



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN AGRONOMIA

Estudio de algunos fenómenos morfofisiológicos y cambios bioquímicos en *Berberis microphylla* G. Forst. (sinónimo *B. Buxifolia* Lam.) asociados a la formación y maduración de frutos en Tierra del Fuego y su relación con la producción de metabolitos útiles

MIRIAM ELISABET ARENA

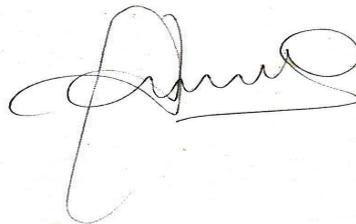
BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2016

## **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 2007 y el 2015, bajo la dirección del Dr Néstor Curvetto.



[Firma del Alumno]



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 07/04/2016, mereciendo la calificación de sobresaliente 10 (diez).

En el transcurso de la realización del trabajo de esta tesis se publicaron los siguientes trabajos derivados de la misma, a saber:

ARENA M.E.; ZULETA A.; DYNER L.; CONSTENLA D.; CECI M.; CURVETTO N.R. 2013. *Berberis buxifolia* fruit growth and ripening: evolution in carbohydrate and organic acid contents. *Scientia Horticulturae* 158: 52-58.

ARENA M.E.; POSTEMSKY P.; CURVETTO N.R. 2012. Accumulation patterns of phenolic compounds during fruit growth and ripening of *Berberis buxifolia*, a native Patagonian species. *New Zealand Journal of Botany* 50 (1): 15-28. <http://dx.doi.org/10.1080/0028825X.2011.638644>.

ARENA M.E.; CURVETTO N. 2008. *Berberis buxifolia* Fruiting: Kinetic Growth Behavior and Evolution of Chemical Properties During the Fruiting Period and Different Growing Seasons. *Scientia Horticulturae* 118, 2: 120-127.

## **RESUMEN**

En la Patagonia existe una gran diversidad de plantas no domesticadas, muchas de las cuales han hecho una contribución importante a la alimentación y la salud de las culturas locales, como las especies del género *Berberis* L., comúnmente llamadas “calafates” o “michay”, las cuales tienen una distribución amplia desde Neuquén hasta Tierra del Fuego, y sus pequeños frutos son muy demandados para el consumo en fresco a la vez que para la elaboración de diversos productos.

En la Parte I de la tesis se presenta el estudio del crecimiento del fruto y de la composición cuali-cuantitativa de los carbohidratos, los ácidos orgánicos, los compuestos fenólicos, así como de la actividad antioxidante de los frutos de *Berberis microphylla* a lo largo de su ontogenia y en diferentes estaciones de crecimiento. Los frutos fueron cosechados de plantas que crecían naturalmente en una población en las cercanías de la ciudad de Ushuaia y en diferentes estaciones de crecimiento. El crecimiento del fruto y la composición cuali-cuantitativa de los carbohidratos y de los ácidos orgánicos mostraron cambios significativos a lo largo de la ontogenia y entre estaciones de crecimiento, mientras que la calidad y contenido de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante variaron con la ontogenia de los frutos. La existencia de correlaciones significativas entre las variables estudiadas permiten su uso como marcadores de las fases de la fructificación, de importancia ante cambios de las condiciones ambientales y/o factores de precosecha. A su vez, se encontró que los frutos poseen un alto valor nutricional y una excelente actividad antioxidante, una propiedad que puede contribuir a la calificación de alimento funcional de interés y de aplicabilidad industrial potencial.

En la Parte II de la tesis se presenta el estudio de la fenología, los contenidos de nutrientes y de pigmentos foliares, la actividad fotosintética, la producción de frutos, su crecimiento y la composición cuali-cuantitativa de los carbohidratos, los ácidos

orgánicos, los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en plantas de *B. microphylla* que fueron cultivadas en forma experimental bajo tres intensidades de luz (24, 57 y 100% de la luz natural) y tres niveles de fertilización inorgánica (0,0; 3,4 y 6,7 g de fertilizante por planta). Los fertilizantes utilizados fueron nitrato de amonio ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ), superfosfato triple de calcio ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ) y sulfato de potasio ( $\text{SO}_4\text{K}_2$ ).

Los cambios fenológicos, morfofisiológicos y composicionales observados en las plantas cultivadas bajo tres niveles de intensidad de luz y de fertilización inorgánica refieren a la presencia de una "aclimatación o plasticidad fenotípica" de las plantas de *B. microphylla*. Además, en los frutos obtenidos en el ensayo experimental, se obtuvieron para aquellas variables relacionadas al valor funcional resultados comparables a los obtenidos en frutos de la población natural.

Se espera que la información emergente del presente trabajo de tesis pueda contribuir a una mejor interpretación de los comportamientos observados en las plantas naturales crecidas en diferentes ambientes de la Patagonia, en particular frente a un escenario posible de cambio climático y también para la posterior selección de genotipos y mejoramiento de la especie, así como en relación con la toma de decisiones referentes al manejo de los arbustos de interés socio-económico.

## **ABSTRACT**

In Patagonia there is a wide variety of non-domesticated plants, many of which have made a significant contribution to food and health of local cultures, such as the genus *Berberis* L., commonly called "calafate" or "michay", which have a wide distribution from Neuquén to Tierra del Fuego, and its small fruits are highly demanded for fresh consumption as well as for the development of various products.

In Part I of the thesis the study of fruit growth and the qualitative and quantitative composition of carbohydrates, organic acids, phenolic compounds and antioxidant activity of the fruit of *Berberis microphylla* along its ontogeny and among growing seasons is presented. The fruits were harvested from plants growing naturally in a population near the Ushuaia city and in different growing seasons. Fruit growth and the qualitative and quantitative composition of carbohydrates and organic acids showed significant changes along the ontogeny and between growing seasons, while the quality and content of phenolic compounds and antioxidant activity varied with ontogeny of fruits. The existence of significant correlations between these variables allows their use as markers of fruiting stages, of importance when change the environmental conditions and / or the preharvest factors. In turn, it was found that the fruits have high nutritional value and excellent antioxidant activity, a property which can

contribute to the characterization of their functional value of interest and potential industrial applicability.

In Part II of the thesis the study of phenology, nutrient and leaf pigments, photosynthetic activity, fruit production, its growth and the qualitative and quantitative composition of carbohydrates, organic acids, the phenolic compounds and antioxidant activity is presented in plants of *B. microphylla* that were grown experimentally under three light intensities (24, 57 and 100% of natural light) and three levels of inorganic fertilizer (0.0, 3.4 and 6.7 g fertilizer per plant). The fertilizers used were ammonium nitrate ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ), calcium triple superphosphate ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ) and potassium sulfate ( $\text{SO}_4\text{K}_2$ ).

Phenological, morphophysiological and compositional changes observed in plants grown under three levels of light intensity and inorganic fertilization refers to the presence of an "acclimation or phenotypic plasticity" of plants of *B. microphylla*. Furthermore, those values of the variables related to the functional value of the fruits obtained in the experimental conditions were comparable to those obtained in the fruits of the natural population.

It is expected that the emerging information of the present thesis can contribute to a better understanding of the behaviors observed in wild plants grown in different environments of Patagonia, in particular against a possible scenario of climate change and to the subsequent selection of genotypes and improvement of the species, as well as in relation to decisions concerning to the management of bushes of socio-economic interest.

## **Dedicatoria**

Este Trabajo de Tesis está dedicado a todos aquellos que fueron y son parte fundamental de mi vida, y muy especialmente a:

Mis padres (Esther y Ángel) en donde estén, por su amor incondicional, por ser quien soy gracias a ellos y por haberme introducido al camino del conocimiento desde muy pequeña.

Mi gran compañero desde hace ya casi 34 años, mi esposo Gustavo, con quien he constituido la familia que siempre he soñado.

Mis tres hijos

Sofía, Martina y Agustín, gracias a quienes pude concretar mi gran proyecto de vida, y quienes son mi pilar fundamental hoy en día.

Mi hermano Alberto, Claudia y mis sobrinos, Federico, Lucas, María Victoria, María Clara y Guido por estar siempre.

## **Agradecimientos**

Dr Néstor Curvetto por sus valiosos aportes académicos, su tiempo y los sabios consejos dados junto a Silvia Delmastro.

Dr Pablo Postemsky por su colaboración incondicional y sus valiosos aportes.

CONICET por permitirme ser parte de esta Institución y por financiar las investigaciones.

CADIC por ser mi lugar de trabajo y el que me posibilitó con su infraestructura, equipamiento y recursos humanos llevar a cabo el trabajo de esta tesis.

MINCYT por financiar las investigaciones a través de los proyectos PFIP.

EEA INTA Santa Cruz por financiar las investigaciones a través de diferentes proyectos, a su personal y muy especialmente a la Dra Liliana San Martino y el Ing Agr Julio Cabana.

A la Dra Ing Agr Silvia Radice por sus valiosos aportes académicos, su tiempo y su generosidad.

A mis compañeros de CADIC:

Dr Ing Ftal Guillermo Martínez Pastur, Dra Ing Ftal María Vanesa Lencinas y Dra Biol Alicia Moretto, por todas las contribuciones hechas para esta tesis.

Juan Peralta (Técnico CADIC jubilado) y Julio Escobar (Profesional Principal CADIC) por su incondicional colaboración.

Laureano Coronel, Karina Rodríguez, Melina Furno e Ing Agr Mariela Bernini, quienes me ayudaron en la toma de datos y cuidados de los ensayos.

