 2008), y capturando directamente las especies reactivas de oxígeno (Neill y Gould, 2003; Kytridis y Manetas, 2006). El ciclo de las xantófilas, en el cuál la violoxantina se convierte en zeaxantina a través del compuesto intermedio anteraxantina, participa en la disipación térmica (DIO) del exceso de energía radiante, antes de que esa energía provoque la formación de ROS (Demmig-Adams *et al.*, 1995). El sistema antioxidante, incluyendo las enzimas superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa, glutatión reductasa, ascorbato y glutatión, generalmente se encuentra en las organelas donde se producen ROS. Este sistema antioxidante, formado por compuestos enzimáticos y no enzimáticos, actúa secuestrando ROS durante condiciones de estrés y previniendo su acumulación (Asada, 1999). Estos dos últimos mecanismos fotoprotectores, el ciclo de las xantófilas y el sistema antioxidante, se encuentran activos durante los estadios iniciales del desarrollo de frutos de manzano Red Delicious, pero ha sido reportado que su actividad se reduce hacia finales del periodo de desarrollo (Chen *et al.*, 2013). En cambio la acumulación de antocianinas en manzanas rojas, como el cultivar Red Delicious, aumenta en los últimos estadios de desarrollo (Chen *et al.*, 2013), incluso en aquellos frutos sombreados, no expuestos a radiación solar directa (Li y Cheng, 2008).

Bajo estas observaciones, y luego de analizar los resultados de peroxidación de lípidos, es posible pensar que los frutos de manzana estarían más preparados para soportar el estrés oxidativo por exposición abrupta a alta radiación solar en etapas tardías del desarrollo, debido a su acumulación de antocianinas.

5. Conclusiones

Los resultados de este capítulo indican que la etapa fotoquímica primaria, tanto en las hojas como en la piel de frutos de manzana, se ve alterada en condiciones de alta intensidad de radiación solar comprobando así la hipótesis planteada. Disminuciones en el contenido de clorofila, en la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) y del índice de performance de la actividad fotoquímica (PI_{abs}) como así también los incrementos en los flujos de energía disipados (D_{Io}/RC , D_{Io}/CS , ϕ_{Do}), observados en hojas y piel de frutos expuestos o abruptamente expuestos a la radiación solar, indicarían una situación de exceso de energía radiante que no puede ser procesada fotoquímicamente, observándose en el caso de los frutos fotoinhibición. Al analizar la etapa fotoquímica en tres momentos del desarrollo de los frutos, pudimos concluir que el crecimiento de los frutos también afectó su capacidad de procesar químicamente la luz solar. Esto fue observado por las disminuciones en el contenido de clorofila, en el pool de plastoquinona reducido y en los flujos energéticos específicos por área seccional excitada.

Coincidentemente con estudios previos realizados en hojas de diversas especies y en frutos de manzana, se registró que en condiciones de alta radiación solar tanto hojas como frutos presentan mayor daño oxidativo (Ma y Cheng, 2004; Ali *et al.*, 2005; Santini *et al.*, 2012). Sin embargo, la condición de exposición abrupta al sol parece ser más perjudicial para los frutos que para las hojas. Asimismo, en este capítulo se pudo observar que los frutos que son abruptamente expuestos a la radiación solar (F-AE), son más susceptibles al daño oxidativo en estadios tempranos y medios, y estarían mejor preparados para soportar condiciones de estrés lumínico hacia el final de su desarrollo.

6. Referencias

- Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2005) Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micripropagated *Phalaenopsis* plantlet. *Environ Exp Bot* 54: 109–120
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Biol* 50: 601–639
- Blanke MM, Lenz F (1989) Fruit photosynthesis. *Plant Cell Environ* 12: 31–46
- Brestic M, Zivcak M (2013) PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in plants: protocols and applications. *In* GR Rout, AB Das, eds, *Mol. Stress Physiol. Plants*. Springer India, India, pp 87–131
- Bussotti F, Desotgiu R, Cascio C, Pollastrini M, Gravano E, Gerosa G, Marzuoli R, Nali C, Lorenzini G, Salvatori E, et al (2011) Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environ Exp Bot* 73: 19–30
- Cakmak I, Kirkby EA (2008) Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. *Physiol Plant* 133: 692–704
- Chen C, Li H, Di Z, Li P, Ma F (2013) The role of anthocyanin in photoprotection and its relationship with the xanthophyll cycle and the antioxidant system in apple peel depends on the light conditions. *Physiol Plant* 149: 354–366
- Chen C, Zhang D, Li P, Ma F (2012) Partitioning of absorbed light energy differed between the sun-exposed side and the shaded side of apple fruits under high light conditions. *Plant Physiol Biochem* 60: 12–17
- Chen L-S, Li P, Cheng L (2008) Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta* 228: 745–756
- Chen L-S, Li P, Cheng L (2009) Comparison of thermotolerance of sun-exposed peel and shaded peel of “Fuji” apple. *Environ Exp Bot* 66: 110–116
- Chen LS, Cheng L (2009) Photosystem 2 is more tolerant to high temperature in apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves than in fruit peel. *Photosynthetica* 47: 112–120
- Demmig-Adams B (1998) Survey of Thermal Energy Dissipation and Pigment Composition in Sun and Shade Leaves. *Plant Cell Physiol* 39: 474–482
- Demmig-Adams B, Adams WI, Logan B, Verhoeven A (1995) Xanthophyll Cycle-Dependent Energy Dissipation and Flexible Photosystem II Efficiency in Plants Acclimated to Light Stress. *Aust J Plant Physiol* 22: 249
- Demmig B, Winter K, Kruger A, Czygan F-C (1987) Photoinhibition and Zeaxanthin Formation in Intact Leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light. *Plant Physiol* 84: 218–224
- Felicetti DA, Schrader LE (2008) Changes in pigment concentrations associated with the degree of sunburn browning of “Fuji” apple. *J Am Soc Hortic Sci* 133: 27–34
- Felicetti E (2009) Phd Tesis: Ascorbic acid as an effective antioxidant in apple to alleviate browning: Molecular studies of control of the biosynthesis. PhD Propos. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- González Moreno S, Perales Vela H, Salcedo Alvarez MO (2008) La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev Educ Bioquímica* 27: 119–129
- Hermans C, Johnson GN, Strasser RJ, Verbruggen N (2004) Physiological characterisation of magnesium deficiency in sugar beet: Acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II. *Planta* 220: 344–355
- Hoch WA, Singaas EL, McCown BH (2003) Resorption protection. Anthocyanins facilitate

- nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiol* 133: 1296–305
- Hughes NM, Burkey KO, Cavender-Bares J, Smith WK (2012) Xanthophyll cycle pigment and antioxidant profiles of winter-red (anthocyanic) and winter-green (acyanic) angiosperm evergreen species. *J Exp Bot* 63: 1895–1905
- Jiang H-X, Chen LS, Zheng J-G, Han S, Tang N, Smith BR (2008) Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiol* 28: 1863–71
- Kalaji HM, Carpentier R, Allakhverdiev SI, Bosa K (2012) Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley. *J Photochem Photobiol B Biol* 112: 1–6
- Kalaji HM, Schansker G, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Ferroni L, Goltsev V, Guidi L, Jajoo A, Li P, et al (2016) Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth Res* 1–54
- Kytridis VP, Manetas Y (2006) Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential in vivo antioxidants: Evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. *J Exp Bot* 57: 2203–2210
- Li L, Lin L, Li X, Lu Y (2015) Sensitivity of photosystem II activity in immature and mature leaves of desert sun plant *Alhagi sparsifolia* Shap. to light stress. *Acta Physiol Plant* 37: 154
- Li P, Cheng L (2008) The shaded side of apple fruit becomes more sensitive to photoinhibition with fruit development. *Physiol Plant* 134: 282–292
- Li P, Ma F (2012) Different effects of light irradiation on the photosynthetic electron transport chain during apple tree leaf dehydration. *Plant Physiol Biochem* 55: 16–22
- Lichtenthaler HK, Ač A, Marek M V., Kalina J, Urban O (2007) Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiol Biochem* 45: 577–588
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Doll M, Fietz HJ, Bach T, Kozel U, Meier D, Rahmsdorf U (1981) Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth Res* 2: 115–141
- Ma F, Cheng L (2004) Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophyll cycle and the ascorbate–glutathione cycle. *Plant Sci* 166: 1479–1486
- Ma F, Cheng L (2003) The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate–glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Sci* 165: 819–827
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 51: 659–668
- Merzlyak MN, Melo TB, Naqvi KR (2008) Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: Signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. *J Exp Bot* 59: 349–359
- Mishra KB, Iannaccone R, Petrozza A, Mishra A, Armentano N, La Vecchia G, Trtílek M, Cellini F, Nedbal L (2012) Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Sci* 182: 79–86
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405–410
- Naschitz S, Naor A, Sax Y, Shahak Y, Rabinowitch HD (2015) Photo-oxidative sunscald of apple: Effects of temperature and light on fruit peel photoinhibition, bleaching and short-term tolerance acquisition. *Sci Hortic (Amsterdam)* 197: 5–16
- Neill S., Gould KS (2003) Anthocyanins in leaves: Light attenuators or antioxidants? *Funct*

- Plant Biol 30: 865–873
- Pollastrini M, Di Stefano V, Ferretti M, Agati G, Grifoni D, Zipoli G, Orlandini S, Bussotti F (2011) Influence of different light intensity regimes on leaf features of *Vitis vinifera* L. in ultraviolet radiation filtered condition. *Environ Exp Bot* 73: 108–115
- Racskó J (2010) Sunburn assessment: A critical appraisal of methods and techniques for characterizing the damage to apple fruit. *Int J Hortic Sci* 16: 7–14
- Racskó J, Schrader LE (2012) Sunburn of Apple Fruit: Historical Background, Recent Advances and Future Perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci* 31: 455–504
- Di Rienzo JA, Guzman AW, Casanoves F (2002) A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J Agric Biol Environ Stat* 7: 129–142
- Santini J, Giannettini J, Herbette S, Pailly O, Ollitrault P, Luro F, Berti L (2012) Physiological and biochemical response to photooxidative stress of the fundamental citrus species. *Sci Hortic (Amsterdam)* 147: 126–135
- Schrader LE, Zhang J, Sun J (2003) Environmental stresses that cause sunburn of apple. *Acta Hortic* 618: 397–405
- Stirbet A, Govindjee (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol B Biol* 104: 236–257
- Strasser RJ, Merope Tsimilli M, Srivastava A (2004) Analysis of the Fluorescence Transient. In Springer, ed, *Chlorophyll a Fluoresc.* Springer Netherlands. Netherlands, pp 321–362
- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61: 32–42
- Tanaka R, Tanaka A (2000) Chlorophyll b is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. *Porphyryns* 9: 240–245
- Uhrmacher S, Hanelt D, Nultsch W (1995) Zeaxanthin content and the degree of photoinhibition are linearly correlated in the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Mar Biol* 123: 159–165
- Yang G-H, Yang L-T, Jiang H-X, Li Y, Wang P, Chen L-S (2012) Physiological impacts of magnesium-deficiency in Citrus seedlings: photosynthesis, antioxidant system and carbohydrates. *Trees* 26: 1237–1250
- Zhang KM, Yu HJ, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Xia XJ (2010) Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant Sci* 179: 202–208
- Zivcak M, Brestic M, Kalaji HM, Govindjee (2014) Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with protection against excess of light? *Photosynth Res* 119: 339–354

Capítulo IV

***Efecto del nivel magnésico nutricional en el estrés
oxidativo por alta radiación solar en manzanos***

1. Introducción

En los suelos de la región del Alto Valle de Río Negro, el magnesio (Mg) no suele ser un elemento limitante. Sin embargo, su absorción puede ser fuertemente deprimida ante la presencia de otros cationes (Hawkesford *et al.*, 2012). El magnesio tiene un gran radio hidratado (0,59 nm) y se adsorbe débilmente a los coloides del suelo, predisponiéndolo a la lixiviación, particularmente en suelos ácidos con baja capacidad de intercambio catiónico. En los suelos alcalinos, la formación de $MgCO_3$ y el exceso de calcio (Ca), potasio (K) y sodio (Na) reducen la disponibilidad de Mg para los cultivos (Verbruggen y Hermans, 2013). Ante esta situación no es raro encontrar síntomas foliares de deficiencia de este nutriente en cultivos de manzana, siendo las aplicaciones foliares de diversos productos con sales de Mg las más efectivas para corregir su deficiencia (Sanchez, 1999).

Una de las funciones fisiológicas más conocidas del Mg es la recolección de energía solar al ocupar la posición central en la estructura de la clorofila, pero también cumple funciones fundamentales como cofactor y modulador alostérico para más de 300 enzimas (incluyendo carboxilasas, fosfatasas, quinasas, ARN polimerasas y ATPasas), y en el equilibrio energético celular debido a su interacción con diversos metabolitos, principalmente trifosfatos y difosfatos de nucleósidos (Igamberdiev y Kleczkowski, 2003; Hawkesford *et al.*, 2012; Verbruggen y Hermans, 2013). El Mg cumple una función fundamental en la exportación de fotoasimilados. Según Cakmak y Yazici (2010) la importancia del Mg en la carga de azúcares al floema está relacionada con su interacción con la enzima H^+ -ATPasa y el abastecimiento de ATP, que proporciona energía para el proceso de carga del floema y mantiene la traslocación de sacarosa a través de las células del floema. Cakmak y Yazici (2010) informaron, además, que el Mg está implicado en otras funciones,

como la síntesis de proteínas, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fotooxidación de tejidos foliares. Dependiendo del estatus nutricional del Mg, entre 6 y 25 % del Mg total está ligado a la clorofila, 5-10 % del Mg total en hojas se encuentra firmemente unido a la pectina en las paredes celulares o precipitado como sales escasamente solubles en la vacuola (por ejemplo, como fosfato de Mg) y los 60-90 % restantes se encuentra como formas móviles extraíbles con agua (Hawkesford *et al.*, 2012).

La deficiencia de Mg ha sido estudiada en plantas de manzano (*Malus domestica* Borkh., Wallace, 1940; Kidson *et al.*, 1941; Boyton y Compton, 1945; Boyton, 1946; Mulder, 1950; Oland y Opland, 1956; Ford, 1964; Sanchez, 1999), pero la mayoría de los resultados muestran los síntomas de carencia en hojas con deficiencias medias a severas. Existe poca información sobre los efectos de la deficiencia de magnesio en la fisiología de las plantas de manzano, y en el rendimiento y calidad de sus frutos. Estudios más recientes han avanzado en los efectos fisiológicos y bioquímicos de la deficiencia de magnesio en plantas de café (*Coffea arabica*) (Meireles da Silva *et al.*, 2014), mango (*Mangifera indica*) (Balakrishnan *et al.*, 2000), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) (Hermans *et al.*, 2004; Ceppi *et al.*, 2012), espinaca (*Espinacia oleracea*) (Abdel-Kader, 2004; Ze *et al.*, 2009), pimiento (*Capsicum annuum*) (Anza *et al.*, 2005; Riga *et al.*, 2005), especies de coníferas (Polle *et al.*, 1994; Laing *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001; Boxler-Baldoma *et al.*, 2006), mora (*Morus alba*) (Kumar Tewari *et al.*, 2006), especies de cítricos (Yang *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015a; Li *et al.*, 2017), frijoles (*Phaseolus vulgaris*) (Marschner y Cakmak, 1989; Cakmak y Marschner, 1992), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) (Hermans y Verbruggen, 2005), arroz (*Oryza sativa*) (Kobayashi *et al.*, 2012; Tanoi *et al.*, 2014), carrizo (*Phragmites*

australis) (Willson *et al.*, 2017), cebada (*Hordeum vulgare*) (Tränkner *et al.*, 2016), trigo (*Triticum durum*) (Esfandiari *et al.*, 2010; Yilmaz *et al.*, 2017), menta (*Mentha pulegium*) (Candan y Tarhan, 2003), maíz (*Zea mays*) (Kumar Tewari *et al.*, 2004), y cebolla (*Allium cepa*) (Kleiber *et al.*, 2012) entre otras.

Deficiencias de Mg en plantas generalmente conducen a cambios ultraestructurales (Puech y Mehne-Jakobs, 1997), antes de que los síntomas foliares visibles sean obvios. Se encontró que la deficiencia de Mg induce una disminución en el contenido de clorofila (Cakmak y Marschner, 1992; Hermans *et al.*, 2004; Esfandiari *et al.*, 2010; Meireles da Silva *et al.*, 2014), proteínas (Anza y Riga, 2001) y compuestos carotenoides (Abdel-Kader, 2004) en las hojas. También se registraron disminuciones en la tasa fotosintética (Sun y Payn, 1999; Laing *et al.*, 2000; Ridolfi y Garrec, 2000; Hariadi y Shabala, 2004; Farhat *et al.*, 2016) y en la transpiración (Kobayashi *et al.*, 2012). Debido a que el Mg cumple un rol fundamental en la traslocación de fotosintatos a través del floema (Cakmak y Kirkby, 2008; Esfandiari *et al.*, 2010), la deficiencia de Mg resulta en un aumento de la acumulación de carbohidratos en las hojas (Hermans *et al.*, 2004; Hermans y Verbruggen, 2005), alterando el metabolismo fotosintético del carbono y restringiendo la fijación de CO₂. La acumulación de carbohidratos en hojas deficientes de Mg se produce antes que aparezcan alteraciones en el crecimiento de brotes, contenido de clorofila, fotosíntesis neta o morfología de las hojas (Hermans y Verbruggen, 2005; Cakmak y Kirkby, 2008). Dependiendo de la severidad del estrés por deficiencia de Mg, las plantas con bajo suministro de Mg acumulan desde 3 hasta 12 veces más sacarosa en hojas que aquellas con abastecimiento adecuado (Cakmak *et al.*, 1994). En frutales de pepita este proceso no ha sido ampliamente estudiado. Dado que el magnesio actúa en la síntesis y traslocación de azúcares, su

deficiencia podría influir en la productividad de frutos manzana afectando su tamaño y rendimiento (Sánchez, 1999).

Al restringirse la fijación de CO₂ por deficiencias de Mg, se produce un deterioro en el transporte de electrones fotosintéticos a través de las membranas fotosintéticas lo que puede causar una acumulación de energía y electrones no utilizados (Hermans y Verbruggen, 2005; Cakmak y Kirkby, 2008). Bajo tales condiciones, los electrones que no son usados en la fijación de CO₂ son canalizados a O₂ molecular, lo que lleva a producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y, como consecuencia del estrés oxidativo, a dañar los constituyentes de los cloroplastos tales como clorofila y lípidos de membrana (Marschner y Cakmak, 1989; Mittler, 2002; Asada, 2006). Se ha observado, además, que plantas con deficiencias de magnesio incrementan su capacidad antioxidante como respuesta a la generación de ROS. En efecto, la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión reductasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa se vio incrementadas en hojas deficientes de Mg. Este hecho fue reportado por Cakmak y Marschner (1992) en plantas de frijol, Anza y Riga (2001) en pimiento, Candan y Tarhan (2003) en menta, El-Abdin Abdel-Kader (2004) en espinaca, Kumar Tewari *et al.* (2006) en mora, Yang *et al.* (2012) en naranjo (*Citrus sinensis*) y Meireles da Silva *et al.* (2014) en café.