	<b>INDICE</b>
<b>INTRODUCCION GENERAL</b>	1
El género <i>Berberis</i> en Patagonia y sus usos	1
<i>Berberis microphylla</i> , su clasificación y distribución	2
Hipótesis	5
Objetivo general	5
Objetivo particular	5
<b>PARTE I: ESTUDIOS EN LOS FRUTOS DE PLANTAS DE <i>B. microphylla</i> G. Forst. DE UNA POBLACIÓN NATURAL</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1: CRECIMIENTO DE LOS FRUTOS Y EVOLUCION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO Y ÁCIDOS ORGÁNICOS</b>	<b>8</b>
INTRODUCCIÓN	9
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	46
<b>CAPÍTULO 2: EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b>	<b>47</b>
INTRODUCCIÓN	48
MATERIALES Y MÉTODOS	51
RESULTADOS	55
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	74
<b>PARTE II: ESTUDIOS EN PLANTAS DE <i>B. microphylla</i> G. Forst. EN UN CULTIVO EXPERIMENTAL EN MACETAS</b>	<b>75</b>
<b>CAPÍTULO 1: ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO EXPERIMENTAL EN MACETAS</b>	<b>76</b>
INTRODUCCIÓN	77
MATERIALES Y MÉTODOS	79
CONCLUSIONES	80
<b>CAPÍTULO 2: FENOLOGIA</b>	<b>87</b>
INTRODUCCIÓN	88
MATERIALES Y MÉTODOS	90
RESULTADOS	93

DISCUSIÓN	101
CONCLUSIONES	104
<b>CAPÍTULO 3: NUTRIENTES Y PIGMENTOS FOLIARES</b>	105
INTRODUCCIÓN	106
MATERIALES Y MÉTODOS	107
RESULTADOS	109
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	123
<b>CAPÍTULO 4: ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA</b>	124
INTRODUCCIÓN	125
MATERIALES Y MÉTODOS	126
RESULTADOS	127
DISCUSIÓN	132
CONCLUSIONES	137
<b>CAPÍTULO 5: PRODUCCIÓN DE FRUTOS</b>	138
INTRODUCCIÓN	139
MATERIALES Y MÉTODOS	142
RESULTADOS	143
DISCUSIÓN	147
CONCLUSIONES	151
<b>CAPÍTULO 6: CRECIMIENTO DE LOS FRUTOS</b>	152
INTRODUCCIÓN	153
MATERIALES Y MÉTODOS	154
RESULTADOS	155
DISCUSIÓN	163
CONCLUSIONES	166
<b>CAPÍTULO 7: COMPOSICIÓN DE LOS FRUTOS</b>	167
INTRODUCCIÓN	168
MATERIALES Y MÉTODOS	170
RESULTADOS	172
DISCUSIÓN	194
CONCLUSIONES	202

**CONCLUSIONES GENERALES**

203

**BIBLIOGRAFIA**

205

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### El género *Berberis* en Patagonia y sus usos

La importancia de la flora nativa como fuente de alimentos, lubricantes, resinas, ceras, colorantes, fibras, energía, sustancias aromáticas y medicinales, con valor ornamental y ecológico es bien conocida. Sin embargo, este interés sobre la flora nativa va acompañado por la actividad humana creciente que impacta sobre ella y la deteriora. En el mundo existen grandes áreas con plantas autóctonas aún no domesticadas (Monge et al., 2000). Sin embargo, sólo unas pocas especies han sido evaluadas por sus potenciales agronómico y medicinal (Iriondo, 2001; Alonso y Desmarchelier, 2006), por lo que estudios sobre la diversidad de la flora nativa así como sobre su potencial agronómico y medicinal son necesarios (Arena y Vater, 2005).

Las especies nativas de la Patagonia como las del género *Berberis*, comúnmente llamadas “calafates” o “michay”, han hecho una importante contribución a la alimentación y la salud de las culturas locales. Los frutos eran consumidos por los indios Onas de Tierra del Fuego, quienes a su vez empleaban la madera para fabricar flechas. Los Tehuelches preparaban una bebida con los frutos triturados y puestos a macerar en agua, sin dejarlos fermentar (Alonso y Desmarchelier, 2006). El calafate está citado como fuente de alcaloides del tipo de las berberinas y antocianinas, con una aplicación medicinal y tintórea (Pomilio, 1973; Shaffer, 1985; Fajardo Morales et al., 1986; Fajardo Morales, 1987). Las hojas, la corteza y la madera se destacan por sus propiedades astringentes, febrífugas y digestivas, usándose también en afecciones hepáticas, como refrescantes y laxantes (Rapoport et al., 1999; Alonso y Desmarchelier, 2006). Gracias a estas características, son utilizadas por la cultura mapuche (Muñoz et al., 2001), quienes también emplean los frutos en casos de resfríos y fiebre intermitente (Alonso y Desmarchelier, 2006). Las raíces y cortezas también eran usadas como tónico-energizante. Los jugos de los frutos se usaron con fines oftalmológicos (Casamiquela, 2001). Los mapuches elaboran una especie de “chicha” a partir de la fermentación del fruto el cual es luego mezclado con el “chacai”; también elaboran el “vino de calafate” sólo con la fermentación del fruto (Alonso y Desmarchelier, 2006). Los frutos pueden consumirse frescos o elaborados en dulces, mermeladas, jaleas, helados y bebidas sin alcohol (Martínez Crovetto, 1968), siendo además utilizados por los mapuches para realizar tinciones, mientras que las raíces son empleadas para teñir lanas de amarillo (Alonso y Desmarchelier, 2006).

En los últimos años, se ha venido incrementado la demanda de frutos de estos arbustos y en particular de *Berberis microphylla* G. Forst. (en adelante *B. microphylla*), tanto para el consumo en fresco como para la elaboración de diversos productos como

dulces y jaleas, pulpas para la elaboración de helados, frutos deshidratados, bebidas o amargos sin alcohol a base de frutos patagónicos como calafate, sauco, maqui, canchalagua y enebro de la marca "Terma". A su vez, los frutos se emplean en productos cosméticos como champú y acondicionadores capilares con extractos de calafate de la marca "Biferdil". A esto debe sumarse el hecho que se ha incorporado al Código Alimentario Argentino por Resolución Conjunta 22/2006 y 409/2006 la inclusión de frutas originarias de la zona andina como los *Berberis*, autorizando su empleo en productos alimenticios como dulces, mermeladas, licores, helados y confites. Además, la United States Department of Agriculture (USDA) ha aprobado el ingreso a los Estados Unidos del calafate, por lo cual se halla en la lista de frutas y vegetales de dicho organismo. Se estima que anualmente se cosechan no menos de 10 a 15 toneladas de frutos de calafate provenientes de poblaciones naturales de la Patagonia para los usos descriptos, empleándose para ello métodos de cosecha totalmente nocivos para las plantas, al emplear palos para el zarandeo, provocando la rotura de ramas al ser éstas poco lignificadas. A este hecho debe sumarse la progresiva disminución de plantas naturales a lo largo de la Patagonia, provocada por la constante apertura de caminos para el establecimiento de emprendimientos productivos no asociados con la actividad agropecuaria.

***Berberis microphylla* G. Forst. (sinónimo *B. buxifolia* Lam.), su clasificación, distribución y antecedentes.**

En la Patagonia, el género *Berberis* posee una distribución amplia desde Neuquén hasta Tierra del Fuego (**Fig. 1**) (Job, 1942; Orsi, 1984), y está bien representado por 16 especies de arbustos nativos (Orsi, 1984; Bottini et al., 1993). Sin embargo, según una clasificación posterior del género realizada por Landrum (1999), el número de especies es menor al citado por los trabajos previos de Orsi (1984), dado que Landrum agrupa a especies como *B. buxifolia*, *B. microphylla* y *B. heterophylla* bajo un mismo nombre, *B. microphylla* G. Forst., postulando que las diferencias entre las mismas no se mantienen constantes como para conservar su rango de especie. Sin embargo, y si bien ésta es la última clasificación, se contradice con los estudios realizados tanto en el orden morfológico, bioquímico y molecular en el género *Berberis* por Bottini et al. (1999; 2000; 2007), quienes caracterizan y diferencian con precisión a las citadas especies por las técnicas por ellos empleadas.

*Berberis microphylla* G Forst. (sinónimo *B. buxifolia* Lam.) es un arbusto siempreverde y espinoso, que puede llegar hasta los 4 m de altura, y que en Tierra del Fuego a menudo crece en los montes bajos, en los márgenes y claros del bosque de *Nothofagus*, en áreas húmedas de estepas, a lo largo de ríos y arroyos (Moore, 1983).

Se propaga por semillas (Arena y Martínez Pastur, 1994) y por rizomas (Arena y Martínez Pastur, 1995; Arena et al., 1998). Florece en la primavera y sus frutos maduran hacia mediados del verano (Moore, 1983; Arena et al., 2003; Arena y Radice, 2014), teniendo una maduración no climatérica (Rodoni et al., 2014) (**Fig. 2**).