Plantas deficientes en Mg son muy susceptibles a la alta intensidad lumínica (Cakmak y Kirkby, 2008). En espinaca en condiciones de deficiencia de Mg se registró un aumento significativo en la peroxidación de lípidos (Abdel-Kader, 2004; Ze *et al.*, 2009; Esfandiari *et al.*, 2010) y pérdida de electrolitos, siendo estos efectos aún mayores en condiciones de alta luminosidad (Abdel-Kader, 2004). La exposición a la alta intensidad lumínica de plantas deficientes en Mg induce rápidamente la aparición de clorosis y necrosis foliar (Marschner y Cakmak, 1989). Si bien el

sombreado parcial de la lámina foliar retrasa efectivamente la aparición de esos síntomas, no afecta las concentraciones de Mg en diferentes partes de la hoja. Según Cakmak y Kirkby (2008) el daño fotooxidativo contribuye al desarrollo de la clorosis de las hojas deficientes de Mg, y sugieren que las plantas bajo condiciones de alta radiación solar tienen una mayor necesidad fisiológica de Mg.

Como ya se ha analizado en capítulos previos, sabemos que la alta radiación solar produce estrés fotooxidativo en las plantas de manzano. Los frutos de manzana que crecen expuestos a alta radiación solar directa son susceptibles al daño fotooxidativo en la piel, y en casos severos afecta la calidad de los frutos al aparecer el daño de *asoleado* o *sunburn* (Racskó y Schrader, 2012). Si consideramos que las plantas deficientes de magnesio son más susceptibles al estrés por alta radiación solar, nos planteamos tres preguntas como eje de este capítulo: 1) Una planta de manzano con bajo contenido de Mg ¿es más susceptible al estrés oxidativo en sus hojas y frutos?; 2) La deficiencia de Mg, ¿afecta la translocación de azúcares en plantas de manzana y, por ende, la disipación de energía solar a través de la fotosíntesis?; 3) Una planta de manzano deficiente de magnesio ¿es más susceptible al asoleado de los frutos?

Objetivo

- 1) Determinar la influencia del estatus nutricional magnésico de las plantas de manzano en el estrés fotooxidativo de hojas y frutos, analizar la capacidad de disipar la energía a través de la fotosíntesis y evaluar el asoleado de los frutos. Este objetivo responde al objetivo específico número 2 de la presente tesis.

Hipótesis

- La deficiencia de magnesio aumenta el estrés oxidativo en plantas de manzano, afectando su susceptibilidad a la alta radiación solar.

- La deficiencia de Mg afecta la translocación de fotoasimilados en plantas de manzana y, por ende, la disipación de energía solar a través de la fotosíntesis.

- Plantas con adecuado estatus nutricional de magnesio, se encuentran en mejores condiciones para soportar elevada radiación solar, disminuyendo las pérdidas en producción por baja calidad de los frutos.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Se trabajó con hojas y frutos de plantas de manzano (*Malus domestica* Borkh.) cultivar Cripp's Pink. Se seleccionó este cultivar debido a que es susceptible a deficiencias de magnesio según información brindada por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). En función de resultados de análisis foliares de años previos, se seleccionó la parcela 5N3-EEA Alto Valle INTA, ya que presentaba un historial de valores foliares de Mg bajos (entre 0,18 y 0,20 %). La preparación de la parcela, para lograr los niveles nutricionales adecuados para el ensayo, comenzó en la primavera de la temporada de crecimiento 2014-2015, e implicó realizar fertilizaciones durante 3 ciclos, para finalmente realizar los muestreos durante la última temporada de trabajo, 2016-2017.

2.2. Diseño experimental y establecimiento de los tratamientos

Durante la primavera de la temporada 2014, se seleccionaron 10 plantas de manzano lo más homogéneas posibles en tamaño y vigor. Las plantas seleccionadas presentaban un perímetro basal promedio de 25 ± 2 cm. Se separaron en dos grupos y se establecieron dos tratamientos:

1. -Mg, tratamiento deficiente de magnesio: se realizaron aplicaciones de K con el objetivo de inducir la deficiencia de Mg por antagonismo con K en el proceso de absorción radicular. Para ello se aplicó 1 kg de K/planta por temporada de crecimiento (suministrado como KSO₄). El K fue aplicado en dos momentos: 0,5 kg en primavera y 0,5 kg previo a la cosecha (Tabla 4.1). La aplicación del potasio disuelto en agua se realizó vía suelo, en dos pozos de 20-30 cm de profundidad al pie de cada planta (Figura 4.1 A).

2. +Mg, tratamiento no deficiente de magnesio: se realizaron aplicaciones foliares de Mg al 0,1 % (1 % de MgSO₄) durante la estación de crecimiento para asegurar un porcentaje de magnesio en hoja superior a 0,24 %. Este valor es informado como límite inferior a partir del cual se considera deficiencia de Mg en plantas de manzano (Sanchez, 1999). Las frecuencias y fechas de aplicación se pueden observar en la Tabla 4.1. Las aplicaciones se realizaron temprano en la mañana con las condiciones climáticas adecuadas, con una mochila aspersora (Stihl SR450) utilizando un volumen aproximado de 1,5 litros de caldo por planta y con el agregado de un tensioactivo siliconado (Silwet) a razón de 0,03 % (Figura 4.1 B).

Tabla 4.1 Fechas de fertilizaciones en manzano Cripp's Pink.

Tratamiento	Nutriente aplicado	Fecha de tratamientos realizados según temporada		
		2014-2015	2015-2016	2016-2017
-Mg	Potasio 0,5 k/planta	3/12/2014	28/10/2015	20/10/2016
		6/4/2015	7/4/2016	-
+Mg	Magnesio 0,1 %	Dos aplicaciones:	Cinco aplicaciones:	Tres aplicaciones:
		21/1/2015	3/11/2015	7/11/2016
		28/1/2015	17/11/2015	24/11/2016
			4/12/2015	7/12/2016
			14/12/2015	
		28/12/2015		



Figura 4.1. Aplicación de magnesio en forma foliar (Fig. A) y potasio vía suelo (Fig. B) en manzano Cripp's Pink.

2.3. Muestreos y determinaciones realizadas.

2.3.1. Contenido nutricional

Se realizó el análisis de contenido nutricional en hojas durante las tres temporadas de estudio, y en piel de frutos solo durante la última temporada. Las muestras fueron lavadas, secadas en estufa y luego enviadas a laboratorio para su análisis (metodologías en Capítulo II).

2.3.2. Determinaciones realizadas en hojas.

Durante el mes de febrero de la última temporada de estudio (a los 149 y 151 DDPF) se realizaron una serie de muestreos en hojas para su análisis a campo y laboratorio. En cada tratamiento se seleccionaron feminelas⁴ (de entre 15 a 20 cm con un fruto en su base) de la cara norte de las plantas y del exterior de la canopia, creciendo en plena exposición solar (E), y feminelas de la cara sur de las plantas y del interior de la canopia, creciendo no expuestos a la radiación solar directa (NE).

A los 149 DDPF (14/02/2017) sobre la hoja media de cada feminela, y sin ser desprendida de la planta, se evaluó índice verde (SPAD), fluorescencia directa de la clorofila *a* y fotosíntesis neta (metodologías en Capítulo II). Estas mediciones se realizaron durante las horas de mayor radiación solar, entre las 12 y 14 hs. Las

⁴ Feminela: brote vegetativo proveniente de una yema mixta fructífera (lamburda).

condiciones ambientales al momento del muestro se pueden observar en la Tabla 4.2.

A los dos días del primer muestreo (151 DDPF, 16/02/2017), y durante las horas de mayor radiación solar, se recolectaron las mismas hojas, se almacenaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se llevaron al laboratorio. En el laboratorio se determinó: pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g cm}^{-2}$), daño oxidativo de membrana según peroxidación de lípidos ($\text{nmol MDA g}^{-1} \text{PF}$), capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (%) y contenido de polifenoles totales ($\text{mg Ac. Gálico g}^{-1} \text{PF}$). En el mismo momento del muestreo se tomó de la misma feminela, otra hoja del sector medio, pero éstas fueron colocadas en bolsas herméticas y se llevaron al laboratorio. A estas hojas se les evaluó contenido relativo de agua (%), área foliar específica ($\text{cm}^2 \text{mg}^{-1} \text{PS}$), integridad de membrana según pérdida de electrolitos, y contenido de almidón y azúcares ($\text{mg g}^{-1} \text{PS}$). Las metodologías se encuentran detalladas en el Capítulo II.

Tabla 4.2. Condiciones ambientales registradas durante el muestreo de hoja a campo (149 DDPF) de manzano Cripp's Pink

Variables meteorológicas	
Máxima radiación solar (W m^{-2})	618
Temperatura media ($^{\circ}\text{C}$)	23,6
Temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$)	33,3
Radiación PAR exterior canopia ($\mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1800
Radiación PAR interior canopia ($\mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	741

2.3.3. Respuesta de los frutos a la alta radiación solar en condiciones controladas de temperatura e incidencia de la radiación.

A los 143 DDPF (08/02/2017) se tomaron, para cada tratamiento (+Mg y -Mg), 45 frutos del interior de la canopia de la cara sur de las plantas, que crecían no expuestos a la radiación solar directa y se los llevó al laboratorio para su estudio. Se apartaron 10 frutos por tratamiento para evaluar su estado en el momento inicial

(tiempo 0'), y 5 frutos para evaluar fluorescencia directa de la clorofila *a* inicial (tiempo 0'). Los 30 frutos restantes por tratamiento fueron colocados en bandejas y expuestos a radiación solar directa a las 12:00 hs del medio día, con un PAR saturante de 1720 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante todo el ensayo se controló que la incidencia de la radiación solar se mantenga en el mismo sector. Para ello se fueron girando levemente los frutos a medida que pasaba el tiempo. Además, se registró la temperatura superficial de frutos con termocuplas (Tipo T) adheridas a su piel, y se controló que no superase los 40°C (Figura 4.2). En caso de que esto sucediera se refrigeraban durante unos minutos con movimiento de aire generado con ventiladores.

Desde el inicio de la exposición solar y hasta los 60 minutos, se tomaron 5 frutos por tratamiento cada 15 minutos para evaluar la evolución de la fluorescencia de la clorofila *a*. Los 10 frutos restantes se mantuvieron en estas condiciones durante tres horas y luego fueron llevados al laboratorio para evaluar su estado en el momento final (tiempo 180'). En la piel de los frutos del momento inicial (0') y final (180') se determinó: pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g cm}^{-2}$), daño oxidativo de membrana según peroxidación de lípidos ($\text{nmol MDA g}^{-1} \text{PF}$), capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (%) y contenido de polifenoles totales ($\text{mg Ac. Gálico g}^{-1} \text{PF}$). Las metodologías se encuentran detalladas en el Capítulo II.



Figura 4.2. Exposición de frutos de manzano Cripp's Pink a radiación solar directa (Fig. A) y registro de la temperatura superficial con termocuplas (Fig. B).

2.3.4. Evaluación de rendimiento y asoleado a cosecha.

El 6 de abril 2017, a los 200 DDPF, se procedió a realizar la cosecha de las plantas. Se recolectó la totalidad de la fruta de cada planta y se llevó en cajones identificados por planta al laboratorio para su análisis. En el laboratorio se pesó individualmente cada fruto para obtener datos de tamaño medio y frecuencia de distribución de tamaños. Además, se clasificó los frutos según su síntoma de asoleado. Se tomaron muestras de 40 frutos por tratamiento para evaluar índices de madurez. Las metodologías de clasificación e índices de madurez se encuentran detalladas en el Capítulo II.

Todas las determinaciones en hoja y frutos se realizaron con 5 repeticiones. Los datos se analizaron con un análisis de la varianza uni o bifactorial. La comparación de medias a posteriori se realizó mediante DGC test (Di Rienzo *et al.*, 2002), con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha=0,05$).

3. Resultados

3.1 Contenido nutricional

Durante la primera temporada, el contenido nutricional de magnesio fue deficiente para los dos tratamientos, elevándose el porcentaje a partir de la segunda temporada y logrando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos +Mg y -Mg (Tabla 4.3 y Tabla 4.4). En general el contenido del resto de los macronutrientes fue adecuado, salvo para el nitrógeno que durante las tres temporadas se encontró levemente por debajo del rango óptimo de 2 % (Sanchez, 1999).

Tabla 4.3. Contenido foliar de macronutrientes (% PS) en hojas de manzano Cripp's Pink, según tratamiento con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio, para los muestreos realizado a principio de febrero durante las temporadas 2015, 2016 y 2017.

Nutriente (%)	Rango Normal*	Tratamiento según temporada					
		2015		2016		2017	
		-Mg	+Mg	-Mg	+Mg	-Mg	+Mg
Nitrógeno	2,0-2,4	1,78	1,81	1,84	1,76	1,87	1,88
Fosforo	0,19-0,45	0,20	0,23	0,18	0,23	0,18	0,18
Potasio	1,2-2,0	1,13	1,60	1,40	2,21	1,63	1,59
Calcio	1,1-2,5	1,10	1,70	1,23	1,91	1,74	1,64
Magnesio	0,24-0,5	0,18	0,19	0,19	0,26	0,18	0,25

*Concentración de macronutrientes en hojas medias del brote del año, considerados normales para el desarrollo adecuado de plantas de manzano Red Delicious y Granny Smith, según INTA EEA Alto Valle (Sanchez, 1999).

Tabla 4.4. Contenido de magnesio en hojas y piel de frutos de manzano Cripp's Pink, según tratamiento con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio, durante la temporada de muestreo 2017.

Tratamiento	Hoja (% PS)	Piel de frutos (ppm PS)
-Mg	0,18 ± 0,05 ^b	496 ± 8,41 ^b
+Mg	0,25 ± 0,01 ^a	575 ± 23,82 ^a
<i>P (tratamiento)</i>	***	*

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: * (p<0,05), *** (p<0,001).

Durante la temporada de muestreo (febrero 2017) se observaron síntomas foliares de deficiencia de magnesio en el tratamiento -Mg (Figura 4.3). Durante los primeros meses de crecimiento se observó una leve clorosis de tipo lagunar en las hojas adultas. Hacia finales del verano se observó una clorosis marginal internerval característica de esta deficiencia tanto en brotes vegetativos como en hojas de dardos fructíferos (Figura 4.3).



Figura 4.3. Síntoma de deficiencia de magnesio foliar en manzano Cripp's Pink, observados durante la temporada de crecimiento 2016-2017 en el tratamiento de bajo contenido de Mg (-Mg). Clorosis de tipo lagunar en hojas adultas en primavera (noviembre-diciembre, Fig. A, B), clorosis internerval en hojas adultas en verano (enero-febrero, Fig. C), y clorosis internerval en hojas de dardo fructífero con frutos gravemente asoleados hacia el fin del ciclo de crecimiento (febrero-marzo, Fig. D).

3.2 Determinaciones realizadas en hojas.

El contenido de clorofila *a*, clorofila total y la relación clorofila *a/b* en hojas de manzano, fueron significativamente afectados por el tratamiento (Tabla 4.5). Las hojas del tratamiento -Mg presentaron un 11,1, 9,4 y 10,6 % menos de clorofila *a*, clorofila total y relación clorofila *a/b* con respecto al tratamiento +Mg. El índice verde, medido a través del índice SPAD indicó un efecto significativo del tratamiento. Mientras que el contenido de carotenos fue afectado por la interacción entre tratamiento y exposición, presentando el mayor contenido las hojas del tratamiento +Mg expuestas a la radiación solar (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Índice verde (SPAD) y contenido de pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, *b*, total, *a/b* y carotenos *x+c*) en hojas de manzano Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de Mg, expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa.

Tratamiento	Exposición	Pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g cm}^{-2}$)					
		Índice verde	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl total	Chl <i>a/b</i>	Carotenos
-Mg	NE	41,0 \pm 0,7 ^a	41,4 \pm 1,2 ^a	8,3 \pm 0,4 ^a	49,6 \pm 1,5 ^a	5,0 \pm 0,1 ^a	11,5 \pm 0,1 ^a
-Mg	E	42,0 \pm 1,7 ^a	40,9 \pm 0,6 ^a	8,8 \pm 0,2 ^a	49,6 \pm 0,6 ^a	4,7 \pm 0,2 ^a	11,7 \pm 0,4 ^a
+Mg	NE	43,7 \pm 1,1 ^b	46,2 \pm 2,4 ^b	8,7 \pm 0,6 ^a	55,0 \pm 2,3 ^b	5,3 \pm 0,1 ^b	12,1 \pm 0,4 ^a
+Mg	E	44,5 \pm 0,2 ^b	46,3 \pm 1,7 ^b	8,5 \pm 0,4 ^a	54,7 \pm 2,0 ^b	5,5 \pm 0,2 ^b	13,8 \pm 0,4 ^b
<i>p</i> (Tratamiento)		•	**	ns	*	**	**
<i>p</i> (Exposición)		ns	Ns	ns	ns	ns	*
<i>p</i> (Tratamiento \times Exposición)		ns	Ns	ns	ns	ns	•

Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($\alpha=0,05$). Anova *p* valor: ns ($p>0,1$), • ($0,1 < p > 0,05$), * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$).

El contenido de almidón en las hojas fue significativamente afectado por el tratamiento, con una acumulación de almidón del 49,5 % en el tratamiento -Mg (Tabla 4.6). Los azúcares encontrados en las hojas fueron glucosa, sorbitol y fructosa, éste último en cantidades traza. El primero fue significativamente afectado por la exposición a la radiación solar directa, presentando las hojas NE un 65,7 % más de glucosa que las hojas E. En cambio, el contenido de sorbitol no fue afectado por el tratamiento ni por la exposición al sol. A pesar de no encontrarse efecto estadístico del tratamiento en la concentración de glucosa y sorbitol, se observó que las hojas deficientes de Mg presentaron una tendencia a mayor concentración de ambos azúcares (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Contenido de almidón, glucosa, y sorbitol en hojas de manzano Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de Mg, expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa.

Tratamiento	Exposición	Hidratos de Carbono (mg g^{-1} PS)		
		Almidón	Glucosa	Sorbitol
-Mg	NE	9,1 \pm 2,2 ^b	32,0 \pm 7,9 ^b	83,8 \pm 4,0 ^a
-Mg	E	9,3 \pm 0,3 ^b	17,8 \pm 4,0 ^a	74,1 \pm 12,2 ^a
+Mg	NE	6,6 \pm 0,8 ^a	23,8 \pm 3,7 ^b	72,8 \pm 13,9 ^a
+Mg	E	5,7 \pm 0,8 ^a	15,8 \pm 3,7 ^a	66,5 \pm 6,2 ^a
<i>p</i> (Tratamiento)		*	ns	ns
<i>p</i> (Exposición)		ns	*	ns
<i>p</i> (Tratamiento \times Exposición)		ns	ns	ns

Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns ($p>0,1$), * ($p<0,05$).

En el análisis de capacidad fotosintéticas de las hojas, a través de la metodología IRGA, se observó que la fotosíntesis neta fue afectada tanto por el tratamiento como por la exposición a la radiación solar directa (Tabla 4.7). Las hojas del tratamiento +Mg expuestas al sol presentaron la mayor tasa de fotosíntesis neta (PN). El tratamiento +Mg presentó un 18,6 % más de PN que -Mg, mientras que las hojas E presentaron un 63,8 % más de PN que las hojas NE. Una tendencia similar se observó en la transpiración y conductancia estomática, presentando el mayor valor de intercambio gaseoso las hojas +Mg exposición E, y el menor valor las hojas NE tanto del tratamiento +Mg como del tratamiento -Mg (Tabla 4.7). La temperatura del aire de la cámara de medición del instrumental fue similar en todas las mediciones con un valor promedio de 32,3 °C, sin embargo, la temperatura de la hoja en el tratamiento -Mg exposición E fue significativamente mayor al resto de los tratamientos (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Temperatura de hoja, fotosíntesis neta, transpiración y conductancia estomática en hojas de manzano Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de Mg, expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa.