En las plantas de *B. microphylla* creciendo naturalmente en Patagonia, se ha observado una alta variabilidad en los caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos (Bottini, 2000; Arena et al., 2011; Gambineri, 2012), al igual que al comparar la anatomía foliar con plantas crecidas en otros ambientes fuera de la Patagonia (Radice y Arena, 2015), pudiéndose atribuir gran parte de estas diferencias a adaptaciones a factores climáticos, edáficos y ecológicos (Bottini, 2000). Particularmente en Tierra del Fuego, esta especie se caracteriza por encontrarse en ambientes con diferente disponibilidad de luz, agua y nutrientes en el suelo. En este sentido, se han encontrado poblaciones de *B. microphylla* creciendo en ambientes con diferentes contenidos de nutrientes inorgánicos, a saber nitrógeno (0,1 a 0,6%) y fósforo (2,2 a 47,4 ppm) para los primeros 10 cm de suelo, presentando los frutos características físicas muy diferentes entre las mismas (Arena et al., 2011). Por otra parte, se ha observado que la producción de frutos varía con la posición de los mismos en los arbustos, siendo mayor en la mitad superior de los arbustos con relación a la mitad inferior de los mismos, habiendo podido relacionar a su vez estos efectos con el número de ramas productivas en las plantas (Arena et al., 2003). A su vez, se ha encontrado una marcada variación en la intensidad de la luz dentro de los arbustos, encontrando que a la mitad de su altura la incidencia de la luz fue de sólo el 30% de la intensidad plena, con una alta variación entre plantas (9,1 al 74,4%) (Peri y Lasagno, 2006).

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados más arriba y dada la necesidad de introducir a *B. microphylla* al cultivo comercial, el conocimiento del ritmo de crecimiento de los frutos así como de la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los mismos a lo largo de su ontogenia y en diversas estaciones de crecimiento permitirá evaluar su condición de alimento funcional, a la vez que brindar herramientas a la hora de la planificación de un cultivo comercial.

Por otra parte, el conocimiento de las respuestas fenológicas, fisiológicas, morfológicas y composicionales de las plantas de *B. microphylla* frente a modificaciones de las condiciones ambientales, i.e. intensidad de luz y nivel de fertilización permitirá explicar los comportamientos observados en las poblaciones naturales, a la vez que su capacidad de aclimatación frente a dichas condiciones, resultados que también aportarán a la planificación de un cultivo comercial.



**Figura 1.** Distribución de *B. microphylla* en Argentina, desde la provincia de Neuquén hasta Tierra del Fuego.



**Figura 2** IZQ. Arbusto de *B. microphylla* creciendo en las cercanías de la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego. DER. Frutos de *B. microphylla* creciendo en las cercanías de la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego.

### **Hipótesis**

El presente trabajo de tesis sobre *B. microphylla* propone las siguientes hipótesis:

- El crecimiento del fruto y la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono y ácidos orgánicos varían a lo largo de su ontogenia y en diferentes estaciones de crecimiento.
- La composición cuali-cuantitativa de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los frutos varían a lo largo de su ontogenia.
- La fenología, los contenidos de nutrientes y pigmentos foliares, la actividad fotosintética, el crecimiento y la producción de los frutos, la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante son afectados por la intensidad de luz y el nivel de fertilización en diferentes estaciones de crecimiento.

### **Objetivo general**

El presente trabajo de tesis sobre *B. microphylla* propone el siguiente objetivo general:

- Contribuir al conocimiento, la conservación, domesticación y posterior uso sustentable de los recursos vegetales de la Patagonia, pilares fundamentales para su introducción al cultivo y para generar nuevas alternativas productivas para la región y a nivel internacional.

### **Objetivos particulares**

El presente trabajo de tesis sobre *B. microphylla* propone los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar el crecimiento de los frutos y estudiar la evolución cuali-cuantitativa de sus hidratos de carbono y ácidos orgánicos a lo largo de su ontogenia y durante las estaciones de crecimiento 2004/05, 2005/06 y 2007/08.
- Estudiar la evolución cuali-cuantitativa de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los frutos a lo largo de su ontogenia durante la estación de crecimiento 2007/08.
- Evaluar la fenología, los contenidos de nutrientes y pigmentos foliares, la actividad fotosintética, el crecimiento y la producción de los frutos, su composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en plantas cultivadas en macetas bajo tres intensidades de luz (24, 57 y 100% de la luz natural) y con tres niveles de fertili-

zación inorgánica (0,0; 3,4 y 6,7 g de fertilizante por planta), durante las estaciones de crecimiento 2008/09 y 2009/10.

**PARTE I**

**ESTUDIOS EN LOS FRUTOS DE PLANTAS DE  
*Berberis microphylla* G. Forst. DE UNA POBLACIÓN NATURAL**

## **CAPITULO 1**

### **CRECIMIENTO DE LOS FRUTOS Y EVOLUCION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO Y ÁCIDOS ORGÁNICOS**

## **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

### **INTRODUCCIÓN**

La fisiología de la fructificación trae consigo cambios metabólicos a nivel de planta entera que se manifiestan en el crecimiento de los frutos hasta su madurez, y culminación de su ciclo biológico. Las tasas de crecimiento de los frutos varían extremadamente entre especies, según las prácticas culturales, entre los diferentes frutos en la misma copa y son dependientes de las condiciones ambientales, pudiendo además mostrar diferentes patrones de crecimiento.

La evolución de los sólidos solubles y de la acidez en los frutos, son indicadores útiles de los cambios metabólicos que ocurren durante la fructificación y que permiten definir el momento óptimo para la cosecha (Boulton et al., 1996). Tanto los sólidos solubles como la acidez son relativamente fáciles de determinar, pudiendo esta última ser evaluada mediante la determinación del pH o de la acidez total titulable, o de ambos. Los sólidos solubles están compuestos por los hidratos de carbono, los ácidos orgánicos, proteínas, lípidos y minerales varios, siendo los azúcares los principales componentes de ellos en la mayoría de los frutos (Wills et al., 1981). Los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos, compuestos que provienen de la asimilación fotosintética, son de especial importancia en el crecimiento de los frutos y en la fisiología de la maduración. Los hidratos de carbono son los compuestos primarios usados metabólicamente a través de las distintas etapas de crecimiento de los frutos. De hecho, grandes cantidades de estos productos primarios se convierten inmediatamente en otros compuestos tales como ácidos orgánicos, que son también importantes en el metabolismo de la planta (Kramer y Kozlowski, 1979). Los hidratos de carbono son también los principales constituyentes de las paredes celulares, y además proporcionan el esqueleto para la síntesis de grasas y proteínas; grandes cantidades se oxidan en la respiración, otra fracción se acumula como fotosintatos de reserva, y aún otra fracción se utiliza de manera diferente en el metabolismo secundario. Los hidratos de carbono solubles aumentan la presión osmótica de los jugos celulares, e hidratos de carbono tales como pentosanos, pectinas, gomas y mucílagos aumentan la capacidad de retención de agua de los tejidos. Cuantitativamente, los hidratos de carbono son los componentes más importantes de las plantas leñosas, ya que comprenden las tres cuartas partes de su peso seco (Kramer y Kozlowski, 1979). Los hidratos de carbono también son componentes importantes de los atributos sensoriales de calidad en los frutos ya que contribuyen a su dulzor y sabor. En muchas frutas y verduras, los monosacáridos comprenden una porción principal de los azúcares totales. La glucosa y la fructosa son las formas predominantes de azúcares simples que se encuentran, sobre todo en los frutos. La sacarosa, la forma primaria de transporte de los hidratos de carbono en la mayoría de

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

las plantas, es un disacárido que produce glucosa y fructosa por hidrólisis. Las proporciones relativas de glucosa y fructosa pueden variar de un fruto a otro y, en menor medida, en el fruto mismo de acuerdo con la madurez. En muchos frutos (por ejemplo, manzana, pera, frutilla, uva), la glucosa y la fructosa están presentes en mayor cantidad que la sacarosa, pero en ciertos vegetales, como nabo, remolacha, zanahoria, cebolla, maíz dulce, papa dulce y arveja, y en algunos frutos maduros como la banana, piña, durazno y melón, el contenido de sacarosa es superior (Vicente et al., 2009). El contenido de azúcares está determinado por la señal de azúcar, nutrientes, reguladores del crecimiento vegetal y factores físicos que actúan sobre el transporte, metabolismo y acumulación y sobre la relación entre ellos (Zhi et al., 2004). La fibra dietaria soluble incluye hidratos de carbono procedentes del metabolismo secundario como ser pectinas, gomas y mucílagos, pentosanos y otros polisacáridos, mientras que la fibra dietaria insoluble incluye celulosa, hemicelulosa y lignina. La variación en el contenido de la fibra dietaria junto a la variación en la firmeza del fruto durante la maduración de frutos tropicales ha sido citada por El-Zoghbi (1994).

Los ácidos orgánicos y en especial en su relación con los azúcares pueden afectar el sabor de frutas y verduras, siendo los ácidos más abundantes el cítrico y el málico (ambos alifáticos). Por ejemplo, el ácido málico es el principal componente en las manzanas y las peras. Sin embargo, en el caso de las uvas se producen grandes cantidades de ácido tartárico. El contenido de ácido en los frutos y las verduras generalmente disminuye durante la maduración. Por ejemplo, el contenido de ácido cítrico en duraznos disminuye más rápidamente que el contenido de ácido málico, mientras que el contenido de ácido málico en manzanas y peras disminuye más rápidamente que el contenido de ácido cítrico (Vicente et al., 2009). Una correlación entre los factores ambientales, como la temperatura, y el contenido de ácido málico se ha observado en las uvas (Conde et al., 2007). Los ácidos orgánicos aromáticos se producen en varios frutos y verduras, pero en concentraciones muy bajas. El ácido benzoico se produce en los arándanos, el ácido quínico en bananas, y el ácido clorogénico en bananas y papas. La distribución de los ácidos dentro de un fruto tampoco es uniforme (Vicente et al., 2009).