Tratamiento	Exposición	Temperatura de hoja (°C)	Fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Conductancia estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
-Mg	NE	32,3 ± 0,4 ^a	8,3 ± 0,6 ^a	3,6 ± 0,1 ^a	92,8 ± 5,6 ^a
-Mg	E	34,2 ± 0,4 ^b	13,5 ± 0,5 ^c	4,9 ± 0,1 ^c	120,0 ± 4,3 ^c
+Mg	NE	32,2 ± 0,4 ^a	9,8 ± 0,4 ^b	3,7 ± 0,3 ^a	96,9 ± 9,1 ^a
+Mg	E	32,7 ± 0,4 ^a	16,1 ± 0,3 ^d	6,6 ± 0,2 ^b	201,3 ± 5,1 ^b
<i>p (Tratamiento)</i>		*	***		
<i>p (Exposición)</i>		**	***		
<i>p (Tratamiento x Exposición)</i>		•	ns	***	***

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns ($p > 0,1$), • ($0,1 < p < 0,05$) * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

A pesar de las diferencias en transpiración, no se observaron diferencias significativas en el contenido relativo de agua de las hojas (Tabla 4.8). Los cuatro tratamientos presentaron valores por debajo del 55 %. En cambio, el área foliar

específica se vio afectada por la exposición, siendo un 23 % mayor en las hojas NE con respecto a las hojas E (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Contenido relativo de agua y área foliar específica en hojas de manzano Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de Mg, expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa.

Tratamiento	Exposición	Contenido relativo de agua (%)	Área foliar específica (cm ² mg ⁻¹ PS)
-Mg	NE	48,9 ± 0,7 ^a	0,18 ± 0,01 ^b
-Mg	E	51,1 ± 1,9 ^a	0,14 ± 0,01 ^a
+Mg	NE	54,7 ± 2,5 ^a	0,17 ± 0,01 ^b
+Mg	E	50,4 ± 2,1 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
<i>p (Tratamiento)</i>		ns	ns
<i>p (Exposición)</i>		ns	**
<i>p (Tratamiento x Exposición)</i>		ns	ns

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns (*p*>0,05), ** (*p*<0,01).

En el análisis de la etapa fotoquímica primaria por fluorescencia directa de la clorofila *a*, se observó que la mayoría de los parámetros del JIP test analizados fueron significativamente afectados por la exposición. Tales parámetros fueron: los flujos específicos por centro de reacción como ABS/RC, DIO/RC (Figura 4.4 C), TRo/RC (Figura 4.4 D) y REo/RC; los flujos específicos por área seccional excitada como DIO/CS y REo/CS; las eficiencias cuánticas como Fv/Fm (Figura 4.4 A), ψ_{Eo} (Figura 4.4 F), δ_{Ro} y Fo/Fm (Figura 4.4 E); el índice de performance en base a la absorción (PI_{abs}, Figura 4.4 G) y el número de centros de reacción por área excitada (RC/CS, Figura 4.4 B). En estos parámetros no se observó efecto del tratamiento con Mg. En el análisis del índice de performance total (PI_{Total}) se observó que la interacción Tratamiento x Exposición fue significativa (Figura 4.4 H), presentando el tratamiento -Mg E un PI_{Total} 28,7 % menor al tratamiento +Mg E.

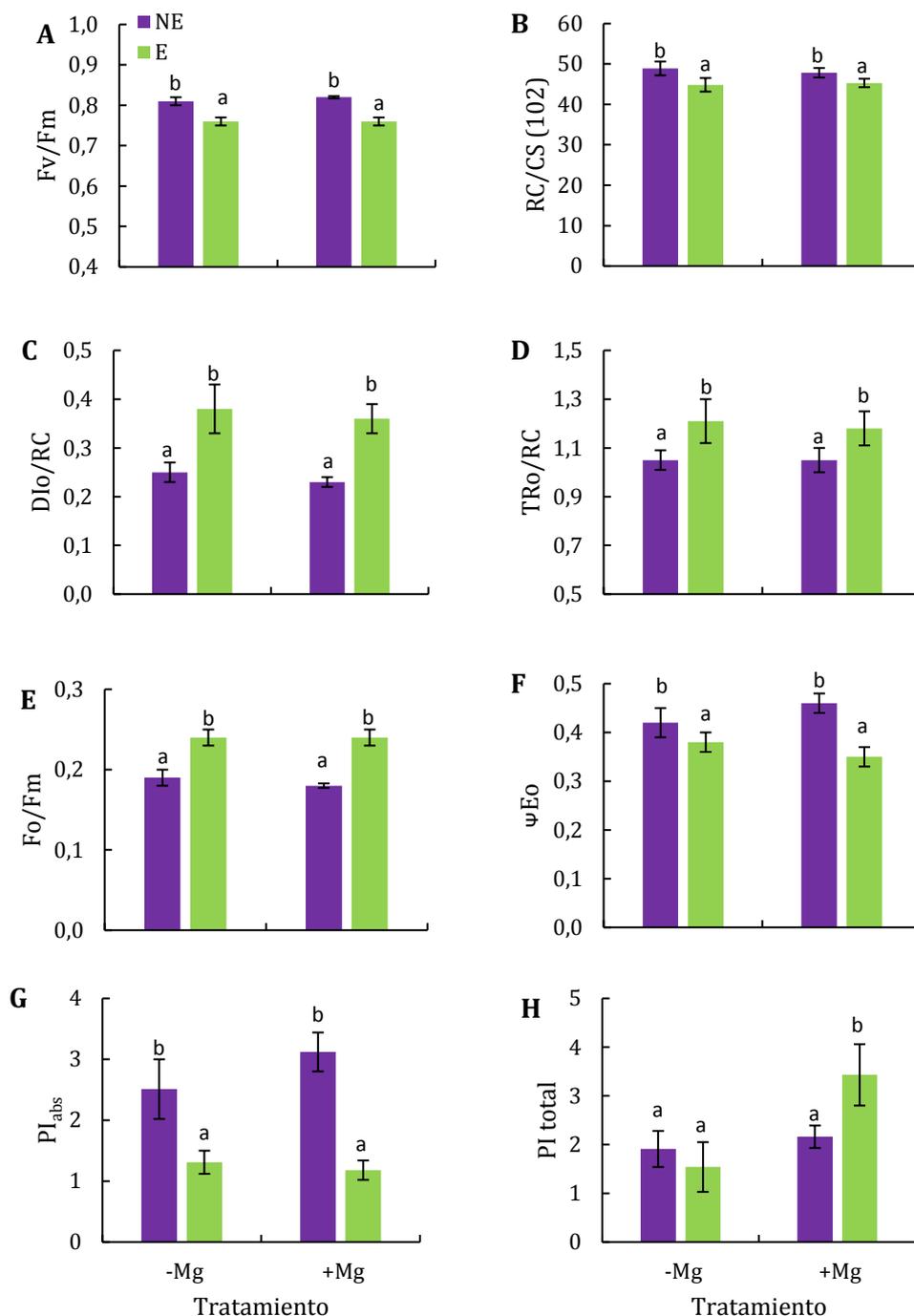


Figura 4.4. Eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria (Fv/Fm, Fig. A), densidad de centros de reacción activo por área excitada (RC/CS, Fig. B), flujo de energía disipada (Dio/RC, Fig. C), flujo de energía atrapada (TRo/RC, Fig. D), rendimiento cuántico máximo de disipación de energía (Fo/Fm, Fig. E), probabilidad con la que un excitón atrapado mueve un electrón en la cadena de transporte de electrones después de Q_A^- (ψE_o , Fig. F), índice de performance de la actividad fotoquímica en base a la absorción (PI_{abs}, Fig. G) e índice de performance de la actividad fotoquímica total (PI total, Fig. H), en hojas de manzana Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio, expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa. Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC (p<0,05).

El daño peroxidativo en membranas (MDA), la integridad de membranas (pérdida de electrolitos) y la capacidad antioxidante total (inhibición DPPH) en hojas de manzano fueron afectados por la exposición a la radiación solar directa, pero no por el tratamiento (Figura 4.5 A, B y C). Las hojas expuestas presentaron un 14,2, 57,3 y 13,3 % más de peroxidación de lípidos, integridad de membrana y capacidad antioxidante total que las hojas no expuestas. El contenido de polifenoles totales fue afectado por la interacción entre tratamiento y exposición, presentando las hojas expuestas del tratamiento -Mg un 57 % más de polifenoles totales que las hojas no expuestas del mismo tratamiento (Figura 4.5 D).

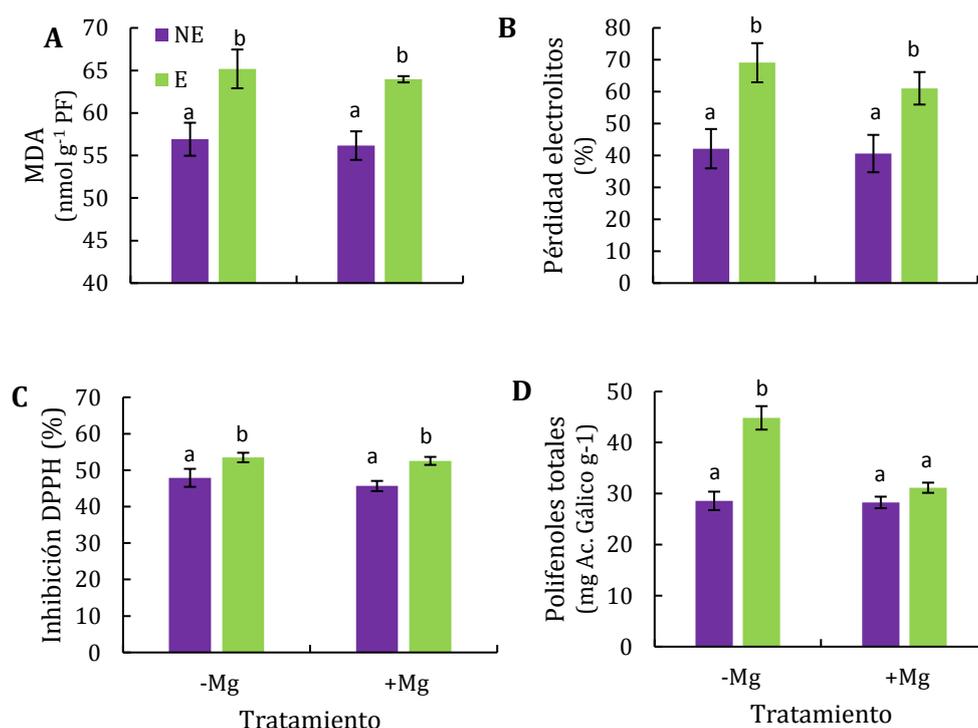


Figura 4.5. Daño oxidativo en membranas medido según contenido de MDA (Fig. A), integridad de membranas según pérdida de electrolitos (Fig. B), capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (Fig. C) y contenido de polifenoles totales (Fig. D) en hojas de manzano Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio, expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa. Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p < 0,05$).

3.3 Respuesta de los frutos a la alta radiación solar en condiciones controladas de temperatura e incidencia de la radiación.

El contenido de clorofila fue significativamente afectado por la exposición a la radiación solar directa, pero no por el tratamiento (Tabla 4.9). Luego de tres horas de exposición se observó en la piel de los frutos una disminución del 19,0, 43,3 y 23,0 % en el contenido de clorofila *a*, *b* y total respectivamente, y un incremento del 52,0 % en la relación clorofila *a/b*. El contenido de carotenos no fue significativamente afectado por el tratamiento, ni el tiempo de exposición (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Contenido de pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, *b*, total, *a/b* y carotenos *x+c*) en frutos de manzano Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de Mg, en el momento 0' y 180' de exposición directa a la radiación solar en condiciones controladas de temperatura e incidencia de la radiación.

Tiempo de Exposición	Tratamiento	Pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g cm}^{-2}$)				
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a+b</i>	Chl <i>a/b</i>	Carotenos
0'	-Mg	2,1 \pm 0,1 ^a	0,6 \pm 0,02 ^a	2,7 \pm 0,1 ^a	3,8 \pm 0,1 ^a	0,7 \pm 0,1 ^a
	+Mg	2,3 \pm 0,1 ^a	0,6 \pm 0,03 ^a	2,8 \pm 0,2 ^a	3,9 \pm 0,2 ^a	0,7 \pm 0,1 ^a
180'	-Mg	1,7 \pm 0,1 ^b	0,3 \pm 0,06 ^b	2,1 \pm 0,1 ^b	5,4 \pm 0,6 ^b	0,6 \pm 0,1 ^a
	+Mg	1,8 \pm 0,1 ^b	0,4 \pm 0,06 ^b	2,2 \pm 0,2 ^b	5,7 \pm 0,9 ^b	0,7 \pm 0,1 ^a
<i>p</i> (Tratamiento)		Ns	ns	ns	ns	ns
<i>p</i> (Tiempo exp)		**	***	**	**	ns
<i>p</i> (Tratamiento x Tiempo exp)		Ns	ns	ns	ns	ns

Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns ($p > 0,1$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

En el análisis de fluorescencia directa de la clorofila *a*, realizado en la piel de los frutos expuestos a la radiación solar directa en condiciones controladas, se observó un deterioro general del funcionamiento de la etapa fotoquímica a partir de los 15 minutos de exposición. Durante los primeros 15 minutos se observó una tendencia a estar en mejores condiciones fotoquímicas el tratamiento +Mg (Figura 4.6). La eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm), la densidad de centros de reacción activos por área excitada (RC/CS), y el pool de plastoquinona reducido (Area), fueron levemente mayor en el tratamiento +Mg durante los primeros 30

minutos (Figura 4.6 A, B y F). El tratamiento -Mg presentó mayor disipación térmica por centro de reacción (D_{Io}/RC) durante los primeros 30 minutos (Figura 4.6 C). El flujo de transporte de electrones por centro de reacción (E_{To}/RC) y la probabilidad con la que un excitón atrapado mueve un electrón en la cadena de transporte de electrones (ψ_{Eo}) fueron mayor durante 60 minutos en el tratamiento +Mg, con una diferencia significativa a los 30 minutos en ambos casos (Figura 4.6 D y E).

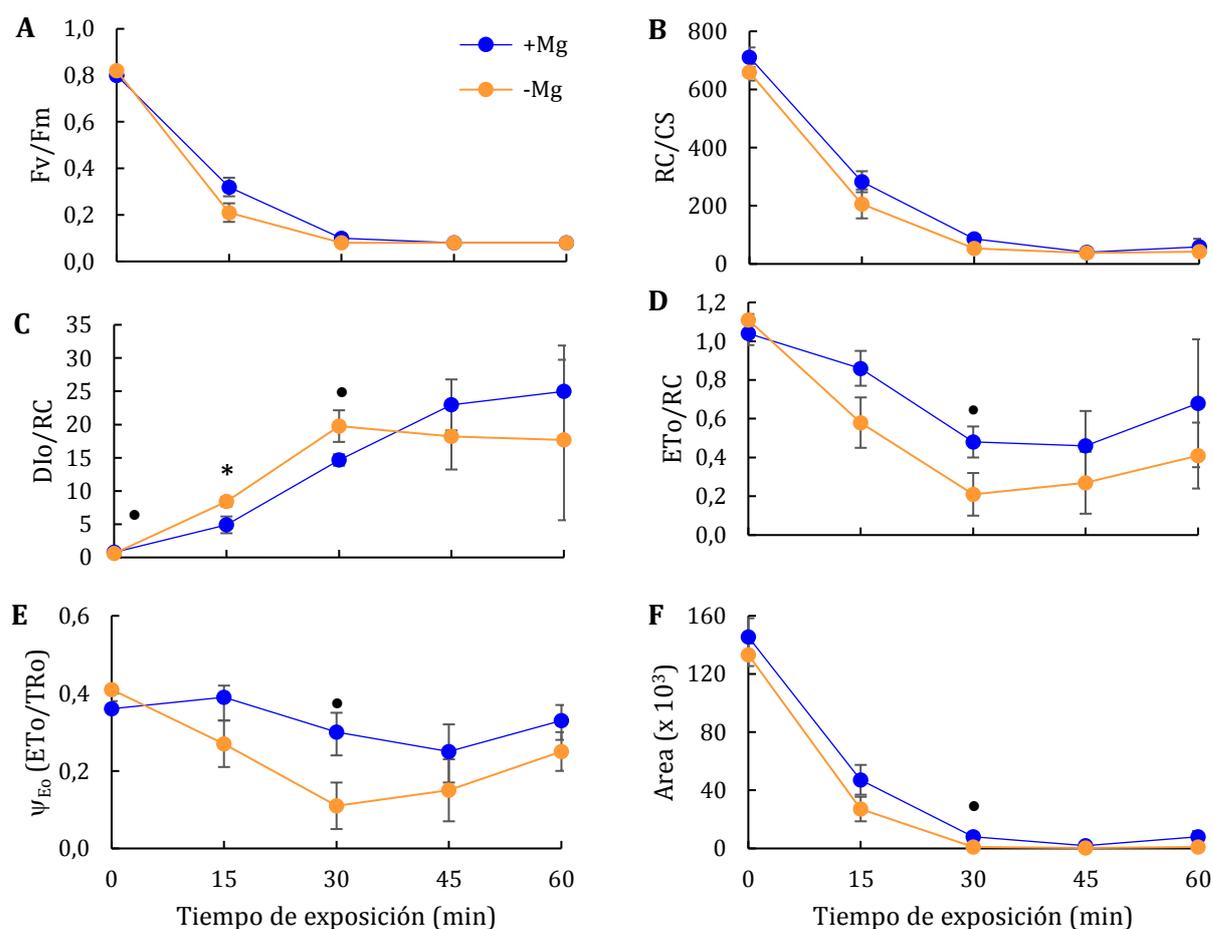


Figura 4.6. Eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m, Fig. A), densidad de centros de reacción activos por área excitada (RC/CS, Fig. B), energía disipada por centro de reacción (D_{Io}/RC, Fig. C), flujo de transporte de electrones por centro de reacción (E_{To}/RC, Fig. D), probabilidad con la que un excitón atrapado mueve un electrón en la cadena de transporte de electrones después de Q_A⁻ (ψ_{Eo} , Fig. E), y pool de plastoquinona reducido (Area, Fig. F) en frutos de manzana Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio, según el tiempo (min) de exposición a la radiación solar directa en condiciones controladas de temperatura e incidencia de la radiación. Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Anova *p* valor: • (0.1 < *p* > 0.05), * (*p*<0,05) para el efecto del tratamiento en cada momento evaluado.

El índice de performance total fue significativamente más alto en los frutos del tratamiento +Mg a los 15 minutos de exposición, disminuyendo abruptamente, e igualándose los dos tratamientos a los 30 minutos (Figura 4.7).

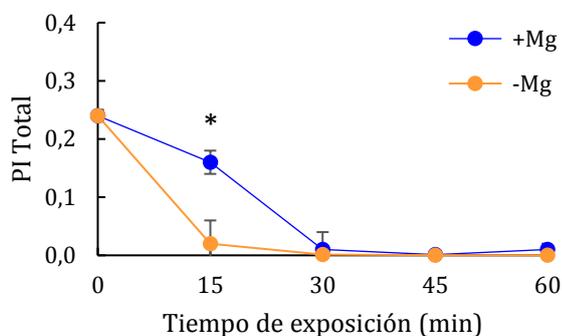


Figura 4.7. Índice de performance de la actividad fotoquímica total (PI total) en frutos de manzana Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio, según el tiempo (min) de exposición a la radiación solar directa en condiciones controladas de temperatura e incidencia de la radiación. Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Anova *p* valor: * ($p < 0,05$) para el efecto del tratamiento en cada momento evaluado.