Los seres humanos obtienen hidratos de carbono y ácidos orgánicos, a partir de los frutos y verduras junto con agua, grasas, proteínas, minerales, pigmentos, vitaminas y antioxidantes, entre otros compuestos. Varios estudios indican que el consumo de fibra en la dieta reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y cáncer de colon, entre otros. Además, en las fibras de algunos frutos, como por ejemplo en uvas, existen compuestos con una alta actividad biológica como los polifenoles y carotenoides, en particular antioxidante (Lajolo et al., 2001). Es

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

por ello que los cultivos frutícolas y hortícolas son algunos de los principales componentes de una dieta saludable (Vicente et al., 2009). En ese sentido, el consumo de plantas locales, silvestres o semisilvestres comestibles ha sido importante para la mayoría de las culturas humanas, ya que a menudo contienen una mayor cantidad de nutrientes y compuestos bioactivos que muchas especies cultivadas (Ruiz-Rodríguez et al., 2011). En el género *Berberis*, se han determinado los contenidos de hidratos de carbono y de ácidos orgánicos en los frutos de *B. vulgaris* (Pozniakovskii et al., 2003) y de *B. microphylla* crecidos en Chile (Ruiz et al., 2010). Sin embargo, no hay información disponible sobre la evolución del crecimiento de los frutos conjuntamente con los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos durante la ontogenia de los frutos de *B. microphylla*. Debido a que los cambios composicionales que ocurren particularmente durante la maduración de los frutos afectan tanto las características organolépticas como nutricionales de los mismos, su conocimiento seguramente contribuirá a la optimización de la calidad y aprovechamiento de las cualidades funcionales de los frutos (González-San José et al., 1990; Forney et al., 2012). Por otro lado, la industria alimentaria está exigiendo nuevos ingredientes para el desarrollo de alimentos comerciales, y *Berberis* puede tener un gran potencial como fuente de colores y sabores inusuales, así como de compuestos bioactivos con excelentes propiedades funcionales. Por ello, el estudio de la evolución del tamaño y peso del fruto, en correlación con componentes tales como los sólidos solubles, la acidez total titulable, los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos, pueden contribuir en el establecimiento del valor funcional de los frutos de *B. microphylla* en una etapa de madurez determinada.

#### *Hipótesis*

- El crecimiento y la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono y de los ácidos orgánicos de los frutos de *B. microphylla* varían a lo largo de su ontogenia y entre las estaciones de crecimiento.

#### *Objetivos*

- Evaluar el comportamiento cinético del crecimiento y la evolución cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono y de los ácidos orgánicos de los frutos de *B. microphylla* a lo largo de su ontogenia y durante las estaciones de crecimiento 2004/05, 2005/06 y 2007/08.
- Correlacionar los cambios en el comportamiento cinético con la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono y de los ácidos orgánicos de los

**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

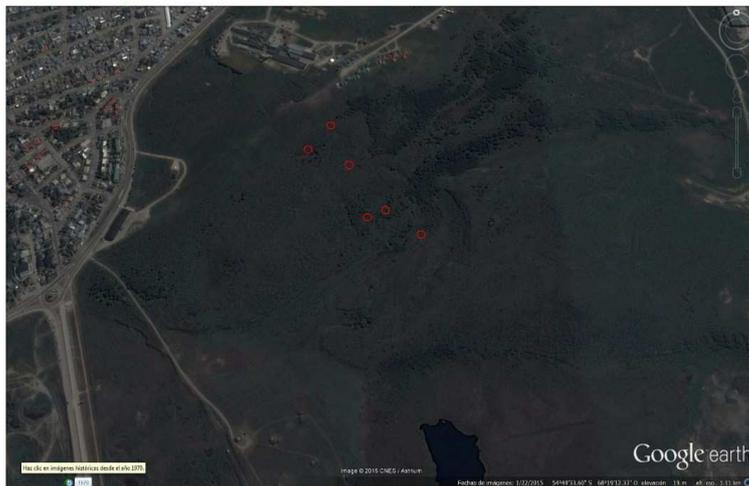
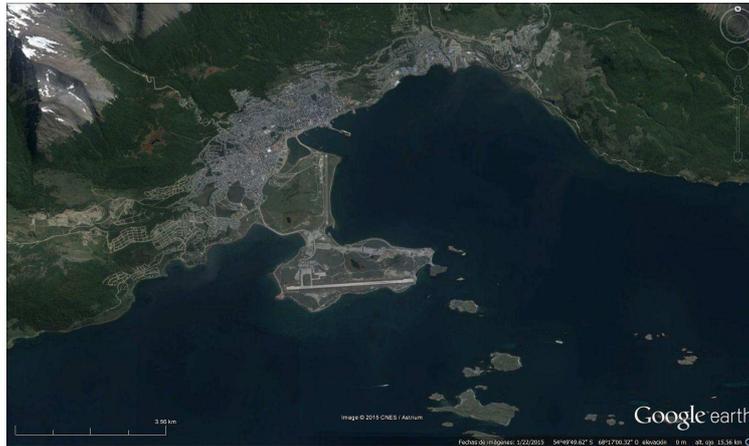
frutos de *B. microphylla* a lo largo de su ontogenia y durante las estaciones de crecimiento 2004/05, 2005/06 y 2007/08.

## Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Datos geográficos y parámetros climáticos

Las plantas adultas de *B. microphylla* seleccionadas para este estudio ( $n = 50$ , con una altura media de  $0,91 \pm 0,15$  m), crecen naturalmente en una población en las cercanías de la ciudad de Ushuaia,  $54^{\circ} 48' \text{ LS}$ ,  $68^{\circ} 19' \text{ LO}$  (Tierra del Fuego, Argentina), habiéndose identificado en la misma 6 sitios de muestreo (**Fig. I.1.1**).



**Figura I.1.Arriba.** Imagen satelital de la ciudad de Ushuaia y sus alrededores. **Abajo.** Imagen satelital de la zona en donde crecen las plantas de *B. microphylla*, indicando los sitios muestreados.

Los datos climáticos registrados fueron: temperatura del aire diaria máxima, mínima y media, humedad relativa del ambiente diaria media y precipitaciones

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

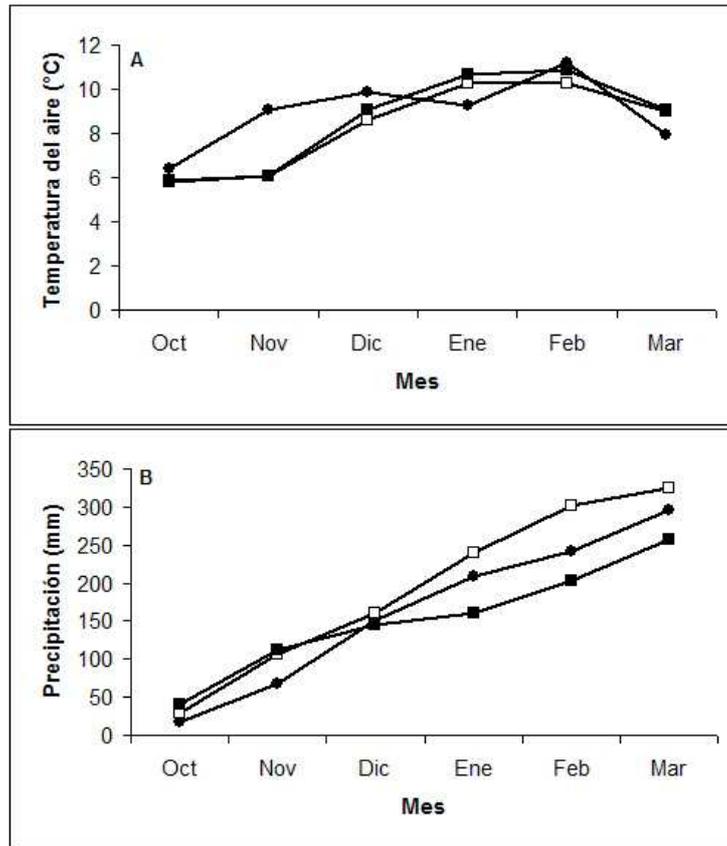
acumuladas. Los datos fueron registrados por la Estación Meteorológica ubicada en el Centro Austral de Investigaciones Científicas (CONICET, Argentina) y a 150-200 m de la población natural, desde octubre a marzo para las estaciones de crecimiento 2004/05, 2005/06 y 2007/08.

La temperatura del aire media fue algo superior (9,0 °C) durante la estación de crecimiento 2004/05 con respecto a 2005/06 y 2007/08 (8,3 y 8,6 °C, respectivamente) (**Tabla I.1.1**). La mayor diferencia en la temperatura del aire media (cerca de 3,0 °C) se observó en Noviembre (**Fig. I.1.2A**) entre las estaciones de crecimiento estudiadas. La temperatura del aire máxima también fue más elevada (13,5 °C) durante 2004/05 con respecto a las estaciones de crecimiento siguientes (12,8 y 12,9 °C respectivamente), mientras que las temperaturas del aire mínimas alcanzadas fueron de 4,6, 4,4 y 4,6 °C durante 2004/05, 2005/06 y 2007/08, respectivamente (**Tabla I.1.1**). La precipitación acumulada fue máxima (324,4 mm) en 2005/06, mientras que se acumularon 295,6 mm en 2004/05 y 257,4 mm en 2007/08 (**Fig. I.1.2B**). La máxima precipitación ocurrió en diciembre para 2004/05, en enero para 2005/06 y en noviembre para 2007/08.

**Tabla I.1.1.** Datos climáticos. Temperatura del aire diaria (°C) máxima (TMA), mínima (TMI) y media (TME); humedad relativa del ambiente diaria media (%) (HRA) y precipitaciones acumuladas (mm) (PA), desde octubre a marzo para las estaciones de crecimiento 2004/05, 2005/06 y 2007/08.