Luego de tres horas de exposición a la radiación solar de los frutos en condiciones controladas, se observó un incremento significativo del 49,7 % en el daño oxidativo de membranas (Figura 4.8 A). No se observó efecto del tratamiento en esta variable. La capacidad antioxidante total y el contenido de polifenoles totales no fueron afectados por el tratamiento y la exposición (Figura 4.8 B y C).

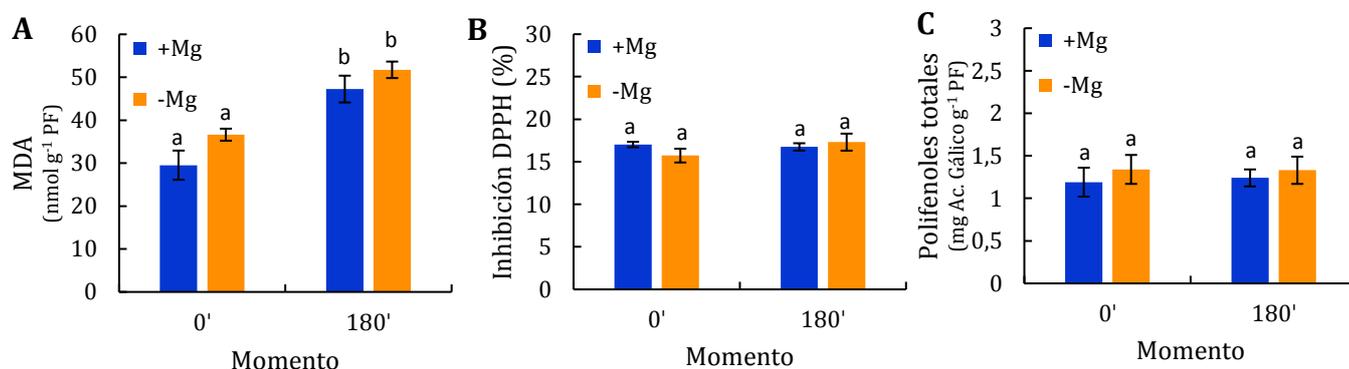


Figura 4.8. Daño oxidativo en membranas medido según contenido de MDA (Fig. A), capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (Fig. B) y contenido de polifenoles totales (Fig. C) en frutos de manzana Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio, en el momento 0' y 180' de exposición directa a la radiación solar en condiciones controladas de temperatura e incidencia de la radiación. Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p < 0,05$).

3.4 Asoleado y rendimiento a cosecha.

El tratamiento -Mg presentó mayor daño por asoleado, con un 16,1 % menos de fruta sana que el tratamiento +Mg (Tabla 4.9). El porcentaje total de fruta con daño por sol fue de 19,4 y 35,4 % para el tratamiento +Mg y -Mg respectivamente. En ambos tratamientos el mayor daño observado fue de tipo grave.

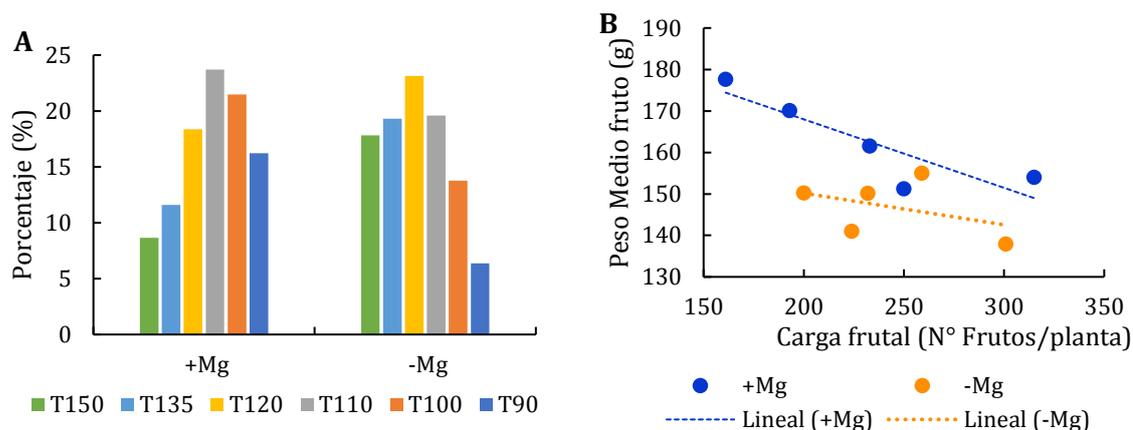
El tratamiento no afectó la carga de frutos por planta, pero sí se observaron diferencias estadísticas en el peso medio del fruto (Tabla 4.9). El tratamiento +Mg presentó frutos con un peso medio un 10,9 % mayor con respecto al tratamiento -Mg. El rendimiento medio por planta fue de 37,0 y 35,6 kg/planta para el tratamiento +Mg y -Mg respectivamente, lo que significó un rendimiento medio de 61,6 y 51,2 tn/ha respectivamente. En la clasificación de los frutos según tamaño comercial, se observó que ambos tratamientos concentraron la mayor cantidad de frutos en un tamaño adecuado para su comercialización de T110-T120, equivalente a frutos entre 160 y 190 g. Pero el tratamiento +Mg presentó un 17 % más de frutos distribuidos en las categorías de tamaños más grandes (T90-T100, Figura 4.9 A). El peso medio de los frutos en función de la carga frutal se interpreta como la capacidad de la planta para alimentar a los frutos, o también como la “capacidad de llenado” de los frutos. En la figura 4.9 B, se observa que, a iguales cargas, el tratamiento +Mg tendría mayor capacidad de llenado.

Al momento de cosecha no se observaron diferencias entre tratamientos en cuanto al estado de madurez de la fruta. Los valores de firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles y porcentaje de degradación de almidón fueron adecuados para la fecha (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Carga frutal, peso medio de fruto y clasificación de frutos según asoleado en sanos, leve y grave, en plantas de manzano Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio.

Tratamiento	Carga (frutos/planta)	Peso medio fruto (g)	Asoleado (%)		
			Sano	Leve	Grave
-Mg	243,2 ± 17,2 ^a	146,9 ± 3,1 ^a	64,5 ± 2,6 ^a	15,8 ± 1,7 ^b	19,6 ± 1,3 ^b
+Mg	230,4 ± 26,2 ^a	162,9 ± 4,9 ^b	80,6 ± 2,1 ^b	8,0 ± 0,6 ^a	11,4 ± 1,6 ^a
<i>p</i> (Tratamiento)	ns	*	**	**	**

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns (*p*>0,1), *p** (*p*<0,05), *p*** (*p*<0,01).

**Figura 4.9.** Distribución de frutos en tamaños comerciales (Fig. A) y capacidad de llenado de frutos (Peso medio de frutos = f (carga frutal), Fig. B), en plantas de manzano Cripp's Pink con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio.**Tabla 4.10.** Índices de madurez al momento de cosecha: firmeza de pulpa, sólidos solubles y degradación de almidón de frutos de manzana Cripp's Pink provenientes de plantas con alto (+Mg) y bajo (-Mg) contenido de magnesio.

Tratamiento	Firmeza (lb pulg ²)	Sólidos Solubles (°Brix)	Degradación de almidón (%)
-Mg	18,5 ± 0,2	14,6 ± 0,1	16,5 ± 1,6
+Mg	18,7 ± 0,2	14,7 ± 0,1	19,6 ± 2,0
<i>p</i> (Tratamiento)	ns	ns	ns

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=40). Anova *p* valor: ns (*p*>0,1).

4. Discusión

En plantas de manzano, concentraciones foliares de Mg entre 0,24 y 0,50 % se consideran normales para un buen crecimiento y rendimiento (Sanchez, 1999). Durante el primer año del ensayo, tanto el tratamiento +Mg como el -Mg, presentaron contenidos de Mg inferiores al rango óptimo, entre 0,19 y 0,18 %

respectivamente. Luego de sucesivas aplicaciones foliares de Mg durante tres temporadas, en el tratamiento +Mg, se logró incrementar el contenido de este nutriente a 0,25 %, alcanzando una diferencia con el tratamiento -Mg estadísticamente significativa, considerada adecuada para evaluar los efectos de la deficiencia de Mg. Por otro lado, no se observaron variaciones significativas en el contenido de Mg y K en el tratamiento -Mg luego de tres años de fertilizaciones con K. En general se acepta que hay un aumento en la absorción de K correlativo con el aumento del K “disponible o intercambiable” en el suelo. A esto se le llama “K luxury consumption”, lo que a su vez afecta la absorción de Mg y Ca (Hawkesford *et al.*, 2012). Es posible que el K agregado no modificara la capacidad de intercambio catiónico (CIC) ni disminuyera la “K capacidad Buffer” del suelo por lo que no se pudo observar disminuciones o incrementos en el contenido de Mg y K respectivamente en el tratamiento -Mg durante las tres temporadas del ensayo.

Las concentraciones de Mg observadas en la piel del fruto presentaron una diferencia estadísticamente significativa del 13,9 % a favor del tratamiento +Mg. Sin embargo, estas concentraciones fueron 35 % menor a la reportada en estudios previos en este misma cultivar por Henríquez *et al.* (2010). En dicho estudio, los autores determinaron el contenido de nutrientes en la pulpa y en la piel de los frutos (sin remanente de pulpa), mientras que en los ensayos de la presente tesis las muestras de piel enviadas al laboratorio incluían 2 a 3 mm de pulpa, lo que podría haber diluido la concentración de este nutrientes ya que la pulpa presenta un 70 % menos de Mg que la piel (Henríquez *et al.*, 2010).

Bajas concentraciones de Mg en el tratamiento -Mg (18 %), repercutieron de forma visible en el color de las hojas. La presencia de una clorosis internerval en hojas adultas de brotes vegetativos, feminelas y dardos fructíferos, fue consistente

con estudios previos realizados en manzana (Bennett, 1993). La clorosis foliar generalmente se atribuye a la degradación de clorofila. En el presente estudio, se determinó que la deficiencia de Mg afectó significativamente el contenido de clorofila en hojas de manzano. Resultados similares fueron reportados en plantas frutales por Balakrishnan *et al.* (2000) en mango, por Yang *et al.* (2012) en naranjo y pomelo chino (*Citrus grandis*), y por Meireles da Silva *et al.* (2014) en dos variedades de café. La degradación de la clorofila puede ser en parte explicado por la removilización del Mg a órganos de mayor demanda de este nutriente, como hojas y brotes jóvenes en activo crecimiento (Verbruggen y Hermans, 2013). Según Hawkesford *et al.* (2012) el incremento en la translocación de Mg, en plantas deficientes de este nutriente, es indicado además por mayores tasas de degradación de proteínas, incluyendo proteínas estructurales de los tilacoides. La reducción del contenido de clorofila *a* y *b*, pero sobre todo de la relación clorofila *a/b*, se atribuye a la degradación del centro de reacción del complejo antena del PSII, con la consecuente pérdida de la capacidad fotosintética (Meireles da Silva *et al.*, 2014).

A diferencia de lo observado en el Capítulo III de la presente tesis, no se observó efecto de la exposición a la radiación solar en el contenido de clorofila en las hojas. Sin embargo, parámetros de estrés oxidativo evaluados, como peroxidación de lípidos, confirmaron la situación de estrés por alta radiación solar.

El contenido de carotenos fue afectado por la interacción Tratamiento x Exposición, presentando mayor cantidad de carotenos el tratamiento +Mg exposición E. El complejo de carotenoides denominado ciclo de las xantófilas, es un mecanismo fotoprotector presente en las plantas, que a través de la de-epoxidación de violaxantina a zeaxantina disipa energía en forma de calor cuando la energía lumínica absorbida por las plantas supera su capacidad fotosintética (Demmig-

Adams *et al.*, 1995). Estos mismos autores han reportado que hojas que crecen expuestas al sol, presentan entre dos a tres veces más xantófilas que las hojas que crecen en la sombra. Esto podría explicar el incremento de carotenos observado en las hojas +Mg exposición E con respecto a las hojas +Mg exposición NE. Sin embargo, en el tratamiento -Mg no se observó este incremento en las hojas expuestas. Esto podría deberse tanto a la degradación de los carotenoides por fotooxidación (Abdel-Kader, 2004), como a la menor capacidad de sintetizar nuevas sustancias para afrontar la situación de estrés fotooxidativo. Disminuciones en el contenido de carotenos ha sido reportado previamente en plantas deficientes de Mg, en condiciones normales de luz, tales como café (Meireles da Silva *et al.*, 2014) y menta (Candan y Tarhan, 2003), y en plantas de espinaca expuestas a alta intensidad lumínica (Abdel-Kader, 2004).

El metabolismo de las plantas está condicionado por el estado hídrico de los tejidos. El contenido relativo de agua permite estimar el status hídrico de los tejidos (Smart y Bingham, 1974). Los valores de contenido relativo de agua de las plantas muestreadas fueron alrededor del 50 % sin observarse diferencias estadísticas entre tratamientos. Estos valores, a pesar de ser bajos, son consistentes con ensayos previos realizados por el grupo de Fisiología Vegetal de FCA-UNCo en plantas de manzano estresadas por condiciones ambientales de alta temperatura y alta intensidad de radiación (Colavita, comunicación personal). Estudios previos llevados a cabo en manzano cultivar Fuji y en dos especies de portainjerto de manzano (*Malus hupehensis* y *Malus prunifolia*) se observaron valores de contenido relativo de agua inferiores al 50 % en plantas que no fueron regadas por 10 a 25 días (Jie *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012).

En los ensayos de la presente tesis, la actividad metabólica de las plantas podría haber sido afectada por el bajo valor del contenido relativo de agua. Por lo que es importante destacar que los resultados aquí obtenidos son válidos para las condiciones de los ensayos planteados.

En general, en la mayoría de las plantas, el mayor producto de la fotosíntesis es la sacarosa. Sin embargo muchos autores han reportado que en las plantas leñosas de la familia de las Rosáceas, a la cual pertenece el manzano, el azúcar-alcohol sorbitol (D-glucitol) es el principal fotosintato, seguido por sacarosa en menor proporción (Colaric *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2018). Šircelj *et al.* (2005) han reportado que en hojas adultas del cultivar de manzano *Elstar*, el sorbitol representó hasta el 47,8 % del total de azúcares, mientras que la sacarosa representó el 27,6 %. En estudios recientes, realizados en hojas de manzano cultivar Fuji, se observaron valores de sacarosa hasta 15 veces inferior al contenido de sorbitol (Li *et al.*, 2018). En los ensayos de la presente tesis, en manzano Cripp's Pink, se detectó la presencia de sorbitol y glucosa en hojas adultas, siendo el primero hasta el 80 % del total de los azúcares encontrados. Resultados similares fueron reportados por Colaric *et al.* (2006) en hojas adultas de pera cultivar *William's* y por Li *et al.* (2018) en hojas de manzana cultivar Fuji. En las hojas analizadas en los ensayos de la presente tesis no se detectó sacarosa. Es posible que la concentración de sacarosa se encontrara por debajo del límite de detección de la técnica utilizada ($5 \mu\text{g mg}^{-1}$).

La deficiencia de Mg no afectó significativamente el contenido de azúcares, pero se observó una tendencia a una mayor concentración en hojas deficientes de Mg. El contenido de almidón fue significativamente afectado por la deficiencia de Mg, con un 63,1 % más de almidón en las hojas deficientes de Mg y expuestas a

radiación solar. Resultados similares fueron reportados por Hermans y Verbruggen (2005) en *arabidopsis*.

La acumulación de hidratos de carbono en órganos fuente en condiciones de deficiencia de Mg ha sido reportado por numerosos autores (Cakmak *et al.*, 1994; Hermans *et al.*, 2004; Hermans y Verbruggen, 2005; Cakmak y Kirkby, 2008; Esfandiari *et al.*, 2010). Generalmente precede a la inhibición del crecimiento de órganos destino, la disminución de la tasa fotosintética y la aparición de clorosis foliar (Verbruggen y Hermans, 2013). La acumulación de fotosintatos en hojas fuente puede deberse a: (a) daño estructural y desestabilización de tejidos floemáticos; (b) disminución de la actividad metabólica en órganos destino; o (c) a la carga de floema afectada (Verbruggen y Hermans, 2013). El Mg es esencial para la carga de azúcares al floema. En el caso de la carga de sacarosa, el Mg interactúa con el nucleótido trifosfato (Mg-ATP) que alimenta las H⁺-ATPasas, lo que crea la fuerza motriz del protón que energiza el cotransportador de sacarosa BvSUT1 (Verbruggen y Hermans, 2013). En el manzano se identificaron al menos 5 transportadores MdSOTs, encargados de la carga de sorbitol al floema (Watari *et al.*, 2004). Estos mismos autores sugieren que los transportadores MdSOTs actuarían como cotransportadores H⁺/sorbitol. Por lo tanto, sería esperable que una deficiencia de Mg afecte la translocación floemática de sorbitol de igual manera que ha sido reportado por Verbruggen y Hermans (2013) para la sacarosa. Ante la acumulación de estos azúcares en hojas fuente, aumentaría la síntesis de almidón como sustancia de reserva.

El efecto de la deficiencia de Mg en la fotosíntesis neta ha sido reportado en numerosas especies (Sun y Payn, 1999; Laing *et al.*, 2000; Ridolfi y Garrec, 2000; Hariadi y Shabala, 2004; Farhat *et al.*, 2016). La tasa de fotosíntesis neta puede ser

influenciada por la nutrición mineral de varios modos. Un ejemplo de la participación directa de los nutrientes en la “fase lumínica” de la fotosíntesis es el flujo de Mg y K desde el lumen hasta el estroma de los cloroplastos para mantener el equilibrio de cargas debido al flujo y la generación de protones en el lumen (Engels *et al.*, 2012). El magnesio también interviene en la modulación de la actividad de las enzimas fotosintéticas claves, como de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), que cataliza el primer paso importante de la fijación de carbono en la “fase oscura” (Engels *et al.*, 2012; Verbruggen y Hermans, 2013). En los ensayos de la presente tesis, realizados en manzano, se observó que la deficiencia de Mg afectó significativamente la tasa fotosintética tanto en hojas expuestas y no expuestas a la radiación solar. La mayor tasa fotosintética se observó en hojas +Mg exposición E. La tasa fotosintética en hojas de sombra es generalmente menor por una restricción lumínica en el interior de la canopia. El incremento en la densidad de flujo fotónico por encima del punto de compensación resulta en un incremento proporcional en la fotosíntesis (Taiz *et al.*, 2014). La tasa transpiratoria y conductancia estomática fueron afectadas por la interacción Tratamiento x Exposición. Las plantas +Mg exposición E presentaron la mayor tasa transpiratoria y conductancia estomática, mientras que las plantas NE tanto +Mg como -Mg, obtuvieron las tasas más bajas. Las plantas -Mg exposición E, al estar en condiciones de exposición a la radiación solar y presentar menor tasa transpiratoria, presentaron además una temperatura de hoja 2°C superior al resto de los tratamientos, indicando una menor capacidad de la planta para refrigerarse. Según Verbruggen y Hermans (2013) la disminución en la asimilación de CO₂ no sería causada por una limitación estomática (por ejemplo conductancia estomática), ya que está acompañada por una concentración intracelular de CO₂ más alta. La

productividad fotosintética es influenciada por la eficiencia de la traslocación de los fotoasimilados debido a una inhibición de producto (Ayre, 2011), por lo tanto la acumulación de hidratos de carbono en las hojas deficientes de Mg puede desencadenar una disminución de la fotosíntesis (Hermans *et al.*, 2006). A partir de los resultados obtenidos en el presente capítulo el efecto de la deficiencia de Mg en la fotosíntesis en plantas de manzano, podría deberse tanto a una participación directa del Mg en el proceso, como por ejemplo activador de la enzima Rubisco (Engels *et al.*, 2012), como a un efecto indirecto por acumulación de fotoasimilados en las hojas (Verbruggen y Hermans, 2013).

La etapa fotoquímica fue afectada por la exposición a la radiación solar. Tal como se discutió en el Capítulo III de la presente tesis, el estrés por alta radiación solar se observa en una menor eficiencia cuántica del PSII, una mayor disipación de energía y por ende una menor capacidad de procesar químicamente la luz. La deficiencia de Mg no afectó los parámetros fotoquímicos primarios en base a la absorción. Estudios previos realizados en remolacha y arabidopsis (Hermans *et al.*, 2004; Hermans y Verbruggen, 2005), reportaron que la deficiencia de Mg afectó el índice de performance en base a la absorción (PI_{abs}) que contempla el funcionamiento principalmente del PSII. En los ensayos de la presente tesis no se observó un efecto significativo de la deficiencia de Mg en el PI_{abs} , aunque sí se detectó una tendencia a un menor PI_{abs} en el tratamiento -Mg exposición NE con respecto a +Mg exposición NE. Además, se observó efecto de la interacción Tratamiento x Exposición en el índice de performance total (PI_{Total}) que contempla la etapa fotoquímica hasta los últimos aceptores de electrones del PSI. Estas observaciones fueron consistentes con estudios previos realizados en cítricos (Yang *et al.*, 2012). Estudios llevados a cabo en hojas de remolacha (Ceppi *et al.*, 2012), en pomelo chino

y naranjo (Yang *et al.*, 2012) indicaron que la amplitud de la fluorescencia variable relativa entre la etapa I a P, que se correlaciona con la actividad de PSI, disminuyó en función de la deficiencia de Mg. Otros estudios realizados a partir de observaciones espectroscópicas en el infrarrojo cercano en hojas deficientes en Mg indicaron una pérdida de centros PSI totales por área foliar y una limitación en el pool de PSI disponibles para participar en el transporte de electrones (Hermans *et al.*, 2004). Bajo tales condiciones es esperable que, en plantas deficientes de Mg, la actividad fotoquímica total se vea afectada por una limitación en el pool de PSI afectando, por ende, el PI_{Total} .

Tanto la peroxidación de lípidos de membrana, como la pérdida de electrolitos y la capacidad antioxidante total, fue mayor en las hojas expuestas a la radiación solar, corroborando que se encontraban en situación de estrés oxidativo. Sin embargo, estos parámetros evaluados no fueron afectados por la deficiencia de Mg. Estudios realizados en hojas de menta, espinaca, trigo, naranjo, pomelo chino y café (Candan y Tarhan, 2003; El-Abdin Abdel-Kader, 2004; Esfandiari *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012; Meireles da Silva *et al.*, 2014) reportaron un incremento en el nivel de peroxidación lipídica en condiciones de deficiencia de Mg. Mientras que en plantas de mora se observó la situación opuesta, con una disminución importante de la peroxidación de lípidos en plantas deficientes de Mg (Kumar Tewari *et al.*, 2006).

Trabajos realizados en menta, trigo, naranjo, pomelo chino y café (Candan y Tarhan, 2003; Esfandiari *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012; Meireles da Silva *et al.*, 2014) coinciden en el incremento de la actividad del metabolismo antioxidante en condiciones de deficiencia de Mg. Sin embargo, en el presente estudio no se observó lo mismo. Si bien la capacidad antioxidante total se vio incrementada en condiciones de exposición al sol, no fue afectada por la deficiencia de Mg. Los niveles de estatus

nutricional magnésico contrapuestos en este estudio podrían no ser suficientes para generar cambios en el metabolismo oxidativo detectable por las técnicas utilizadas.

El contenido de polifenoles totales en hojas fue afectado por la interacción Tratamiento x Exposición. La biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos es una de las respuestas más comunes de las plantas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, indicando su participación en el proceso de aclimatación al estrés (Juszczuk *et al.*, 2005). Los fenoles son metabólicos secundarios en las plantas que incluyen un gran grupo de compuestos biológicamente activos, sintetizados en su mayor parte por la vía del ácido shikimico (Carbone *et al.*, 2011). Los flavonoides, son una clase importante de polifenoles que se encuentran en las frutas y hortalizas, siendo las manzanas una fuente importantes de este tipo de fitoquímicos (Carbone *et al.*, 2011). La capacidad antioxidantes de estos compuestos ha sido demostrada en numerosos estudios en los últimos años (Henríquez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Carbone *et al.*, 2011).

Estudios previos han reportado que las deficiencias nutricionales afectan el contenido de fenoles totales en las plantas (Juszczuk *et al.*, 2005). La deficiencia de nitrógeno resultó en la biosíntesis y acumulación de los compuestos fenólicos (Dakora y Phillips, 1996) y en un marcado incremento en la actividad de la enzima clave del metabolismo del fenilpropanoide, la L-fenilalanina amonioliasa (PAL), en tomate y frijol (Bongue-Bartelsman y Phillips, 1995; Sánchez *et al.*, 2000). Además, ha sido reportado que deficiencias de fósforo, azufre, hierro, calcio o magnesio estimula la producción de compuestos fenólicos en tejidos vegetales (Gershenzon, 1984).

Los resultados obtenidos muestran un incremento en la cantidad de polifenoles en las hojas deficientes de Mg que se encontraban en condiciones de alta

radiación solar, indicando que el incremento en la biosíntesis de polifenoles podría estar relacionado no solo con la deficiencia de Mg, sino también con compuestos protectores del estrés por alta radiación solar.

El contenido de pigmentos fotosintéticos en la piel de los frutos que crecían no expuestos a la radiación solar no fue afectado por el tratamiento, pero sí lo fue por la exposición a la radiación solar directa en condiciones controladas. La clorofila *b* presentó el mayor porcentaje de degradación. Normalmente la cantidad de las proteínas de antena del PSII más externas (periféricas) cambian en respuesta a las condiciones de luz, mientras que las otras proteínas de antena del PSII, es decir, las proteínas del núcleo del complejo antena, permanecen sin cambios incrementando la relación clorofila *a/b* (Zivcak *et al.*, 2014). A pesar de que los frutos provenían de plantas +Mg y -Mg, no se observó una respuesta diferencial en la degradación de clorofila en función del tratamiento.

En el análisis de la etapa fotoquímica a través de la fluorescencia directa de la clorofila *a*, se observó que la respuesta de los frutos a la radiación solar directa fue más drástica en el ensayo en condiciones controladas (con los frutos desprendidos de las plantas) que en el ensayo a campo realizado previamente (Capítulo III de la presente tesis). A partir de los 15 minutos de exposición al sol en condiciones controladas, los frutos presentaron un deterioro general del funcionamiento de la etapa fotoquímica. Sin embargo, los frutos provenientes del tratamiento +Mg, se mantuvieron en mejores condiciones durante al menos los primeros 30 minutos del ensayo, observado principalmente en una mayor eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m), densidad de centros de reacción activos por área excitada (RC/CS), y pool de plastoquinona reducido (Area), y en una menor disipación térmica por centro de reacción (D_{I_0}/RC), indicando una mayor capacidad de procesar químicamente la

luz. El índice de performance total de la etapa fotoquímica fue menor en los frutos del tratamiento -Mg durante los primeros 15 minutos, tal como se observó y se discutió previamente en hojas del tratamiento -Mg.

Luego de tres horas de exposición de los frutos a la radiación solar directa en condiciones controladas se observó un incremento en el daño oxidativo de membranas, sin cambios en la capacidad antioxidante total y el contenido de polifenoles totales. En las condiciones ensayadas, la deficiencia de Mg no afectó estos parámetros evaluados, al igual que el contenido de clorofila. Posiblemente se debería evaluar en un lapso de tiempo menor para observar si hay una diferencia en la tasa de degradación de clorofila e incremento de peroxidación de lípidos.

A pesar de que en el ensayo en condiciones controladas no se observó efecto del tratamiento en la susceptibilidad de los frutos al daño oxidativo, las plantas deficientes de Mg presentaron un mayor porcentaje de frutos asoleados, repercutiendo significativamente en la cantidad de fruta comercializable. Como ya se discutió previamente, la deficiencia de Mg en el incremento de la susceptibilidad a la radiación solar está relacionada con alteraciones fisiológicas del metabolismo fotosintético, y no directamente con la función del Mg como átomo central de la clorofila. Es por esto que suponemos que el mayor porcentaje de asoleado de los frutos es una respuesta a una menor capacidad general de la planta, sobre todo de las hojas de feminelas acompañantes de frutos, de procesar la luz y de refrigerarse a través de la transpiración y circulación del agua, que a un cambio en el metabolismo mismo en la piel de los frutos.

Plantas de manzano deficientes de Mg, presentaron frutos más chicos y de menor peso. La menor translocación de azúcares en hojas de feminelas de plantas de manzano deficientes de Mg, observada por la acumulación de almidón, habría

afectado el crecimiento de los frutos y el rendimiento productivo. Resultados similares fueron reportado en el crecimiento de brotes de remolacha (Hermans *et al.*, 2004), café (Meireles da Silva *et al.*, 2014), mora (Kumar Tewari *et al.*, 2006), naranjo y pomelo chino (Yang *et al.*, 2012).

5. Conclusiones

La deficiencia de Mg ha sido caracterizada en varias especies de plantas a través del cultivo hidropónico al disminuir u omitir Mg en soluciones nutritivas. Una gran cantidad de perturbaciones fisiológicas en relación con la deficiencia de Mg han sido documentadas en plantas hortícolas, cereales, forestales y en algunos frutales como cítrico, mango y mora. En el presente estudio realizado en condiciones de campo, plantas de manzano adultas deficientes de Mg y en condiciones de alta radiación solar presentaron: menor contenido de clorofila, menor contenido de carotenos, mayor concentración de almidón, menor tasa de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática, menor índice de performance total de la etapa fotoquímica y mayor contenido de polifenoles totales en sus hojas. En los frutos expuestos a la radiación solar en condiciones controladas se observó menor índice de performance total de la etapa fotoquímica.

A pesar de que no se observó efecto de la deficiencia de Mg en el daño oxidativo de membranas y capacidad antioxidante, tanto en hojas como en frutos de manzano, las alteraciones observadas indican una menor capacidad de procesar químicamente la luz y una mayor susceptibilidad potencial al estrés por alta radiación.

La acumulación de almidón en hojas deficientes de Mg indicaría una limitación en la traslocación de azúcares, limitando a su vez la tasa de fotosíntesis neta y por ende la disipación de energía solar a través de este proceso.

La conjunción de estas alteraciones fisiológicas en condiciones de deficiencia de Mg resultó en plantas de manzano con mayor porcentaje de frutos asoleados y menor rendimiento productivo al presentar frutos de menor tamaño. Por lo tanto, plantas con adecuado estatus de magnesio nutricional, se encuentran en mejores condiciones para soportar climas con elevada radiación solar, disminuyendo las pérdidas en producción por baja calidad de los frutos.

6. Referencias

- Abdel-Kader DZE-A (2004) Protective systems against active oxygen species in Spinach: response to high light stress and Mg-deficiency. *Egypt J Biol* 6: 62–71
- Anza M, Riga P (2001) Effect of magnesium deficiency in antioxidant enzymes from pepper plants (*Capsicum annum* L.). *Acta Hort* 559: 365–370
- Anza M, Riga P, Garbisu C (2005) Time course of antioxidant responses of *Capsicum annum* subjected to a progressive magnesium deficiency. *Ann Appl Biol* 146: 123–134
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391–396
- Ayre BG (2011) Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Mol Plant* 4: 377–394
- Balakrishnan K, Rajendran C, Kulandaivelu G (2000) Differential responses of iron, magnesium, and zinc deficiency on pigment composition, nutrient content, and photosynthetic activity in tropical fruit crops. *Photosynthetica* 38: 477–479
- Bennett WF (1993) Nutrient deficiency and toxicities in crop plants. APS Press
- Bongue-Bartelsman M, Phillips DA (1995) Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol Biochem* 33: 539–546
- Boxler-Baldoma C, Lütz C, Heumann HG, Siefermann-Harms D (2006) Structural changes in the vascular bundles of light-exposed and shaded spruce needles suffering from Mg deficiency and ozone pollution. *J Plant Physiol* 163: 195–205
- Boyton D (1946) Magnesium nutrition of apple trees. *Am. Chem. Soc. Div. Fertil. Chem.*
- Boyton D, Compton OC (1945) Leaf analysis in estimating the potassium, magnesium, and nitrogen needs of fruit trees. *Soil Sci* 59: 339–352
- Cakmak I, Hengeler C, Marschner H (1994) Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *J Exp Bot* 45: 1251–1257
- Cakmak I, Kirkby EA (2008) Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. *Physiol Plant* 133: 692–704
- Cakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol* 98: 1222–1227
- Cakmak I, Yazici AM (2010) Magnesium: A Forgotten Element in Crop Production. *Better Crop* 94: 23–25
- Candan N, Tarhan L (2003) Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg²⁺ deficiency in the *Mentha pulegium* leaves. *Plant Physiol Biochem* 41: 35–40

- Carbone K, Giannini B, Picchi V, Scalzo R Lo, Cecchini F (2011) Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chem* 127: 493–500
- Ceppi MG, Oukarroum A, Çiçek N, Strasser RJ, Schansker G (2012) The IP amplitude of the fluorescence rise OJIP is sensitive to changes in the photosystem I content of leaves: A study on plants exposed to magnesium and sulfate deficiencies, drought stress and salt stress. *Physiol Plant* 144: 277–288
- Colaric M, Stampar F, Hudina M (2006) Changes in sugars and phenolics concentrations of Williams pear leaves during the growing season. *Can J Plant Sci* 1203–1208
- Dakora FD, Phillips DA (1996) Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend antimicrobial definitions of phytoalexins. *Physiol Mol Plant Pathol* 49: 1–20
- Demmig-Adams B, Adams WI, Logan B, Verhoeven A (1995) Xanthophyll Cycle-Dependent Energy Dissipation and Flexible Photosystem II Efficiency in Plants Acclimated to Light Stress. *Aust J Plant Physiol* 22: 249
- Engels C, Kirkby E, White P (2012) Mineral Nutrition, Yield and Source – Sink Relationships. *In P Marschner, ed, Marschner's Miner. Nutr. High. Plants, Third Edit. Elsevier Ltd, USA, pp 85–134*
- Esfandiari E, Shokrpour M, Alavi-Kia S (2010) Effect of Mg Deficiency on Antioxidant Enzymes Activities and Lipid Peroxidation. *J Agric Sci* 2: 131–136
- Farhat N, Elkhouni A, Zorrig W, Smaoui A, Abdelly C, Rabhi M (2016) Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning. *Acta Physiol Plant* 38: 145
- Ford EM (1964) The control of magnesium deficiency in apple rootstock stoolbeds. *J Horticult Sci* 39: 212–223
- Gershenson J (1984) Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *In B Timmermann, C Steelink, F Loewus, eds, Phytochem. Adapt. to Stress. Recent Adv. Phytochem. Springer, US, New York, p 273–320.*
- Hariadi Y, Shabala S (2004) Screening broad beans (*Vicia faba*) for magnesium deficiency. II. Photosynthetic performance and leaf bioelectrical responses. *Funct Plant Biol* 31: 539–549
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Skrumsager I, White P (2012) Functions of Macronutrients. *In P Marschner, ed, Marschner's Miner. Nutr. High. Plants, Third Edit. Elsevier Ltd, USA, pp 135–190*
- Henríquez C, Almonacid S, Chiffelle I, Valenzuela T, Araya M, Cabezas L, Simpson R, Speisky H (2010) Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chil J Agric Res* 70: 523–536
- Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N (2006) How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci* 11: 610–617
- Hermans C, Johnson GN, Strasser RJ, Verbruggen N (2004) Physiological characterisation of magnesium deficiency in sugar beet: Acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II. *Planta* 220: 344–355
- Hermans C, Verbruggen N (2005) Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 56: 2153–2161
- Igamberdiev AU, Kleczkowski LA (2003) Membrane potential, adenylate levels and Mg²⁺ are interconnected via adenylate kinase equilibrium in plant cells. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1607: 111–119
- Juszczuk IM, Wiktorowska A, Malusá E, Rychter AM (2005) Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 267: 41–49
- Kidson EB, Askew HO, Chittenden E (1941) Magnesium Deficiency of Apples in The Nelson

- District of New Zealand. *J Pomol Horticult Sci* 18: 119–134
- Kleiber T, Golcz A, Krzesiński W (2012) Effect of Magnesium Nutrition of Onion (*Allium cepa* L.). Part I. Yielding and Nutrient Status. *Ecol Chem Eng S* 19: 97–105
- Kobayashi NI, Saito T, Iwata N, Ohmae Y, Iwata R (2012) Leaf senescence in rice due to magnesium deficiency mediated defect in transpiration rate before sugar accumulation and chlorosis. *Physiol Plant* 148: 490–501
- Kumar Tewari R, Kumar P, Nand Sharma P (2006) Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. *Sci Hortic (Amsterdam)* 108: 7–14
- Kumar Tewari R, Kumar P, Tewari N, Srivastava S, Sharma P (2004) Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses - Influence on the activity and expression of superoxide dismutase. *Plant Sci* 166: 687–694
- Laing W, Greer D, Sun O, Beets P, Lowe A, Payn T (2000) Physiological impacts of Mg deficiency in *Pinus radiata*: Growth and photosynthesis. *New Phytol* 146: 47–57
- Li C, Qi Y, Zhang J, Yang L, Wang D, Ye X, Lai N, Tan L, Lin D, Chen L (2017) Magnesium-deficiency-induced alterations of gas exchange, major metabolites and key enzymes differ among roots, and lower and upper leaves of *Citrus sinensis* seedlings. *Tree Physiol Online* 0: 1–18
- Marschner H, Cakmak I (1989) High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of Zinc, Potassium, and Magnesium deficient bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *J Plant Physiol* 134: 308–315
- Meireles da Silva D, Brandão IR, Alves JD, de Santos MO, de Souza KRD, de Silveira HRO (2014) Physiological and biochemical impacts of magnesium-deficiency in two cultivars of coffee. *Plant Soil* 382: 133–150
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405–410
- Mulder D (1950) Magnesium deficiency un fruit trees on sandy soils and clay soils in Holland. *Plant Cell Physiol* 145–157
- Oland K, Opland TB (1956) Uptake of magnesium by apple leaves. *Physiol Plant* 9: 401–412
- Peng H, Qi Y-P, Lee J, Yang L-T, Guo P, Jiang H-X, Chen L-S (2015) Proteomic analysis of *Citrus sinensis* roots and leaves in response to long-term magnesium-deficiency. *BMC Genomics* 16: 1–24
- Polle A, Otter T, Mehnejakobs B (1994) Effect of magnesium-deficiency on antioxidative systems in needles of norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) grown with different ratios of nitrate and ammonium as nitrogen sources. *New Phytol* 128: 621–628
- Puech L, Mehne-Jakobs B (1997) Histology of magnesium-deficient Norway spruce needles influenced by nitrogen source. *Tree Physiol* 17: 301–310
- Racskó J, Schrader LE (2012) Sunburn of Apple Fruit: Historical Background, Recent Advances and Future Perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci* 31: 455–504
- Ridolfi M, Garrec JP (2000) Consequences of an excess Al and a deficiency in Ca and Mg for stomatal functioning and net carbon assimilation of beech leaves. *Ann For Sci* 57: 209–218
- Di Rienzo JA, Guzman AW, Casanoves F (2002) A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J Agric Biol Environ Stat* 7: 129–142
- Riga P, Anza M, Garbisu C (2005) Suitability of the antioxidative system as marker of magnesium deficiency in *Capsicum annuum* L. plants under controlled conditions. *Plant Growth Regul* 46: 51–59
- Sánchez EE, Righetti TL (2001) Misleading Zinc Deficiency Diagnoses in Pome Fruit and Inappropriate Use of Foliar Zinc Sprays. *Acta Horticult* 594: 363–368