	<b>TMA</b>	<b>TMI</b>	<b>TME</b>	<b>HRA</b>	<b>PA</b>
<i>Estación de crecimiento</i>					
2004/05	13,5	4,6	9,0	74,9	295,6
2005/06	12,8	4,4	8,3	90,6	324,4
2007/08	13,0	4,6	8,6	-----	257,4

### Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos



**Figura I.1.2.** Datos climáticos del área experimental cercana a la ciudad de Ushuaia, 54° 48' LS, 68° 19 LO (Tierra del Fuego, Argentina). **A**, temperatura del aire diaria media y **B**, precipitación acumulada, registradas desde octubre hasta marzo para las estaciones de crecimiento 2004/05 (◼), 2005/06 (◻) y 2007/08 (◼).

#### Material vegetal y muestreos

Los frutos se cosecharon al azar y en forma manual (100-120 g de frutos sanos por muestra), cada 14 días desde noviembre (14 días desde la fase fenológica de plena floración, *DPF*) hasta marzo (126 *DPF*), durante tres estaciones de crecimiento: 2004/05, 2005/06 y 2007/08. La fase de plena floración se presentó a mediados de la primavera y por una a dos semanas durante el período estudiado, mientras que la finalización del período de fructificación se dio el 17, 7 y 5 de marzo para las estaciones de crecimiento 2004/05, 2005/06 y 2007/08, respectivamente. A los 126 *DPF*, solamente unos pocos frutos permanecían en los arbustos y los mismos estaban sobremaduros.

#### Crecimiento de los frutos y las semillas

Los siguientes parámetros fueron evaluados en los frutos enteros ( $n = 6$  con 5 frutos cada muestra): peso fresco de los frutos, peso seco de los frutos (frutos secados

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

en estufa a 50 °C y por 7 a 10 días hasta peso constante), peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco, diámetro ecuatorial y polar de los frutos (usando un calibre digital Mitutoyo Modelo 500-196, 150mm x 6" – 0.01 mm x 0.0005") y firmeza de los frutos (usando un penetrómetro digital Wagner Instruments Modelo FDI 2 (0,001 a 1kgf), con *tips* de 1 mm diámetro). En las semillas obtenidas de frutos abiertos se evaluaron el peso fresco de las semillas, el peso seco de las semillas, el peso seco como porcentaje del peso fresco, el número de semillas y la relación entre peso seco de las semillas y peso seco de los frutos.

### **Sólidos solubles, acidez total titulable y pH**

Los sólidos solubles fueron determinados en el jugo obtenido de 10 g de frutos ( $n = 6$ ) usando un refractómetro ATAGO N1- $\alpha$  con una escala de medición de 0 a 32 °Brix con incrementos de 0,2 °Brix, sin compensación de temperatura. El pH inicial fue registrado mediante un peachímetro, mientras que la acidez total titulable fue determinada con un equipo de titulación manual y un peachímetro, usando una solución de OHNa 0,1 N, y fue expresada como ácido málico, siendo éste el ácido orgánico más abundante en los frutos de *B. microphylla*, según los resultados encontrados en muestras obtenidas previamente a esta experiencia. Además se calculó la relación entre sólidos solubles y la acidez total titulable.

### **Extracción y análisis de los hidratos de carbono**

Los hidratos de carbono disponibles, tales como fructosa y glucosa se analizaron por HPLC (Lee et al., 1992). Las muestras secas de fruta se homogeneizaron inmediatamente antes de los análisis. Una alícuota de muestra (1 g) se pesó, en un vaso de precipitados de 200-ml Pyrex previamente tarado, y se extrajo con 100 ml de agua hirviendo, pH 6-8 durante 30 minutos y después se mantuvo a 85 °C con agitación continua en una placa caliente durante 15 minutos. El extracto resultante se enfrió luego a temperatura ambiente, se ajustó el volumen a 100 ml, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,20 micrones (Minisart Sartorius) antes de la inyección al septum del equipo de HPLC. Este equipo cromatográfico posee un sistema de bomba Waters 6000A, un inyector Waters con una capacidad de muestra de 50  $\mu$ l, un detector de índice de refracción (Waters R40) y un integrador (Módulo de Datos Waters). Para la separación se usó una columna de intercambio aniónico Aminex HPX-87C (Bio-Rad), y agua desionizada a 85 °C como fase móvil, con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. Los azúcares de referencia fueron glucosa, fructosa y sacarosa (Sigma, kit de hidratos de carbono N° CAR-11) e inulina (Sigma, N° I-375). Todas las inyecciones se realizaron por duplicado.

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

Para la fibra dietaria total se utilizó el método 985.29 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La fibra dietética total se determinó por el método enzimático-gravimétrico, de acuerdo con el método 991.43 de la AOAC. Las muestras fueron incubadas con  $\alpha$ -amilasa a 100 °C durante 35 minutos con agitación continua y calor estable para obtener gelatinización, hidrólisis y despolimerización del almidón; a continuación, se incubaron con la proteasa a 60 °C durante 35 min con agitación continua (para solubilizar y despolimerizar proteínas) y con amiloglucosidasa a 60 °C durante 35 minutos con agitación continua (para hidrolizar fragmentos de almidón a glucosa). Las muestras se extrajeron del baño de agua y se trataron con cuatro volúmenes de etanol para precipitar la fibra soluble y eliminar la proteína despolimerizada y la glucosa (a partir de almidón) El residuo se filtró y se lavó secuencialmente con 78% de etanol, 95% de etanol y acetona; luego se secó y se pesó. Un duplicado se utilizó para analizar la proteína y el otro se incubó a 525 °C para determinar la ceniza. La fibra dietaria total se calculó como el peso del residuo filtrado y seco menos la suma de los pesos secos de las proteínas y cenizas. La fibra dietaria soluble se calculó por diferencia: fibra dietaria soluble = fibra dietaria total – fibra dietaria insoluble. Estas variables se determinaron en 6 muestras de 10 g de peso fresco de frutos cada una. Los resultados se expresaron como valor medio en g/100 g peso fresco de frutos, mg/g peso seco de frutos y mg por fruto.

### **Extracción y análisis de ácidos orgánicos**

Se preparó un lecho filtrante con una suspensión de 40 g de Celite<sup>®</sup> (filtrante de tierras de diatomeas, Corporation Lompoc, USA) en 100 ml de agua destilada, armando el lecho en un embudo Büchner provisto con papel de filtro de filtrado rápido (tipo Whatman N° 1). Se molieron aproximadamente 20 g de fruta entera y se pesaron 12,5 g de la fruta molida a la tercera cifra decimal. Se transfirieron cuantitativamente a un vaso de precipitado de 500 ml al que se agregó 100 ml de agua destilada. Se homogenizó durante 1 minuto en un homogenizador de alta velocidad (tipo Blender). El extracto obtenido se filtró bajo vacío a través del lecho de Celite<sup>®</sup>, transfiriendo todo el material que pudiera quedar en el homogenizador utilizando dos fracciones de 50 ml de agua destilada. El filtrado se recogió en un matraz de 250 ml, llevando a volumen con agua destilada. El extracto así obtenido se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Una alícuota de 10 ml del extracto se eluyó a través de un cartucho descartable de preparación de muestras Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters Associates, Inc.), para eliminar los interferentes por cromatografía reversa. El cartucho se activó previamente con 5 ml de metanol seguidos de 5 ml de agua destilada y se secó pasando 10 ml de aire antes de

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

pasar la muestra. La misma se pasó por el cartucho descartando los primeros 4-5 ml y recogiendo el volumen restante, el cual se filtró para su análisis por HPLC, a través de un filtro Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Co. Bedford). Las soluciones estándares se prepararon individualmente a diferentes concentraciones entre 0,06 y 3 mg/ml con agua MilliQ. Los estándares de D, L ácido oxálico, L-Tartárico, D, L-málico, cítrico y fumárico fueron provistos por Aldrich Co. (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim). El análisis por HPLC se realizó con una adaptación del método oficial 986.13 de la AOAC (AOAC, 2000) en un sistema equipado con una bomba Waters<sup>TM</sup> 600, una válvula de alta presión de inyección manual, y un detector de arreglo de diodos Waters<sup>TM</sup> 996 (Millipore Co., Milford), monitoreado a 225 nm. La integración se realizó con un sistema de adquisición de datos Millennium 2010 Chromatography software (Millipore Co., Milford). Los ácidos orgánicos se eluyeron isocráticamente (25 °C) a través de una columna Synergi Hydro-RP 80A (250 mm x 4.6mm x 4  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, USA), precedida por un guarda columna alphaBond<sup>TM</sup> C18 (Alltech Associates, Inc.). La fase móvil (0,02 M  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  llevada a pH=2.9 con  $\text{PO}_4\text{H}_3$  85% (m/m)) se filtró a través de una membrana millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Co., Bedford) y fue desgasificada en baño ultrasónico. La velocidad de flujo de la fase móvil se fijó en 0,7 ml/min, y el volumen de inyección de cada muestra fue de 10  $\mu\text{l}$ . Todas las inyecciones se realizaron por duplicado. Estas variables se determinaron en 6 muestras de 20 g de peso fresco de frutos cada una. Los resultados fueron expresados como valor medio en mg/g peso fresco de frutos, mg/g de peso seco de frutos y mg por fruto.

#### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados por ANOVA de doble entrada, y las medias fueron luego separadas usando el Test de Rangos Múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ . Los coeficientes de correlación lineal fueron determinados entre algunos pares de variables.

## **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

### **RESULTADOS**

#### **Crecimiento de los frutos**

Para las variables de crecimiento de frutos y semillas, dado que no se han encontrado diferencias estadísticas entre las 6 repeticiones o sitios, los datos se han analizado como provenientes de una única muestra. Cuando los días desde la plena floración fueron considerados como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en el peso fresco de los frutos, peso seco de los frutos, peso seco de los frutos como porcentaje, diámetro ecuatorial y polar de los frutos (**Tabla I.1.2**). El peso fresco de los frutos aumentó con una tasa media de crecimiento relativa de 11,0% por día (g peso fresco de los frutos/100 g de peso fresco de los frutos/día) a partir de los 14 *DPF*, para alcanzar la máxima biomasa de 372,0 mg a los 98 *DPF*, y a partir de este valor se produjo una disminución promedio de 1,1 % por día en la biomasa fresca hasta el final de la estación de crecimiento. El peso seco de los frutos y peso seco de los frutos como porcentaje también se incrementaron desde los 14 *DPF*, para el peso seco de los frutos se observó una tasa media de 15,3% por día hasta los 112 *DPF* cuando se alcanzó un promedio de biomasa de 120,2 mg por fruto, y en el caso de peso seco de los frutos como porcentaje, a los 126 *DPF* alcanzó un valor máximo de 45,0%. El diámetro ecuatorial y polar también se incrementó desde los 14 *DPF* hasta los valores máximos de 9,2 mm y 8,9 mm, respectivamente, a los 98 y 112 *DPF*, y luego disminuyeron hacia el final de la temporada de crecimiento. Como era esperable, la firmeza cambió significativamente durante el período de fructificación ( $p < 0,001$ ), mostrando su máximo a principios de este período (0,30 kgf), y disminuyendo hacia el final, con valores medios de 0,15 y 0,19 kgf para 112 y 126 *DPF*, respectivamente.

Cuando la estación de crecimiento fue considerada como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en el peso fresco de los frutos, peso seco de los frutos, peso seco de los frutos como porcentaje, diámetro ecuatorial y polar de los frutos (**Tabla I.1.2**). El peso fresco de los frutos (270,4 mg), el peso seco de los frutos (84,5 mg) y el peso seco de los frutos como porcentaje (31,7%) fueron máximos en 2004/05 en comparación con las otras estaciones de crecimiento, al igual que el diámetro ecuatorial (8,2 mm) y polar (8,3 mm).

**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

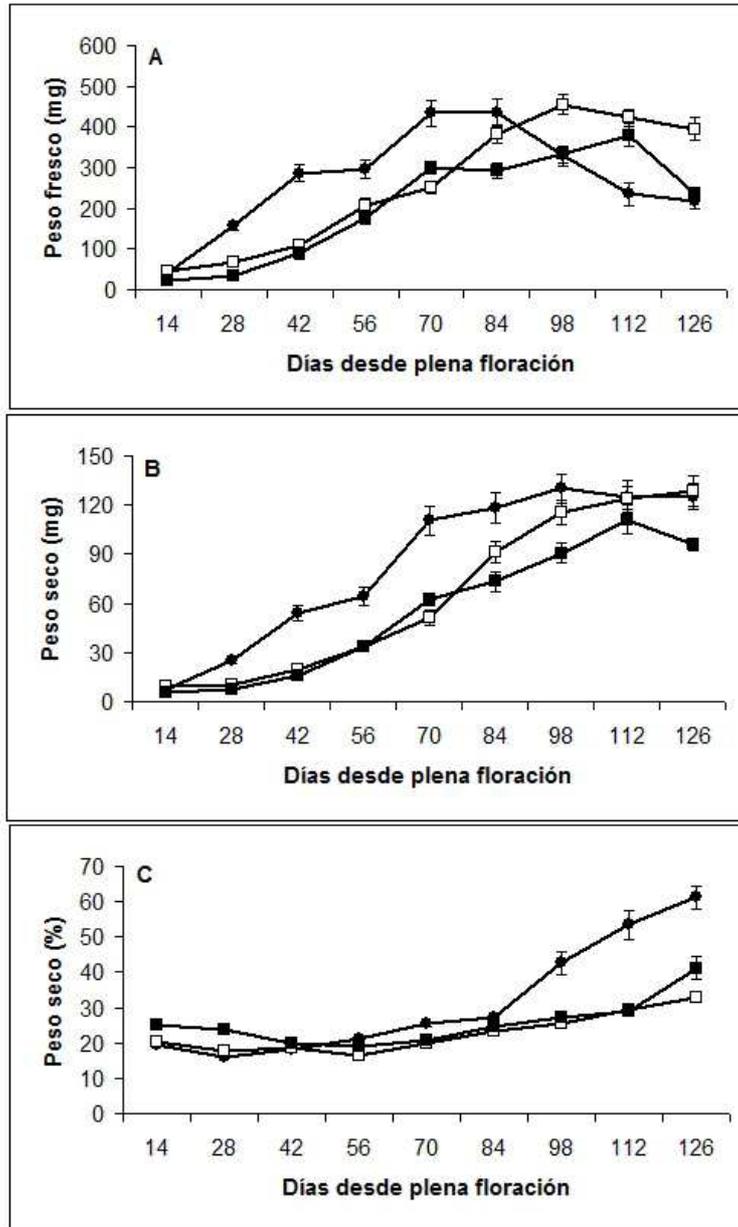
**Tabla I.1.2.** Crecimiento de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) y la estación de crecimiento como efectos principales, y el peso fresco de los frutos (mg) (PFF), peso seco de los frutos (mg) (PSF), peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco (%) (PSF %), diámetro ecuatorial de los frutos (mm) (DEF) y diámetro polar de los frutos (mm) (DPF) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>PFF</b>	<b>PSF</b>	<b>PSF%</b>	<b>DEF</b>	<b>DPF</b>
<i>A = DPF</i>					
14	36,24e	7,49e	21,71de	3,86f	6,10f
28	86,46e	14,55e	19,09e	4,97e	6,72e
42	161,54d	29,95d	18,86e	6,49d	7,48d
56	225,67c	43,91d	18,85e	7,67c	8,17c
70	328,72ab	74,56c	21,94de	8,81ab	8,65ab
84	370,33a	94,37b	25,09d	9,19a	8,70ab
98	371,98a	112,13a	31,72c	9,24a	8,88a
112	345,41a	120,19a	37,28b	9,23a	8,91a
126	282,74b	116,33a	45,05a	8,24bc	8,41bc
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = Estación de crecimiento</i>					
2004/05	270,43a	84,46a	31,66a	8,24a	8,29a
2005/06	259,26a	64,91b	22,62c	7,49b	7,95b
2007/08	206,68b	55,13c	25,58b	6,84c	7,76b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B (p)</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Se encontraron interacciones significativas en todos los parámetros descritos en la **Tabla I.1.2**, debido principalmente a incrementos diferenciales en los valores de las variables entre los principales factores y a diferencias entre las combinaciones (**Fig. I.1.3A-C**), por ejemplo, los pesos fresco y seco de los frutos tuvieron mayores incrementos entre los días 14 y 42 *DPF* en 2004/05 con respecto a las siguientes estaciones de crecimiento, mientras que el peso seco de los frutos como porcentaje tuvo un aumento diferencial al final de la estación de crecimiento 2004/05.

**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**



**Figura I.1.3.** Crecimiento de los frutos de *B. microphylla*. **A**, peso fresco de los frutos, **B**, peso seco de los frutos y **C**, peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco, desde los 14 hasta los 126 DPF para las estaciones de crecimiento 2004/05 (●), 2005/06 (□) y 2007/08 (■). Las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

**Crecimiento de las semillas**

Cuando los días desde la plena floración fueron considerados como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en el peso fresco de las semillas, el peso seco de las semillas, el peso seco como porcentaje del peso fresco, el número de semillas y la relación entre peso seco de las semillas y peso seco de los frutos

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

(**Tabla I.1.3**). Pudo observarse que el peso fresco y seco de las semillas aumentó hasta un máximo de 107,6 y 54,7 mg, respectivamente, valores que fueron obtenidos a los 98 y 112 *DPF*; luego el peso fresco y seco de las semillas disminuyó a 60,5 y 36,3 mg, respectivamente a los 126 *DPF*, debido a que no todas las semillas inicialmente formadas crecieron durante el período de fructificación. El peso seco como porcentaje del peso fresco aumentó durante la estación de crecimiento siendo máximo (59,7%) a los 126 *DPF*. El número de semillas por fruto fue máximo (10,4) a los 42 *DPF*, para luego disminuir a 6 a los 126 *DPF*. La relación entre peso seco de las semillas y peso seco de los frutos fue máxima (0,48) a los 84 *DPF* para posteriormente disminuir a 0,36 hacia el fin de la estación de crecimiento.

Cuando la estación de crecimiento fue considerada como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en el peso fresco y seco de las semillas, el peso seco como porcentaje del peso fresco, el número de semillas y la relación entre peso seco de las semillas y peso seco de los frutos (**Tabla I.1.3**). El peso fresco, el peso seco y el peso seco como porcentaje del peso fresco de las semillas fueron mayores en 2004/05 con respecto a las estaciones de crecimiento siguientes, alcanzando valores de 86,8 y 41,6 mg para el peso fresco y seco de las semillas, respectivamente, y un peso seco como porcentaje del peso fresco del 46,3 para el mismo período. Sin embargo, el número de semillas fue máximo (8,9) en 2007/08, mientras que la relación entre peso seco de las semillas y peso seco de los frutos (0,47) lo fue en 2004/05.