- Sánchez E, Soto JM, García PC, López-Lefebvre LR, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L (2000) Phenolic and oxidative metabolism as bioindicators of nitrogen deficiency in French bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. strike). *Plant Biol* 2: 272–277
- Sanchez EE (1999) *Nutricion Mineral de Frutales de Pepita y Carozo*, Primera ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Alto Valle de Río Negro, Macroregión Patagonia Norte., Argentina
- Šircelj H, Tausz M, Grill D, Batič F (2005) Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *J Plant Physiol* 162: 1308–1318
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 89: 191–198
- Sun OJ, Gielen GJ, Sands R, Smith TC, Thorn AJ (2001) Growth, Mg nutrition and photosynthetic activity in *Pinus radiata*: Evidence that NaCl addition counteracts the impact of low Mg supply. *Trees - Struct Funct* 15: 335–340
- Sun OJ, Payn TW (1999) Magnesium nutrition and photosynthesis in *Pinus radiata*: clonal variation and influence of potassium. *Tree Physiol* 19: 535–540
- Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A (2014) *Plant physiology and development*, 6th Editio. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., EUA.
- Tanaka R, Tanaka A (2000) Chlorophyll b is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. *Porphyryns* 9: 240–245
- Tanoi K, Kobayashi NI, Saito T, Iwata N, Kamada R, Iwata R, Suzuki H, Hirose A, Ohmae Y, Sugita R, et al (2014) Effects of magnesium deficiency on magnesium uptake activity of rice root, evaluated using ²⁸Mg as a tracer. *Plant Soil* 384: 69–77
- Tränkner M, Jáklí B, Tavakol E, Geilfus C-M, Cakmak I, Dittert K, Senbayram M (2016) Magnesium deficiency decreases biomass water-use efficiency and increases leaf water-use efficiency and oxidative stress in barley plants. *Plant Soil* 406: 409–423
- Verbruggen N, Hermans C (2013) Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant Soil* 368: 87–99
- Wallace T (1940) Magnesium deficiency of fruit trees. *J Pomol Hortic Sci* 17: 150–166
- Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K (2004) Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant Cell Physiol* 45: 1032–1041
- Willson KG, Perantoni AN, Berry ZC, Eicholtz MI, Tamukong YB, Yarwood SA, Baldwin AH (2017) Influences of reduced iron and magnesium on growth and photosynthetic performance of *Phragmites australis* subsp. *americanus* (North American common reed). *Aquat Bot* 137: 30–38
- Yang G-H, Yang L-T, Jiang H-X, Li Y, Wang P, Chen L-S (2012) Physiological impacts of magnesium-deficiency in Citrus seedlings: photosynthesis, antioxidant system and carbohydrates. *Trees* 26: 1237–1250
- Yilmaz O, Kahraman K, Ozturk L (2017) Elevated carbon dioxide exacerbates adverse effects of Mg deficiency in durum wheat. *Plant Soil* 410: 41–50
- Ze Y, Yin S, Ji Z, Luo L, Liu C, Hong F (2009) Influences of magnesium deficiency and cerium on antioxidant system of spinach chloroplasts. *BioMetals* 22: 941–949
- Zhang F, Du P, Song C, Wu Q (2015) Alleviation of magnesium deficiency by mycorrhiza in trifoliolate orange: Changes in physiological activity. *Emirates J Food Agric* 27: 763–769
- Zhang KM, Yu HJ, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Xia XJ (2010) Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant Sci* 179: 202–208
- Zivcak M, Brestic M, Kalaji HM, Govindjee (2014) Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with protection against excess of light? *Photosynth Res* 119: 339–354

Capítulo V

***Efecto de la aplicación de cinc en plantas de
manzano en condiciones de estrés oxidativo por alta
radiación solar***

1. Introducción

El cinc (Zn) es un nutriente mineral esencial involucrado en numerosas funciones fisiológicas, su suministro inadecuado reduce el rendimiento de los cultivos (Hafeez *et al.*, 2013). La carencia de Zn en plantas es el problema de deficiencia de micronutrientes más extendido en numerosas regiones climáticas del mundo, principalmente en regiones áridas y semiáridas donde predominan los suelos alcalinos (Cakmak, 2000). La carencia de este nutriente afecta a las plantas al producir un retraso en su crecimiento, disminución en el número de macollos, clorosis foliar, hojas más pequeñas, y menor calidad de los productos cosechados (Hafeez *et al.*, 2013). Esta gran variedad de síntomas varía según la especie, y en general se manifiestan claramente en casos severos de deficiencia. El Zn desempeña un rol fundamental como constituyente estructural o cofactor regulador de una amplia gama de enzimas y proteínas en muchas vías bioquímicas importantes tales como: metabolismo de carbohidratos, tanto en la fotosíntesis como en la conversión de azúcares a almidón; metabolismo proteico; expresión génica; integridad estructural y funcional de biomembranas; formación de polen; metabolismo de auxinas; y resistencia a infecciones de determinados patógenos (Cakmak, 2000; Alloway, 2008; Broadley *et al.*, 2012). Debido a su importancia Cakmak (2000) ha especulado que el estrés por deficiencia de Zn puede inhibir las actividades de varias enzimas del sistema antioxidante, lo que resulta en daño oxidativo extensivo a lípidos de membrana, proteínas, clorofila y ácidos nucleicos (Hacisalihoglu *et al.*, 2003).

El sistema de defensa antioxidante celular es amplio y provee protección a las moléculas biológicas contra el daño oxidativo al secuestrar especies reactivas de oxígeno (ROS). Los principales mecanismos de remoción de ROS incluyen enzimas

como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasas y glutatión peroxidasa (GPX) (Blokhina *et al.*, 2003). Además, existe una variedad de compuestos antioxidantes cuyas estructuras y potencial de oxido-reducción son marcadamente diferentes. La SOD, presente en casi todos los compartimentos celulares, es un componente principal al actuar como primera línea de defensa al convertir superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Luego las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), GPX y CAT detoxifican el H_2O_2 dando como producto final H_2O . Estas enzimas no están distribuidas uniformemente dentro de la célula y varían entre los distintos compartimentos celulares. En los cloroplastos se ha encontrado operativa una vía que obtiene la energía para la reducción de H_2O_2 directamente del aparato fotosintético y se ha denominado ciclo de Agua-Agua (Asada, 2006), donde intervienen enzimas como SOD y APX. Para la síntesis y actividad de estas enzimas se requiere de distintos micronutrientes que actúan como cofactores enzimáticos. De acuerdo con su cofactor la SOD se puede clasificar en tres tipos: manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD), hierro-superóxido dismutasa (Fe-SOD) y cobre-cinc-superóxido dismutasa (CuZn-SOD). En general la CuZn-SOD es la forma más abundante en plantas y se localiza en cloroplastos y citosol, la Fe-SOD se encuentra en los cloroplastos, y la Mn-SOD, aunque no se encuentra muy distribuida en las plantas superiores, se localiza en mitocondrias y peroxisomas (Cakmak, 2000; Broadley *et al.*, 2012).

En los sistemas biológicos, el Zn es el único metal que forma parte de la estructura de las enzimas. Se han identificado cuatro tipos de sitios de unión al Zn: catalítico, estructural, co-catalítico, e interfaz de proteína el cual determina la actividad biológica de las enzimas (Broadley *et al.*, 2012). En la CuZn-SOD el Zn presenta una unión estructural encontrándose unido a dos histidinas y un aspartato,

contribuyendo a la estabilidad de la enzima, mientras que el Cu representa el metal catalítico de la enzima. Esta isoenzima está conformada por dos subunidades idénticas de masa molecular entre 18 y 16.5 KDa aproximadamente (Houmani *et al.*, 2015). Otras enzimas que contienen Zn son: alcohol deshidrogenasa, carbón anhidrasa, fosfatasa alcalina, fosfolipasa, carboxipeptidasa y ARN polimerasa (Broadley *et al.*, 2012).

El efecto del Zn en la actividad antioxidante ha sido reportado por varios autores en cultivos de mostaza parda (*Brassica juncea*) (Kaur *et al.*, 2009), maíz (*Zea mays*) (Pandey *et al.*, 2002b; Wang y Jin, 2005; Pandey *et al.*, 2010), frijol negro (*Vigna mungo*) (Pandey *et al.*, 2002a; Gupta *et al.*, 2011), trigo (*Triticum sp.*) (Cakmak *et al.*, 1997; Bharti *et al.*, 2014), arroz (*Oryza sativa*) (Frei *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017), tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Kösesakal y Ünal, 2009), y soja (*Glycine max*) (Weisany *et al.*, 2012) entre otros. En general se ha reportado que deficiencias de Zn disminuye la actividad de la enzima SOD, la capacidad antioxidante, el contenido de los pigmentos fotosintéticos, el crecimiento de las plantas y rendimiento de los cultivos, e incrementa el daño peroxidativo de membranas y la concentración de H₂O₂ (Cakmak *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 2002a; Pandey *et al.*, 2002b; Wang y Jin, 2005; Kösesakal y Ünal, 2009; Pandey *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011). Mientras que agregados de Zn, ya sea a través de soluciones nutritivas o aplicaciones foliares, incrementan la actividad de la enzima SOD y la capacidad antioxidante, y en condiciones de estrés abiótico las aplicaciones de Zn reducen el daño peroxidativo de membranas e incrementan el contenido de clorofila (Wang y Jin, 2005; Kaur *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2011; Weisany *et al.*, 2011; Bharti *et al.*, 2014).

En manzano (*Malus domestica* Borkh.) se han reportado numerosos efectos de la deficiencia y aplicaciones de Zn en la fisiología de la planta, rendimiento y calidad de la fruta (Orphanos, 1982; Yogaratnam y Johnson, 1982; Neilsen y Hogue, 1983; Basso *et al.*, 1990; Hipps y Davies, 2001; Neilsen y Neilsen, 2002; Peryea, 2006; Amiri *et al.*, 2008; Gianguzzi *et al.*, 2017), sin embargo no se han encontrado antecedentes del efecto del Zn en la capacidad antioxidante en este cultivo. Estudios previos en manzano han reportado que las aplicaciones primaverales son las más efectivas para incrementar el contenido de Zn en hojas (Sánchez y Righetti, 2001). Por otro lado, la alta capacidad de unión de las moléculas de Zn reduce su movilidad en los tejidos pudiendo quedar adherida a las ceras cuticulares. Para analizar el contenido de Zn fisiológicamente activo es necesario un lavado de las muestras con ácido clorhídrico diluido para eliminar residuos adheridos a la cutícula (Peryea, 2005). Los reportes del efecto de aplicaciones foliares de Zn en manzana son variables. Gianguzzi *et al.* (2017) reportaron un incremento en el rendimiento, el tamaño y el porcentaje de color de los frutos de cultivar 'Gala' luego de aplicaciones foliares de Zn, mientras que Hipps y Davies (2001) observaron una reducción de la floración y cuajado y sin efectos en el color y firmeza de frutos en el cultivar 'Bramleys'. Por otro lado Neilsen y Hogue (1983) reportaron un incremento en el crecimiento de brotes en el cultivar 'McIntosh'. Las aplicaciones foliares de Zn en manzano son una práctica frecuente en los establecimientos agrícolas de la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén para corregir deficiencias de este micronutriente y disminuir los síntomas que su carencia conlleva. Sin embargo, hay poca información con respecto al efecto de las aplicaciones de Zn en manzanos en condición de estrés por alta radiación y su efecto en la capacidad antioxidante.

En cultivos sometidos a alta intensidad lumínica, el daño fotooxidativo se intensifica cuando se encuentran en condiciones ambientales adversas tales como deficiencias nutricionales, estrés por frío y sequía (Cakmak *et al.*, 1993; Pandey *et al.*, 2010). Según Cakmak (2000) las hojas deficientes de Zn son dañadas por fotooxidación en los cloroplastos y rápidamente se vuelven cloróticas y necróticas cuando son expuestas a alta intensidad lumínica, como resultado de la alteración de la fijación fotosintética de CO₂ (debido a una reducción en la actividad de la enzima anhidrasa carbónica) y la actividad reducida de la enzima SOD. Esta hipótesis fue probada por Frei *et al.* (2010), demostrando que una mayor acumulación de antioxidantes en las hojas redujo los síntomas de bronceado foliar (Lee *et al.*, 2017).

Ante esta situación nos planteamos dos preguntas como eje de este capítulo: aplicaciones foliares de Zn 1) ¿incrementan el contenido de pigmentos fotosintéticos y la eficiencia en la etapa fotoquímica en manzano en situación de estrés por alta radiación solar?, 2) ¿promueven el sistema antioxidante al ser cofactores de enzimas del sistema de defensa?

Objetivo

Determinar el efecto de aplicaciones foliares de cinc en el estrés fotooxidativo y la respuesta antioxidante en hojas y frutos de manzano en condiciones de alta radiación solar.

Hipótesis

- Aplicaciones foliares de Zn en plantas de manzano incrementan el contenido de pigmentos fotosintéticos y la eficiencia en la etapa fotoquímica.
- Aplicaciones foliares de Zn promueven el sistema antioxidante al ser cofactores de enzimas del sistema de defensa.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Se trabajó con hojas y piel de frutos de manzano (*Malus domestica* Borkh.) cultivar *Red Delicious*, en la parcela 8B FCA-UNCo. Para lograr los niveles nutricionales adecuados para el ensayo se comenzó con la preparación de la parcela en la primavera de la temporada de crecimiento 2014-2015, e implicó realizar fertilizaciones durante 2 ciclos de crecimiento, para finalmente realizar los muestreos durante la temporada 2015-2016.

2.2. Diseño experimental y establecimiento de los tratamientos

Durante la primavera de la temporada 2014, se seleccionaron 10 plantas de manzano lo más homogéneas posibles en tamaño y vigor. Las plantas seleccionadas presentaban un perímetro basal promedio de 41 ± 2 cm. Se separaron en dos grupos y se establecieron dos tratamientos:

- a. -Zn: sin aplicación de Zn. Se realizaron aspersiones de agua con tensioactivo siliconado al 0,03 %.
- b. +Zn: se realizaron aplicaciones foliares de Zn al 0,05 % p/v (en forma de $ZnSO_4$), con tensioactivo siliconado al 0,03 %.

Para cada tratamiento se realizaron tres aplicaciones foliares durante la primavera 2014 (21 y 28 de noviembre y 5 de diciembre) y tres aplicaciones durante la primavera 2015 (29 de octubre, y 16 y 25 de noviembre). Todas las aplicaciones se realizaron temprano en la mañana con las condiciones climáticas adecuadas, con una mochila aspersora (Stihl SR450) utilizando un volumen aproximado de 1,5 litros de solución por planta y con el agregado de un tensioactivo siliconado (Silwet) a razón de 0,03 % (Figura 5.1).



Figura 5.1. Aplicaciones foliares en manzano Red Delicious.

2.3. Muestreos y determinaciones realizadas.

2.3.1. Contenido de cinc en hojas y piel de frutos.

Durante la primavera 2015, a los 70 DDPF, se realizó un muestreo foliar para determinar la concentración de Zn en hojas. Las muestras fueron lavadas con agua destilada, detergente neutro 5 % y ácido clorhídrico 0,1 M según Peryea (2005) para eliminar residuos de micronutrientes adheridos a la cutícula. Luego fueron secadas en estufa y enviadas a laboratorio para su análisis (para metodologías ver Capítulo II). Durante el mes de enero 2016, a los 115 DDPF, se tomaron muestras de piel de frutos, para determinar la concentración de Zn. Las muestras fueron lavadas, secadas y enviadas a laboratorio para su análisis.

2.3.2 Muestreo y determinaciones en hojas

Durante el mes de diciembre 2015, a los 67 DDPF (15/12/2015), se seleccionaron feminelas⁵ (de entre 5 a 10 cm con un fruto en su base) del exterior de la canopia, creciendo en plena exposición solar (E), y feminelas del interior de la canopia, creciendo no expuestos a la radiación solar directa (NE). Se seleccionó la hoja media de cada feminela y sin ser desprendida de la planta, se evaluó fluorescencia directa de la clorofila *a* (metodología en Capítulo II). Estas mediciones

⁵ Feminela: brote vegetativo proveniente de una yema mixta fructífera (lamburda).

se realizaron durante las horas de mayor radiación solar, entre las 12 y 14 hs. Las condiciones ambientales al momento del muestro se pueden observar en la Tabla 5.1.

A los 74 DDPF (22/12/2015) las mismas hojas seleccionadas previamente fueron llevadas rápidamente a laboratorio para determinar pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g cm}^{-2}$). La porción de hoja restante se almacenó rápidamente en nitrógeno líquido para luego determinar: daño oxidativo de membrana según peroxidación de lípidos (nmol MDA g^{-1} PF), capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (%), actividad de enzima SOD (unidades SOD mg^{-1} PF, y unidades SOD μg^{-1} proteína), contenido de proteínas y separación de proteínas por electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE). Las metodologías se encuentran detalladas en el Capítulo II.

Tabla 5.1. Condiciones ambientales registradas durante el muestreo de hoja a campo (67 DDPF) de manzano Red Delicious.

Variables meteorológicas	
Máxima radiación solar (W m^{-2})	686
Temperatura media ($^{\circ}\text{C}$)	18,9
Temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$)	31,6
Radiación PAR exterior canopia ($\mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1832
Radiación PAR interior canopia ($\mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	780

2.3.3 Muestreo y determinaciones en piel de frutos

En el mes de febrero 2016, a los 133 DDPF (19/02/2016), se recolectaron frutos sanos del exterior de la canopia, que se encontraban creciendo expuestos a la radiación solar directa. Se los llevó inmediatamente al laboratorio y se extrajeron muestras de piel de la cara expuesta al sol para determinar pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g cm}^{-2}$), daño oxidativo de membrana según peroxidación de lípidos (nmol MDA g^{-1} PF) y capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (%). Las metodologías se encuentran detalladas en el Capítulo II.

2.3.4. Evaluación de rendimiento y asoleado a cosecha.

El 22 de febrero 2016, a los 136 DDPF, se procedió a realizar la cosecha de las plantas. Se recolectó la totalidad de la fruta de cada planta y se llevó en cajones identificados por planta al laboratorio para su análisis. En el laboratorio se pesó individualmente cada fruto para obtener datos de tamaño medio. Además, se clasificó los frutos según daño de asoleado. Se tomaron muestras de 40 frutos por tratamiento para evaluar índices de madurez. Las metodologías se encuentran detalladas en el Capítulo II.

Todas las determinaciones en hojas y frutos se realizaron con 5 repeticiones. Los datos se analizaron con un análisis de la varianza uni o bifactorial. La comparación de medias a posteriori se realizó mediante DGC test (Di Rienzo *et al.*, 2002), con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha=0,05$).

3. Resultados

3.1. Análisis en hojas

3.1.1. Contenido de cinc

Las plantas del tratamiento -Zn presentaron concentraciones foliares de Zn por debajo de 20 ppm, valor límite del rango normal para el desarrollo adecuado de plantas de manzano Red Delicious (Sanchez, 1999). Las aplicaciones foliares en el tratamiento +Zn incrementaron el contenido de Zn hasta en un 537 % (Tabla 5.2). Tanto en el tratamiento -Zn como en el tratamiento +Zn no se observaron síntomas visuales de deficiencia ni toxicidad de Zn respectivamente.

Tabla 5.2. Concentración de Zn en hoja de manzano Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn) para la temporada de muestreo 2015-2016.

Tratamiento	Concentración foliar de Zn (ppm PS)
- Zn	15,5 ± 1,0 ^a
+ Zn	83,3 ± 7,2 ^b
<i>p</i> (Tratamiento)	***
Rango Normal ⁽¹⁾	20-60

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: *** (*p*<0,001).

⁽¹⁾ Concentración de Zn en hojas medias del brote del año, considerados normales para el desarrollo adecuado de plantas de manzano Red Delicious, según INTA EEA Alto Valle (Sanchez, 1999).

3.1.2 Determinaciones realizadas en hojas.

El tratamiento +Zn incrementó significativamente el contenido de clorofila *a*, *b* y *total*, y carotenos, tanto en hojas expuestas (E) como en hojas no expuestas (NE) a la radiación solar directa (Tabla 5.3). El incremento observado fue de 23,4, 27,2, 24,0 y 14,2 % respectivamente. No se observó efecto de la exposición a la radiación solar en el contenido de pigmentos. La relación clorofila *a/b* fue significativamente afectada por la interacción de las dos variables estudiadas, observándose una menor relación de clorofila *a/b* en el tratamiento +Zn NE (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Contenido de pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, *b*, total, *a/b* y carotenos *x+c*) en hojas de manzano Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn), expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa.

Tratamiento	Exposición	Pigmentos fotosintéticos (µg cm ⁻²)				
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>total</i>	Chl <i>a/b</i>	Carotenos
- Zn	NE	35,2 ± 3,7 ^a	8,1 ± 0,9 ^a	43,3 ± 4,5 ^a	4,3 ± 0,1 ^b	10,7 ± 0,9 ^a
- Zn	E	33,7 ± 1,2 ^a	7,7 ± 0,4 ^a	41,4 ± 1,7 ^a	4,4 ± 0,1 ^b	11,9 ± 0,5 ^a
+ Zn	NE	42,6 ± 2,5 ^b	11,1 ± 1,1 ^b	53,7 ± 3,5 ^b	3,9 ± 0,2 ^a	12,6 ± 0,6 ^b
+ Zn	E	42,4 ± 1,5 ^b	9,0 ± 0,5 ^b	51,3 ± 1,8 ^b	4,7 ± 0,2 ^b	13,2 ± 0,7 ^b
<i>p</i> (Tratamiento)		**	*	*		*
<i>p</i> (Exposición)		ns	ns	ns		ns
<i>p</i> (Tratamiento x Exposición)		ns	ns	ns	*	ns

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns (*p*>0,1), * (*p*<0,05), ** (*p*<0,01).

En el análisis de la etapa fotoquímica primaria por fluorescencia directa de la clorofila *a*, se observó que varios de los parámetros del JIP test analizados fueron significativamente afectados por la exposición a la radiación solar directa, pero no

por el tratamiento. Tales parámetros fueron: los flujos específicos por centro de reacción (RC) como el flujo de transporte de electrones por RC después de Q_A (ETo/RC) y la reducción de los últimos aceptores del lado del PSI por RC (REo/RC); y las eficiencias cuánticas como la eficiencia cuántica máxima de fotoquímica primaria (Fv/Fm , Figura 5.2), la eficiencia con la que un electrón se puede mover desde el intersistema aceptor de electrones reducido al último aceptor del PSI (δ_{Ro}) y el rendimiento cuántico máximo de disipación de energía (Fo/Fm).

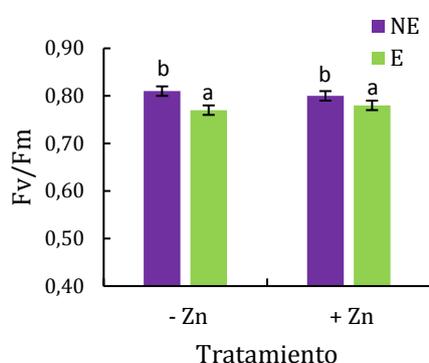


Figura 5.2. Eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria (Fv/Fm) en hojas de manzana Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn), expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa. Los datos corresponden a la media \pm E.E. ($n=5$). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p<0,05$).

El daño peroxidativo en membranas (MDA), fue afectado por la exposición a la radiación solar directa, pero no por el tratamiento (Figura 5.3 A). Las hojas expuestas (E) presentaron un 42,5 % más de peroxidación de lípidos con respecto a las hojas no expuestas (NE). La capacidad antioxidante total, evaluada según inhibición del radical DPPH fue significativamente menor en hojas del tratamiento +Zn NE (Figura 5.3 B).

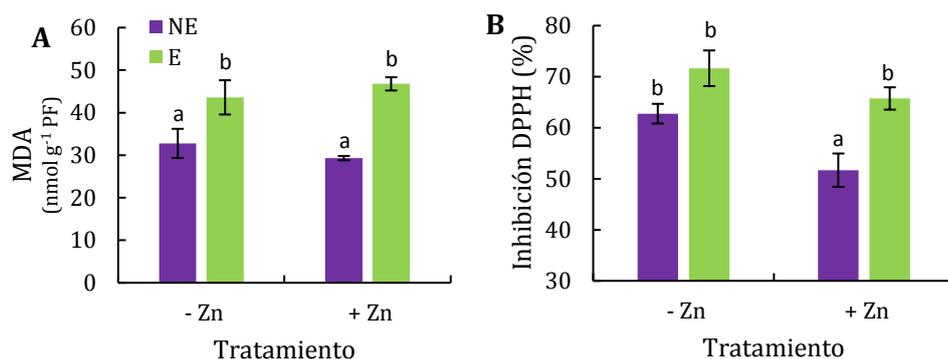


Figura 5.3. Daño oxidativo en membranas medido según contenido de MDA (Fig. A) y capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (Fig. B) en hojas de manzana Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn), expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa. Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p < 0,05$).

La actividad de la enzima SOD fue significativamente afectada por la interacción Tratamiento x Exposición (Tabla 5.4). Las hojas del tratamiento +Zn en condición de exposición a la radiación solar directa (E) presentaron la mayor actividad de SOD por peso fresco y por contenido de proteína. El contenido de proteínas totales fue significativamente afectado por el tratamiento, presentando el tratamiento +Zn un 44,2 % más de proteínas por peso fresco que el tratamiento -Zn (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Actividad de enzima superóxido dismutasa (SOD) y contenido de proteínas en hojas de manzana Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn), expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa.

Tratamiento	Exposición	Unidades SOD mg ⁻¹ PF	Unidades SOD μg ⁻¹ proteína	Proteínas (μg mg ⁻¹ PF)
- Zn	NE	380,2 \pm 67,6 ^a	45,0 \pm 9,2 ^a	8,7 \pm 0,5 ^a
- Zn	E	360,8 \pm 56,8 ^a	47,0 \pm 8,2 ^a	7,8 \pm 0,5 ^a
+ Zn	NE	331,9 \pm 65,8 ^a	26,3 \pm 5,8 ^a	12,9 \pm 0,6 ^b
+ Zn	E	702,1 \pm 56,6 ^b	69,5 \pm 8,5 ^b	10,9 \pm 0,8 ^b
<i>p</i> (Tratamiento)				***
<i>p</i> (Exposición)				ns
<i>p</i> (Tratamiento x Exposición)				ns

Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns ($p > 0,1$), * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$).

La electroforesis en gel desnaturizante de los extractos proteicos con un marcador de peso molecular se realizó para observar la intensidad de tinción en las

bandas correspondientes a las subunidades de la enzima SOD (entre 18 y 16.5 KDa, Houmani *et al.*, 2015). Se observó una mayor tinción de los extractos correspondientes a las hojas expuestas a la radiación solar directa (E, Figura 5.4). En las bandas correspondientes a proteínas menores a 20 KDa, se observó una mayor tinción en el tratamiento +Zn E, indicando una mayor cantidad de subunidades proteicas de este tamaño (Figura 5.4).

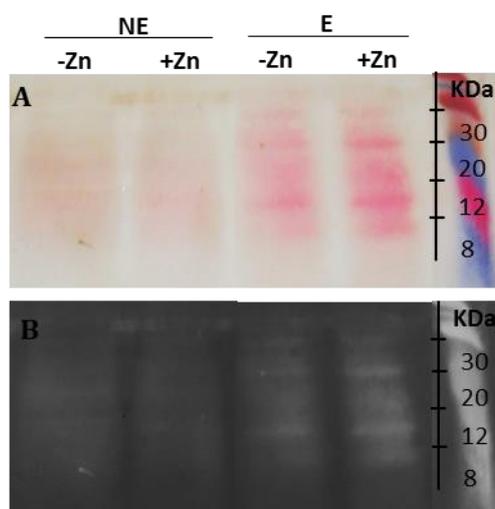


Figura 5.4. Perfil SDS-PAGE (Fig. A: imagen color, y Fig. B: imagen en negativo) de extractos de hojas de manzana Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn), expuestas (E) y no expuestas (NE) a radiación solar directa.

3.2. Resultados de los muestreos en frutos

3.2.1. Contenido de cinc

No se observaron diferencias entre tratamientos en el contenido de Zn en piel de frutos (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Concentración de Zn en piel de fruto de manzano Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn) para la temporada de muestreo 2015-2016.

Tratamiento	Concentración de Zn en piel de fruto (ppm PS)
- Zn	5,5 ± 0,5
+ Zn	5,6 ± 0,5
<i>p (Tratamiento)</i>	ns

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC. Anova *p* valor: ns ($p > 0,1$).

3.2.2. Determinaciones realizadas en piel de frutos

No se observaron diferencias entre tratamientos en la piel de manzana para el contenido de pigmentos fotosintéticos (Tabla 5.6), daño oxidativo en membranas medido según contenido de MDA y capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (Figura 5.5).

Tabla 5.6. Contenido de pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, *b*, total, *a/b* y carotenos *x+c*) en piel de manzana Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn).

Tratamiento	Pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g cm}^{-2}$)				
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl total	Chl <i>a/b</i>	Carotenos
- Zn	2,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	3,3 \pm 0,2	2,4 \pm 0,1	0,8 \pm 0,0
+ Zn	2,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	3,5 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0
<i>p</i> (Exposición)	ns	ns	ns	ns	ns

Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Anova *p* valor: ns ($p > 0,1$).

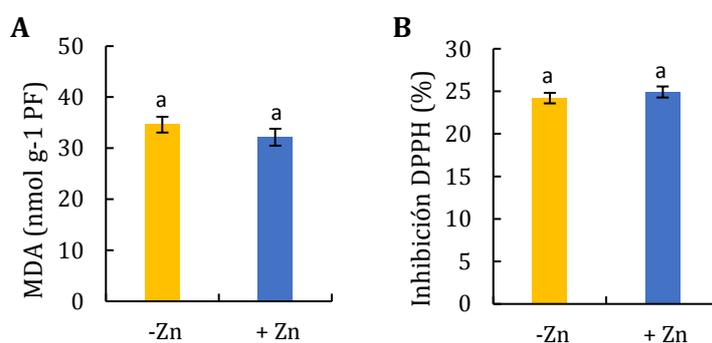


Figura 5.5. Daño oxidativo en membranas medido según contenido de MDA (Fig. A) y capacidad antioxidante total según inhibición de DPPH (Fig. B) en piel de manzana Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn). Los datos corresponden a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas según test DGC ($p < 0,05$).

Debido a que no se observaron diferencias en el contenido de Zn y en las mediciones de estrés oxidativo en la piel de fruto, no se prosiguió con el estudio de la actividad de enzimas antioxidante en estas muestras.

3.3. Evaluación de rendimiento y asoleado a cosecha.

El tratamiento no afectó la carga de frutos por planta y el peso medio de frutos (Tabla 5.7). El rendimiento promedio por planta fue de 47,2 y 45,8 kg por planta para el tratamiento - Zn y + Zn respectivamente, lo que significó un rendimiento medio de 39,3 y 38,1 tn/ha respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el porcentaje de asoleado de frutos (Tabla 5.7).

Al momento de cosecha no se observaron diferencias entre tratamientos en cuanto al estado de madurez de la fruta. Los valores de firmeza de pulpa, contenido de sólidos solubles y porcentaje de degradación de almidón fueron adecuados para la fecha (Tabla 5.8).

Tabla 5.7. Carga frutal, peso medio de fruto y porcentaje de frutos asoleados en plantas de manzano Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn).

Tratamiento	Carga (frutos/planta)	Peso medio fruto (g)	Asoleado (%)
- Zn	290,4 ± 26,2	162,9 ± 4,9	25,7 ± 2,1
+ Zn	285,2 ± 17,2	160,9 ± 3,1	27,1 ± 2,6
<i>p (Tratamiento)</i>	ns	ns	ns

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=5). Anova *p* valor: ns (*p*>0,1).

Tabla 5.8. Índices de madurez al momento de cosecha: firmeza de pulpa, sólidos solubles y degradación de almidón de frutos de manzana Red Delicious según tratamiento bajo (-Zn) y alto contenido de cinc (+Zn).

Tratamiento	Firmeza (lb pulg ²)	Sólidos Solubles (°Brix)	Degradación de almidón (%)
- Zn	16,5 ± 0,2	13,5 ± 0,1	20,2 ± 2,0
+ Zn	16,3 ± 0,2	13,3 ± 0,1	18,5 ± 1,6
<i>p (Tratamiento)</i>	ns	ns	ns

Los datos corresponden a la media ± E.E. (n=40). Anova *p* valor: ns (*p*>0,1).

4. Discusión

Concentraciones foliares de Zn de 20 a 60 ppm se consideran adecuadas para el normal desarrollo de las plantas de manzano (Sanchez, 1999). Sin embargo, el tratamiento -Zn, con valores inferiores al rango óptimo, no presentó síntomas

visuales de deficiencia de este nutriente. Luego de dos temporadas de fertilizaciones foliares, se logró incrementar hasta cinco veces el contenido de Zn en hoja, alcanzando valores por encima del rango normal. Resultados similares fueron reportados por Amiri *et al.* (2008) luego de 6 aplicaciones foliares de Zn en manzano Golden Delicious. Mientras que Hippy y Davies (2001), en estudios realizados en manzano cultivar *Bramleys*, reportaron incrementos de Zn en hoja de entre 2 a 10 veces, dependiendo del momento y la cantidad de aplicaciones realizadas. En las muestras tomadas sólo se analizó contenido de Zn. Se considera que un análisis foliar completo de todos los elementos esenciales podría ser de mayor utilidad para una mejor interpretación de los datos de concentraciones de Zn en hojas y piel de frutos.

Aplicaciones foliares de Zn incrementaron significativamente el contenido de clorofila en las hojas. Resultados similares fueron reportados por Wang y Jin (2005) y Chaab *et al.* (2011) en maíz, Weisany *et al.* (2011) en soja y Samreen *et al.* (2017) en frijol mungo (*Vigna radiata*). En plantas deficientes de Zn, la disminución en la concentración de clorofila total puede ser una consecuencia de la participación del Zn en la biosíntesis de porfobilinógeno sintasa, que cataliza la condensación de dos moléculas de ácido α -aminolevulénico para formar porfobilinógeno, un precursor de la síntesis de clorofila (Gupta *et al.*, 2011). Además, el Zn probablemente mantiene la síntesis de clorofila a través de la protección del grupo sulfhídrico, una función asociada principalmente al Zn (Cakmak, 2000). Las hojas del tratamiento +Zn no expuestas a la radiación solar directa (NE) presentaron una menor relación Chl *a/b*, y una tendencia a una mayor concentración de clorofila *b* que las hojas +Zn expuestas a la radiación solar directa (E). En condiciones de mayor intensidad lumínica, las proteínas del complejo antena más externas del PSII aumentan,

mientras que las proteínas del núcleo del complejo antena, permanecen sin cambios (Zivcak *et al.*, 2014). Por lo tanto, es esperado una relación clorofila *a/b* menor en hojas no expuestas o de sombra (Lichtenthaler *et al.*, 2007). La mayor concentración de clorofila total en las hojas del tratamiento +Zn, indica una mayor capacidad de procesar químicamente la luz, y por ende un menor riesgo potencial de daño por exceso de energía radiante.

Al igual que el contenido de clorofila, los carotenos fueron afectados por el nivel nutricional de Zn en hojas. Resultados similares fueron reportados por Pandey *et al.* (2010) en maíz, pronunciándose este efecto en condiciones de alta intensidad lumínica. Una disminución de los carotenoides en las plantas con deficiencia de Zn implica menor capacidad de estas plantas para proteger el aparato fotosintético del daño fotooxidativo por disipación del exceso de energía lumínica a través del ciclo de xantofilas (Pandey *et al.*, 2010).

Estudios previos realizados en maíz en condiciones de deficiencias de Zn reportaron una disminución significativa de la eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm) y de la actividad en general de la etapa fotoquímica primaria (Wang y Jin, 2005). Sin embargo, los parámetros estudiados a través de la fluorescencia directa de la clorofila *a* en la presente tesis en hojas de manzano, no fueron afectados por la baja concentración de Zn. Es posible que el bajo nivel de Zn alcanzado (en tratamiento -Zn), no fue lo suficientemente estresante para afectar la actividad fotoquímica primaria. Tal como lo observado y discutido en el Capítulo III de la presente tesis, la exposición a la alta radiación solar afectó significativamente la actividad fotoquímica primaria afectando las eficiencias cuánticas y los flujos específicos por centro de reacción.

La pérdida de integridad de membrana como consecuencia de la acumulación de ROS es uno de los principales efectos de la deficiencia de Zn (Cakmak, 2000). Tal es así que se ha informado, en numerosos estudios, incrementos en la concentración de malondialdehído (MDA) debido a la peroxidación lipídica en plantas deficientes de Zn (Pandey *et al.*, 2002b; Wang y Jin, 2005; Kösesakal y Ünal, 2009; Pandey *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011). Además, en condiciones de estrés abiótico como el estrés salino, aplicaciones de Zn han disminuido el daño peroxidativo de membranas (Weisany *et al.*, 2012). El Zn ayuda a limitar la tasa de peroxidación de lípidos, ya que es un componente protector y estabilizador de las biomembranas frente a las ROS (Weisany *et al.*, 2012). El daño peroxidativo en las biomembranas comienza con la oxidación de los ácidos grasos insaturados y continúa a través de una serie de reacciones de radicales libres, lo que resulta en una alteración sustancial de la estructura e integridad de la membrana (Cakmak, 2000). Estudios realizados en raíces de algodón (*Gossypium hirsutum*) demostraron que deficiencias de Zn reducen el contenido de ácidos grasos, particularmente los insaturados, y el contenido total de fosfolípidos (Cakmak, 2000), incrementando la susceptibilidad de las membranas al daño peroxidativo.

En los estudios realizados en hojas de manzano de la presente tesis no se observó efecto del tratamiento con Zn en la peroxidación de lípidos, posiblemente debido a que el bajo nivel de Zn alcanzado no fue lo suficientemente estresante como para potenciar el daño oxidativo de membranas detectable mediante un incremento de MDA. Sin embargo, la capacidad antioxidante total, indicó que las hojas con un contenido adecuado de Zn no expuestas a radiación solar directa se encontraban en una situación de menor estrés oxidativo que las hojas deficientes de Zn y las hojas expuestas a radiación solar directa. Sharma *et al.* (2004) propusieron que el estrés

oxidativo es uno de los primeros signos de la deficiencia de Zn, al observar una inducción del sistema antioxidante antes de la aparición de síntomas en plantas de trigo, tal como lo observado en nuestros ensayos en las hojas de manzano no expuestas a la radiación solar directa. Los mecanismos por los cuales la deficiencia de Zn daña las plantas resultan del incremento de ROS debido a: un aumento de la actividad de la enzima NADPH oxidasa ligada a la membrana (Cakmak y Marschner, 1988); una mayor concentración de hierro y producción del radical $\text{OH}\cdot$ catalizada por Fe en la reacción de Haber-Weiss (Cakmak, 2000; Asada, 2006); y una disminución de la actividad de la enzima SOD (Cakmak, 2000; Wang y Jin, 2005).

La enzima CuZn superóxido dismutasa (CuZn-SOD) es el tipo de SOD más abundante en las células vegetales y se considera la primera línea de defensa del sistema antioxidante, al catalizar la transformación del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El Zn representa el componente estructural de la enzima, al estar unido a dos histidinas y un aspartato, contribuyendo de esta forma a la estabilidad estructural de la enzima (Broadley *et al.*, 2012). Ha sido ampliamente reportado, en diversas especies, que la deficiencia de Zn reduce la actividad de la enzima CuZn-SOD, mientras que un reabastecimiento de Zn restaura rápidamente la actividad enzimática (Cakmak, 2000; Wang y Jin, 2005; Kaur *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011; Bharti *et al.*, 2014), lo que indica que el átomo de Zn es un componente estructural esencial para el normal funcionamiento de CuZn-SOD. En los ensayos de la presente tesis realizados en hojas de manzano se obtuvieron resultados similares. Bajos niveles de Zn afectaron la actividad de la enzima SOD en las hojas que se encontraban expuestas a la alta radiación solar. En las hojas no expuestas a la radiación solar directa, al no encontrarse en condiciones de estrés, el contenido diferencial de Zn no afectó la actividad de la enzima SOD. Por lo tanto,

plantas con buen abastecimiento de Zn presentaron mayor capacidad de defenderse al estrés por alta radiación solar. Estas observaciones fueron corroboradas con los resultados obtenidos a partir de la electroforesis en gel desnaturalizante de los extractos proteicos. En este caso se observó que las hojas con mayor contenido de Zn y expuestas a la radiación solar directa presentaron una mayor tinción de las bandas entre 20 y 12 KDa, indicando una mayor cantidad de subunidades proteicas de este tamaño, coincidente con la masa molecular de las subunidades proteicas de la CuZn-SOD.

Debido a que la actividad de CuZn-SOD se reduce fuertemente ante un bajo suministro de Zn, Hacısalihoglu *et al.* (2003) proponen que la actividad de la enzima SOD sería un mejor indicador de la tolerancia a la deficiencia de Zn que la concentración total del tejido foliar. A partir de los resultados obtenidos en manzano, podríamos agregar que para utilizar la actividad de la enzima SOD como un indicador de la deficiencia de Zn, las plantas deberían tener su sistema antioxidante activo al estar sometidas a una situación de estrés.

Independientemente de la exposición a la radiación solar, las hojas del tratamiento +Zn presentaron una mayor cantidad de proteínas. Estos hallazgos estuvieron de acuerdo con Samreen *et al.* (2017). Ellos informaron una correlación positiva entre el contenido de proteína cruda y el incremento en el contenido de Zn en plantas de frijol. Debido a que el Zn es un componente estructural y catalítico de numerosas enzimas, su carencia afecta directamente el contenido de proteínas, alterando el crecimiento y metabolismo normal de las plantas (Broadley *et al.*, 2012).

Por otro lado, en piel de frutos no se observó efecto del tratamiento en el contenido de Zn, el contenido de pigmentos fotosintéticos, el daño oxidativo y la

capacidad antioxidante en la piel de los frutos. Hipps y Davies (2001) reportaron que la concentración de Zn en frutos de manzano *Bramleys* duplicó su valor luego de aplicaciones foliares con este nutriente, pero en su estudio evaluaron la totalidad del fruto (pulpa y piel). Es posible que debido a su baja movilidad en la planta (Broadley *et al.*, 2012) el Zn no alcanzara a concentrarse en el tejido epidérmico de los frutos. Henríquez *et al.* (2010) reportaron concentraciones de Zn de 2.9 ppm PS en piel de manzana Red Delicious, siendo este valor un 48 % inferior a los resultados obtenidos en este ensayo.

En las condiciones experimentales de la presente tesis no se observó efecto del tratamiento con Zn sobre el porcentaje de frutos asoleado, índices de madurez, rendimiento y tamaño de fruto. Sin embargo Gianguzzi *et al.* (2017) reportaron incrementos en el rendimiento y tamaño medio de frutos de manzana cultivar Gala luego de tres aplicaciones foliares de Zn al 0,2 % (concentración cuatro veces más alta a la utilizada en este ensayo) y concentraciones foliares de Zn un 44 % mayor.

5. Conclusiones

En el presente estudio, llevado a cabo en plantas adultas de manzano cultivar Red Delicious, aplicaciones foliares de Zn incrementaron la concentración foliar de clorofila y carotenos, pero no afectaron los parámetros de la etapa fotoquímica evaluados por fluorescencia de la clorofila *a*. A pesar de que no se observó un efecto de los tratamientos en el daño peroxidativo en condiciones de estrés por alta radiación solar, se observó que las hojas con alto contenido de Zn y expuestas a la radiación solar directa presentaron mayor capacidad de defensa antioxidante al exponer mayor actividad de la enzima SOD.

Si bien el protocolo de fertilización implementado aumentó la concentración de Zn en las hojas no afectó la concentración de Zn en la piel de los frutos, el rendimiento y calidad de los frutos.

Por lo tanto, aplicaciones foliares de Zn promovieron el sistema antioxidante en hojas, al ser cofactores de enzimas del sistema de defensa. La mejora del estado nutricional de Zn de las plantas puede ser de crucial importancia para proteger a las plantas de manzano en condiciones de estrés abiótico.

6. Referencias

- Alloway BJ (2008) Zinc in soil and crop nutrition, Second ed. IZA and IFA, Brussels, Belgium and Paris, France.
- Amiri ME, Fallahi E, Golchin A (2008) Influence of foliar and ground fertilization on yield, fruit quality, and soil, leaf, and fruit mineral nutrients in apple. *J Plant Nutr* 31: 515–525
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391–396
- Basso C, Suzuki A, Wilms FWW, Stuker H (1990) Control of zinc deficiency in apple orchards in southern Brazil. *In* ML Van Beusichem, ed, *Plant Nutr. - physiology Appl. Proc. Elev. Int. Plant Nutr. Colloquium*. Kluwer Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, pp 257–260
- Bharti K, Pandey N, Shankhdhar D, Srivastava PC, Shankhdhar SC (2014) Effect of different zinc levels on activity of superoxide dismutases & acid phosphatases and organic acid exudation on wheat genotypes. *Physiol Mol Biol Plants* 20: 41–48
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Bot* 91: 179–194
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F (2012) Function of Nutrients: Micronutrients. *In* P Marschner, ed, *Marschner's Miner. Nutr. High. Plants*, Third-20. Elsevier Ltd, USA, pp 191–248
- Cakmak I (2000) Tansley Review No.111: Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 146: 185–205
- Cakmak I, Marschner H (1988) Zinc-dependent changes in ESR signals, NADPH oxidase and plasma membrane permeability in cotton roots. *Physiol Plant* 73: 182–186
- Cakmak I, Öztürk L, Eker S, Torun B, Kalfa HI, Yilmaz A (1997) Concentration of zinc and activity of copper/zinc-superoxide dismutase in leaves of rye and wheat cultivars differing in sensitivity to zinc deficiency. *J Plant Physiol* 151: 91–95
- Cakmak I, Strbac D, Marschner H (1993) Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *J Exp Bot* 44: 127–132
- Chaab A, Savaghebi GR, Motesharezadeh B (2011) Differences in the zinc efficiency among and within maize cultivars in a calcareous soil. *Asian J Agric Sci* 3: 26–31
- Frei M, Wang Y, Ismail AM, Wissuwa M (2010) Biochemical factors conferring shoot tolerance to oxidative stress in rice grown in low zinc soil. *Funct Plant Biol* 37: 74–84
- Gianguzzi G, Liguori G, Sortino G, Piva G, Farina V (2017) Effects of zinc foliar nutrition on

- "Gala" apple (*Malus domestica* borkh) fruit quality. *Bulg J Agric Sci* 23: 213–218
- Gupta B, Pathak GC, Pandey N (2011) Induction of oxidative stress and antioxidant responses in *Vigna mungo* by zinc stress. *Russ J Plant Physiol* 58: 85–91
- Hacisalihoglu G, Hart JJ, Wang Y-H, Cakmak I, Kochian L V (2003) Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat. *Plant Physiol* 131: 595–602
- Hafeez B, Khanif YM, Saleem M (2013) Role of zinc in plant nutrition - A review. *Am J Exp Agric* 3: 374–391
- Henríquez C, Almonacid S, Chiffelle I, Valenzuela T, Araya M, Cabezas L, Simpson R, Speisky H (2010) Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chil J Agric Res* 70: 523–536
- Hipps NA, Davies MJ (2001) Effects of foliar zinc applications at different times in the growing season on tissue zinc concentrations, fruit set, yield and grade out of culinary apple trees. *Acta Hort* 564: 145–151
- Houmani H, Rodríguez-Ruiz M, Palma JM, Abdelly C, Corpas FJ (2015) Modulation of superoxide dismutase (SOD) isozymes by organ development and high long-term salinity in the halophyte *Cakile maritima*. *Protoplasma*. doi: 10.1007/s00709-015-0850-1
- Kaur R, Bhardwaj R, Thukral AK, Narang U (2009) Uptake of heavy metals, and antioxidative enzymes in *Brassica juncea* L. seedlings as affected by Zn in binary combinations with other heavy metals. *Plant Stress* 3: 17–25
- Kösesakal T, Ünal M (2009) Role of zinc deficiency in photosynthetic pigments and peroxidase activity of tomato seedlings. *IUFS J Biol* 68: 113–120
- Lee JS, Wissuwa M, Zamora OB, Ismail AM (2017) Biochemical indicators of root damage in rice (*Oryza sativa*) genotypes under zinc deficiency stress. *J Plant Res* 130: 1071–1077
- Lichtenthaler HK, Ač A, Marek M V., Kalina J, Urban O (2007) Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiol Biochem* 45: 577–588
- Neilsen GH, Hogue EJ (1983) Foliar application of chelated and mineral zinc sulphate to Zn-deficient "McIntosh" seedlings. *HortScience* 18: 915–917
- Neilsen GH, Neilsen D (2002) Effect of foliar Zn, form and timing of Ca sprays on fruit Ca concentration in new apple cultivars. *Acta Hort* 594: 435–443
- Orphanos PI (1982) Spray and soil application of zinc to apples. *J Hort Sci* 57: 259–266
- Pandey N, Pathak GC, Singh AK (2010) Differential sensitivity of maize to zinc and high light intensity. *Plant Stress* 4: 18–24
- Pandey N, Pathak GC, Singh AK, Sharma CP (2002a) Enzymic changes in response to zinc nutrition. *J Plant Physiol* 159: 1151–1153
- Pandey N, Singh AK, Pathak GC, Sharma CP (2002b) Effect of zinc on antioxidant response in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Indian J Exp Biol* 40: 954–956
- Peryea FJ (2005) Sample washing procedures influence mineral element concentrations in zinc-sprayed apple leaves. *Commun Soil Sci Plant Anal* 36: 2923–2931
- Peryea FJ (2006) Phytoavailability of zinc in postbloom zinc sprays applied to "golden delicious" apple trees. *Horttechnology* 16: 60–65
- Di Rienzo JA, Guzman AW, Casanoves F (2002) A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J Agric Biol Environ Stat* 7: 129–142
- Samreen T, Humaira, Shah HU, Ullah S, Javid M (2017) Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (*Vigna radiata*). *Arab J Chem* 10: S1802–S1807
- Sanchez EE (1999) *Nutricion Mineral de Frutales de Pepita y Carozo*, Primera ed. Instituto

- Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Alto Valle de Río Negro, Macroregión Patagonia Norte., Argentina
- Sharma PN, Kumar P, Tewari RK (2004) Early signs of oxidative stress in wheat plants subjected to zinc deficiency. *J Plant Nutr* 27: 451–463
- Wang H, Jin JY (2005) Photosynthetic rate, chlorophyll fluorescence parameters, and lipid peroxidation of maize leaves as affected by zinc deficiency. *Photosynthetica* 43: 591–596
- Weisany W, Sohrabi Y, Heidari G, Siosemardeh A, Ghassemi- K (2011) Physiological responses of soybean (*Glycine max L.*) to zinc application under salinity stress. *Aust J Crop Sci* 5: 1441–1447
- Weisany W, Sohrabi Y, Heidari G, Siosemardeh A, Ghassemi-Golezani K (2012) Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max L.*). *Plant Omi J* 5: 60–67
- Yogarathnam N, Johnson DS (1982) The application of foliar sprays containing nitrogen, magnesium, zinc and boron to apple trees. II. Effects on the mineral composition and quality of the fruit. *J Horticult Sci* 57: 159–164
- Zivcak M, Brestic M, Kalaji HM, Govindjee (2014) Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with protection against excess of light? *Photosynth Res* 119: 339–354

Capítulo VI

Síntesis y conclusión general

La mayoría de las plantas en algún momento de su vida se encuentran sometidas a condiciones de alta intensidad de radiación solar, absorbiendo más energía de la que pueden utilizar en la fotosíntesis. Este exceso de energía excitación, si no es disipado correctamente mediante los mecanismos fotoprotectores, puede causar daños debido a una acumulación de especies reactivas de oxígeno. Las condiciones limitantes para el normal metabolismo de las plantas, como las deficiencias nutricionales, potencian y agravan esta situación.

Las hojas y frutos de manzano que crecen en el exterior de la canopia suelen encontrarse en situación de exceso de energía lumínica, sobre todo con altas intensidades de radiación solar. En estas condiciones el adecuado funcionamiento de la etapa fotoquímica de la fotosíntesis es clave para disipar la energía lumínica y así evitar una sobrerreducción de la cadena de transporte de electrones y el estrés fotooxidativo.

En los estudios llevados a cabo en esta tesis fue posible determinar que los procesos de conversión de energía lumínica en energía química en hojas y frutos de manzano son alterados en condiciones de exposición a alta radiación solar. Las hojas y los frutos expuestos se encontraron en una situación de exceso de energía lumínica, con mayor daño fotooxidativo y degradación de clorofila. Asimismo, a medida que los frutos crecieron se redujo su capacidad fotoquímica. La exposición abrupta al sol fue más perjudicial para los frutos que para las hojas. Los frutos que fueron abruptamente expuestos a la radiación solar presentaron mayor susceptibilidad al daño fotooxidativo en estadios tempranos y medios, posiblemente debido a un menor desarrollo de los mecanismos fotoprotectores. Ante esta situación resulta inevitable reconocer la importancia de la protección a la exposición

solar de los frutos en los estadios iniciales, evitando prácticas culturales que promuevan la exposición al sol de frutos no adaptados a dicha situación.

Los ensayos realizados con nutrientes minerales indicaron la importancia de éstos en el estrés por alta radiación solar. Plantas con deficiencias de Mg presentaron una menor capacidad de procesar químicamente la luz y una mayor susceptibilidad potencial al estrés por alta radiación solar. Esta condición fue observada a niveles productivos en la pérdida de la calidad de los frutos por una mayor incidencia de asoleado. Las plantas de manzano con un adecuado nivel de magnesio nutricional estarían mejor preparadas para soportar climas con altos niveles de radiación solar.

La nutrición de las plantas de manzano con Zn incrementó la capacidad antioxidante en las hojas en condiciones de alta radiación solar, debido al aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa. Debido a que esta enzima desempeña un papel crítico en los sistemas de defensa antioxidante en todos los tejidos biológicos se puede sugerir que las plantas con adecuada disponibilidad de Zn presentarían una mejor defensa a factores de estrés oxidativo. Además, se observó que las aplicaciones de Zn contribuirían a la disipación de la energía lumínica a través de la fotosíntesis al incrementar el contenido de los pigmentos fotosintéticos.

En el transcurso de esta tesis se alcanzaron los objetivos propuestos. El conocimiento de los aspectos relacionados a la fisiología de las plantas en situaciones de estrés abiótico es prioritario para contar con las bases que permitan elaborar un exitoso manejo del cultivo. La nutrición mineral no es la solución absoluta para evitar pérdidas productivas, pero sí es un aspecto importante para considerar al momento de tomar decisiones con respecto a la protección del cultivo

en situación de alta intensidad de radiación solar. Tener en cuenta aspectos como la nutrición mineral, y cómo varía la susceptibilidad de los frutos a la radiación solar, sería indispensable para mitigar efectos negativos del estrés fotooxidativo y reducir las pérdidas por asoleado en el cultivo de manzano.

Posiblemente los resultados aquí reportados, sean uno de los primeros reportes del efecto de la concentración de Zn en la actividad antioxidante en hojas de manzano en condiciones de estrés abiótico por alta radiación solar.

Aspectos de interés para futuras líneas de estudio

Si bien en términos generales los objetivos planteados inicialmente fueron alcanzados en el transcurso de esta tesis, es posible definir algunos aspectos que podrían resultar de interés para desarrollar futuros estudios que contribuirían a complementar la información generada.

Dado el incremento en el daño fotooxidativo de los frutos abruptamente expuestos a la radiación solar, sería importante experimentar sobre las prácticas culturales que favorecen este fenómeno tales como el raleo tardío, las podas en verde, la exposición directa de cultivos que crecen bajo coberturas antigranizo, entre otras.

Los ensayos de nutrición magnésica aún continúan vigentes con el objetivo de ahondar en los estudios de los efectos de la deficiencia de Mg en la fisiología de las plantas de manzano. Se cree que sería importante profundizar el estudio en el estrés fotooxidativo, metabolismos de azúcares y su relación con la regulación en la fotosíntesis.

A futuro y a la luz de los resultados obtenidos sería conveniente realizar un estudio con tratamientos que incluyan al Mg y Zn de manera simultánea (-Zn -Mg vs +Zn +Mg) dado que ambos si son deficientes incrementan el daño fotooxidativo. Es

muy fácil encontrar plantas deficientes en Zn ya que en el Alto Valle de Río Negro las aplicaciones de Zn son recomendadas como parte del manejo nutricional. En manzano la cultivar Fuji es la más susceptible a deficiencia de Mg, por lo que sería ideal para hacer este estudio.

En plantas tratadas con Zn se pretende profundizar el estudio en la capacidad antioxidante, al estudiar si el incremento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa repercute en la actividad de otras enzimas antioxidantes como peroxidasas y contribuyen a controlar el daño fotoxidativo. Es importante, además, investigar si en frutos con mayores contenidos de Zn, ya sea de modo natural o a través de aplicaciones, se observa el mismo incremento en la defensa antioxidante que en las hojas.

Los resultados obtenidos motivan a la investigación de mutantes menos susceptibles a la deficiencia de Zn y por ende menos susceptibles al estrés fotoxidativo.

Por otro lado, se cree que la aplicación de nuevas técnicas para la determinación de daño oxidativo, tales como cuantificación de MDA por HPLC y espectrofluorimetría, podrían ser más sensibles, que la técnica utilizada, para encontrar variaciones entre los tratamientos.