Se encontraron interacciones significativas en todos los parámetros descritos en la **Tabla I.1.3**, debido principalmente a incrementos diferenciales en los valores de las variables entre los principales factores y a diferencias entre las combinaciones (**Fig. I.1.4A-B**), por ejemplo, el peso fresco y seco de las semillas tuvo comportamientos diferentes entre estaciones de crecimiento, particularmente entre 2005/06 y las otras dos estaciones. Ambas variables presentaron mayores incrementos cerca de los 98 *DPF* en 2005/06 con relación a las otras dos. En la **Fig. I.1.5** puede observarse la evolución del crecimiento de los frutos de *B. microphylla* a lo largo de la estación de crecimiento.

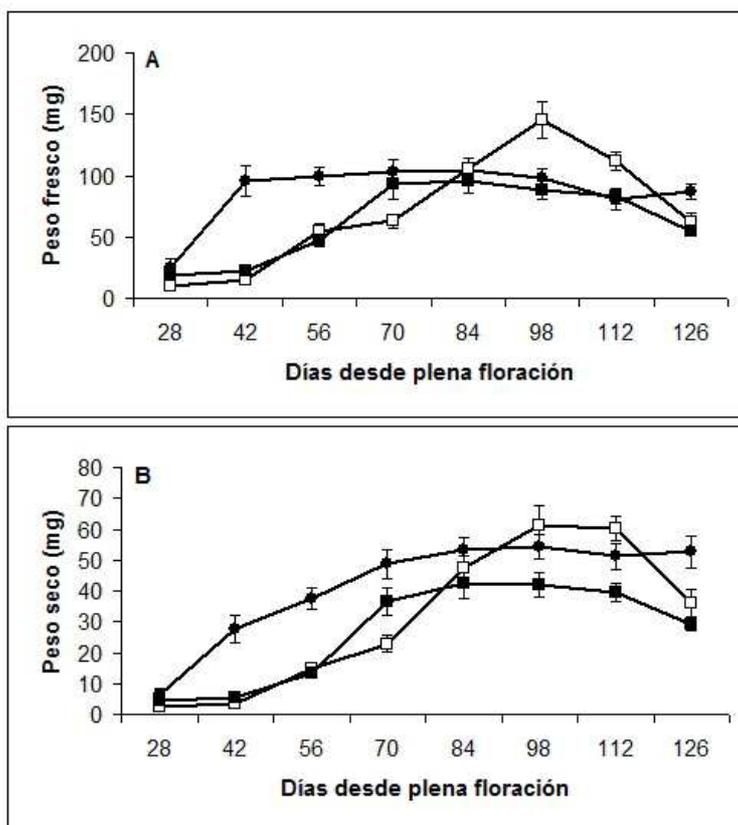
**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

**Tabla I.1.3.** Crecimiento de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios del ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) y la estación de crecimiento como efectos principales, y el peso fresco de las semillas (mg) (PFS), peso seco de las semillas (mg) (PSS), peso seco de las semillas como porcentaje del peso fresco (%) (PSS%), número de semillas (NS) y la relación entre peso seco de las semillas/peso seco de los frutos (PSS/PSF) como variables dependientes.

<b>Efectos</b>	<b>PFS</b>	<b>PSS</b>	<b>PSS%</b>	<b>NS</b>	<b>PSS/PSF</b>
<b>Principales</b>					
<i>A = DPF</i>					
	17,93f	4,50d	26,36de	9,01bc	0,22d
42	42,38e	11,84d	24,53e	10,37a	0,28d
56	74,83cd	23,63c	30,09d	9,34ab	0,43ab
70	83,77bc	33,16b	38,05c	8,57bc	0,44ab
84	101,9ab	46,96a	45,63b	7,92cd	0,48a
98	105,65a	50,36a	48,63b	7,23d	0,43ab
112	100,4ab	54,66a	56,32a	7,17ef	0,41bc
126	60,54de	36,33b	59,70a	5,97f	0,36c
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = Estación de crecimiento</i>					
2004/05	86,77a	41,56a	46,27a	7,62b	0,43a
2005/06	70,69b	31,16b	40,19b	8,05b	0,37b
2007/08	62,79b	25,31c	37,02b	8,90a	0,35b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,031	<0,001
<i>A x B (p)</i>					

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

### Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos



**Figura I.1.4.** Crecimiento de las semillas de los frutos de *B. microphylla*. **A**, peso fresco de las semillas, y **B**, peso seco de las semillas, desde los 28 hasta los 126 DPF para las estaciones de crecimiento 2004/05 (●), 2005/06 (□) y 2007/08 (■). Las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.



**Fig. I.1.5.** Evolución del crecimiento de los frutos de *B. microphylla* a lo largo de su ontogenia. Desde la izquierda a la derecha: fruto pequeño verde en la primera fase de crecimiento rápido, fruto mediano verde en la primera fase de crecimiento rápido, fruto grande verde al fin de la primera fase de crecimiento rápido y fase de crecimiento lento, fruto con 25-50% de la superficie con color púrpura comenzando la segunda fase de crecimiento rápido, fruto maduro, fruto sobremaduro.

## **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

### **Sólidos solubles, acidez total titulable y pH**

Cuando los días desde la plena floración fueron considerados como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en los sólidos solubles, la acidez total titulable, la relación entre los sólidos solubles y la acidez total titulable y el pH (**Tabla I.1.4**). El valor de los sólidos solubles aumentó durante la estación de crecimiento hasta un máximo de 28,2 ° Brix a los 126 *DPF*. La acidez total titulable fue máxima (4,6%) a los 70 *DPF*, para disminuir hacia el final de la maduración. La relación entre los sólidos solubles y la acidez total titulable aumentó a lo largo del período de fructificación, siendo máxima (13,7) a los 126 *DPF*. El pH también aumentó durante la estación de crecimiento hasta un máximo de 3,0 a los 126 *DPF*.

Cuando la estación de crecimiento fue considerada como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en los valores de los sólidos solubles, la acidez total titulable, la relación entre los sólidos solubles y la acidez total titulable y el pH (**Tabla I.1.4**). El valor de los sólidos solubles fue máximo (22,2 °Brix) en 2004/05, mientras que la acidez total titulable (3,7%) lo fue en 2007/08. La relación entre los sólidos solubles y la acidez total titulable fue máxima (8,7) en 2004/05, al igual que el pH (3,0).

Se encontraron interacciones significativas en todos los parámetros descritos en la **Tabla I.1.4**, debido principalmente a incrementos diferenciales en los valores de las variables entre los principales factores y a diferencias entre las combinaciones (**Fig. I.1.6A**), por ejemplo, los sólidos solubles mostraron los mayores incrementos entre los 84 y 98 *DPF* en 2004/05, mientras que la acidez total titulable tuvo un incremento diferencial en 2007/08 con respecto a las otras estaciones de crecimiento.

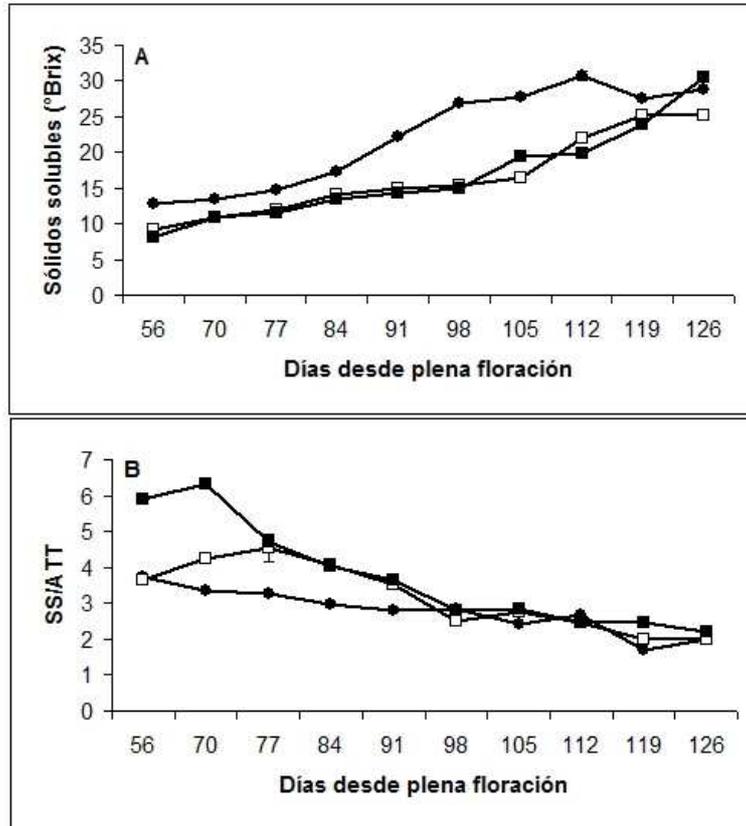
**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

**Tabla I.1.4.** Composición de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios del ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) y la estación de crecimiento como efectos principales, y los sólidos solubles (° Brix) (SS), acidez total titulable (%) (ATT), relación sólidos solubles/acidez total titulable (SS/ATT) y pH inicial (pH) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>SS</b>	<b>ATT</b>	<b>SS/ATT</b>	<b>pH</b>
<i>A = DPF</i>				
56	10,16j	4,43ab	2,42i	2,91b
70	11,74i	4,63a	2,78hi	2,83c
77	12,67h	4,18b	3,18h	2,80c
84	14,95g	3,69c	4,13g	2,76c
91	17,18f	3,34c	5,30f	2,79c
98	19,04e	2,71d	6,94e	2,92b
105	21,24d	2,67d	8,06d	2,90b
112	24,20c	2,52d	9,33c	2,93b
119	25,49b	2,05e	12,81b	2,97b
126	28,19a	2,05e	13,65a	3,05a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = Estación de crecimiento</i>				
2004/05	22,22a	2,78c	8,73a	3,04a
2005/06	16,52b	3,16b	6,17b	2,89b
2007/08	16,72b	3,73a	5,67c	2,73c
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B (p)</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

### Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos



**Figura I.1.6.** Evolución del contenido de sólidos solubles en **A** y de la relación entre los sólidos solubles y la acidez total titulable (SS/ATT) en **B** de los frutos de *B. microphylla*, desde los 56 hasta los 126 DPF para las estaciones de crecimiento 2004/05 (●), 2005/06 (□) y 2007/08 (■). Las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

#### Contenido de hidratos de carbono

Cuando los días desde la plena floración fueron considerados como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en glucosa, fructosa, glucosa más fructosa, fibra dietaria insoluble, fibra dietaria soluble y fibra dietaria total expresados en g/100 g peso fresco de los frutos (**Tabla I.1.5**), mg/g peso seco de los frutos (**Tabla I.1.6**) y mg por fruto (**Tabla I.1.7**). Los contenidos de glucosa, fructosa, glucosa más fructosa fueron máximos a los 126 DPF para los tres términos de expresión presentados. La glucosa alcanzó valores de 8,4 g/100 g peso fresco de los frutos, 203,8 mg/g peso seco de los frutos y 25,3 mg/fruto a los 126 DPF, mientras que la fructosa llegó a 6,2 g/100 g peso fresco de los frutos, 145,2 mg/g peso seco de los frutos y 17,5 mg/fruto a los 126 DPF, dando la suma de glucosa más fructosa 14,6 g/100 g peso fresco de los frutos, 349,0 mg/g peso seco de los frutos y 42,9 mg/fruto a los 126 DPF.

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

Los valores de fibra (insoluble, soluble y total) mostraron variaciones en sus contenidos de acuerdo a los términos de expresión. Así, la fibra dietaria insoluble aumentó hasta un máximo de 13,7 g/100 g peso fresco de los frutos a los 126 *DPF*, mientras que alcanzó valores máximos a los 56 *DPF* cuando se expresó en base a peso seco (505,7 mg/g peso seco de los frutos), y el máximo se presentó a los 84 *DPF* cuando se expresó en base al fruto (40,2 mg/fruto). La fibra dietaria soluble presentó sus valores máximos de 2,7-2,8 g/100 g peso fresco de los frutos entre los 70 y 84 *DPF* para luego disminuir, mientras que los picos máximos se presentaron entre lo 56 y 70 *DPF* al ser expresados en base a peso seco (120,2 mg/g peso seco de los frutos), mostrando una tendencia variable al ser expresado en base al fruto. La fibra dietaria total mostró un comportamiento similar a la fibra dietaria insoluble.

Cuando la estación de crecimiento fue considerada como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en los contenidos de glucosa, fructosa, glucosa más fructosa, fibra dietaria insoluble, fibra dietaria soluble y fibra dietaria total expresados en g/100 g peso fresco de los frutos (**Tabla I.1.5**), mg/g peso seco de los frutos (**Tabla I.1.6**) y mg por fruto (**Tabla I.1.7**). La glucosa y la fructosa fueron máximas en 2004/05 para los tres términos de expresión presentados. La glucosa alcanzó valores de 6,0 g/100 g peso fresco de los frutos, 157,6 mg/g peso seco de los frutos y 17,9 mg/fruto en 2004/05, mientras que la fructosa llegó a 4,3 g/100 g peso fresco de los frutos, 111,3 mg/g peso seco de los frutos y 12,8 mg/fruto en 2004/05, dando la suma de glucosa más fructosa 10,3 g/100 g peso fresco de los frutos, 269,0 mg/g peso seco de los frutos y 30,8 mg/fruto en 2004/05. La fibra dietaria insoluble fue máxima en 2004/05 cuando se expresó en base a peso fresco y fruto (11,5 g/100 g peso fresco de los frutos y 36,1 mg/fruto, respectivamente), mientras que su máximo fue en 2005/06 cuando se la expresó en peso seco (447,8 mg/g peso seco de los frutos). Similares tendencias a la fibra dietaria insoluble presentaron la fibra dietaria soluble y la total.

Se encontraron interacciones significativas entre las variables que figuran en las **Tablas I.1.5, I.1.6 y I.1.7** y **Fig. I.1.7 y I.1.8**; por ejemplo, el contenido de glucosa y fructosa, así como la suma de ambos contenidos presentaron los mayores incrementos a principios del período de fructificación durante la temporada de crecimiento 2004/05, mientras que los mayores incrementos en estos parámetros se observaron más tarde para las estaciones de crecimiento posteriores (**Fig. I.1.7**). El patrón de acumulación de glucosa más fructosa durante el período de fructificación varió con la temporada de crecimiento, es decir, en la primer temporada de crecimiento, sólo el 35,9% del total de glucosa más fructosa, expresada en mg/g peso seco de frutos se acumuló durante la última fase de crecimiento rápido, mientras que

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

las frutas acumularon el 100,0% y el 59,7 del total de glucosa más fructosa, expresada en mg/g peso seco de frutos durante la última fase de crecimiento rápido, en las siguientes temporadas de crecimiento. Sin embargo, cuando el contenido de estos carbohidratos se expresa en mg/fruto, el 71,1; 100,0 y 69,9% del total de glucosa más fructosa, se acumuló durante la última fase de crecimiento rápido en las estaciones de crecimiento 2004/05, 2005/06 y 2007/08, respectivamente. Similar comportamiento se observó al expresar los contenidos de glucosa más fructosa en g/100 g peso fresco de frutos.

Las fibras dietéticas solubles e insolubles exhibieron comportamientos diferentes entre las estaciones de crecimiento estudiadas (**Fig. I.1.8**). Los contenidos en fibra dietaria insoluble y total aumentaron a lo largo del período de fructificación al expresarse en términos de peso fresco de frutos, mientras que la fibra dietaria soluble tuvo oscilaciones a lo largo de este período. Sin embargo, la fibra dietaria insoluble disminuyó durante el proceso de fructificación en términos de mg/g peso seco de frutos mientras que cuando fue expresado en mg/fruto, tuvo un comportamiento diferente dependiendo de la estación de crecimiento, como ocurrió con la fibra dietaria soluble. Sin embargo, cuando se considera la fibra dietaria total, expresada en mg/g peso seco de frutos, aparece una tendencia clara, aumentando hasta un valor máximo durante el primer período de aumento rápido, para disminuir a continuación hacia el final de la maduración del fruto. Las conductas descritas muestran algunas diferencias cuando se expresa en mg/fruto.

**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

**Tabla I.1.5.** Evolución en el contenido de hidratos de carbono en los frutos de *B. microphylla* en g/100 g peso fresco de los frutos. Valores medios de ANOVA considerando los días desde plena floración (*DPF*) y la estación de crecimiento como factores principales, y glucosa (G), fructosa (F), glucosa+fructosa (G+F), fibra dietaria insoluble (FDI), fibra dietaria soluble (FDS) y fibra dietaria total (FDT) como variables dependientes.

<b>Efectos Principales</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>G+F</b>	<b>FDI</b>	<b>FDS</b>	<b>FDT</b>
<i>A = DPF</i>						
42	0,64f	0,47f	1,11f	9,05c	2,09bc	11,14e
56	1,17ef	0,86e	2,03e	9,48c	2,28ab	11,76de
70	1,60e	1,20e	2,81e	10,62b	2,72a	13,34bc
84	2,58d	2,05d	4,63d	10,89b	1,72bc	12,62cd
98	5,33c	4,46c	9,79c	10,68b	2,85a	13,54bc
112	6,76b	5,00b	11,76b	11,43b	2,71a	14,15ab
126	8,37a	6,24a	14,62a	13,69a	1,48c	15,18a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = Estación de crecimiento</i>						
2004/05	5,97a	4,32c	10,30a	11,54a	3,22a	14,77a
2005/06	3,55b	2,34b	5,89b	10,24b	1,93b	12,17b
2007/08	1,81c	2,03a	3,85c	10,72b	1,64b	12,37b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,421	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B (p)</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

**Tabla I.1.6.** Evolución en el contenido de hidratos de carbono en los frutos de *B. microphylla* en mg/g peso seco de los frutos. Valores medios del ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) y la estación de crecimiento como efectos principales, y glucosa (G), fructosa (F), glucosa + fructosa (G+F), fibra dietaria insoluble (FDI), fibra dietaria soluble (FDS) y fibra dietaria total (FDT) como variables dependientes.

<b>Efectos Principales</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>G+F</b>	<b>FDI</b>	<b>FDS</b>	<b>FDT</b>
<i>A = DPF</i>						
42	34,01f	24,95e	58,97e	479,74a	111,82a	591,56a
56	56,15e	42,00d	98,16d	505,74a	120,19a	625,94a
70	66,85e	51,65d	118,51d	486,30a	120,23a	606,53a
84	98,42d	79,15c	177,57c	436,49b	67,69b	504,18b
98	162,20c	139,3ab	301,49b	351,88c	82,94b	434,82b
112	176,07b	133,72b	310,51b	314,98c	86,05b	401,0bc
126	203,78a	145,18a	348,97a	325,58c	30,98c	356,57c
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = estación de crecimiento</i>						
2004/05	157,65a	111,33a	268,98a	362,74b	111,21a	473,95c
2005/06	120,39b	81,11b	201,50b	447,78a	84,56b	532,34a
2007/08	64,04c	71,54c	135,59c	432,65a	69,90c	502,55b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B (p)</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

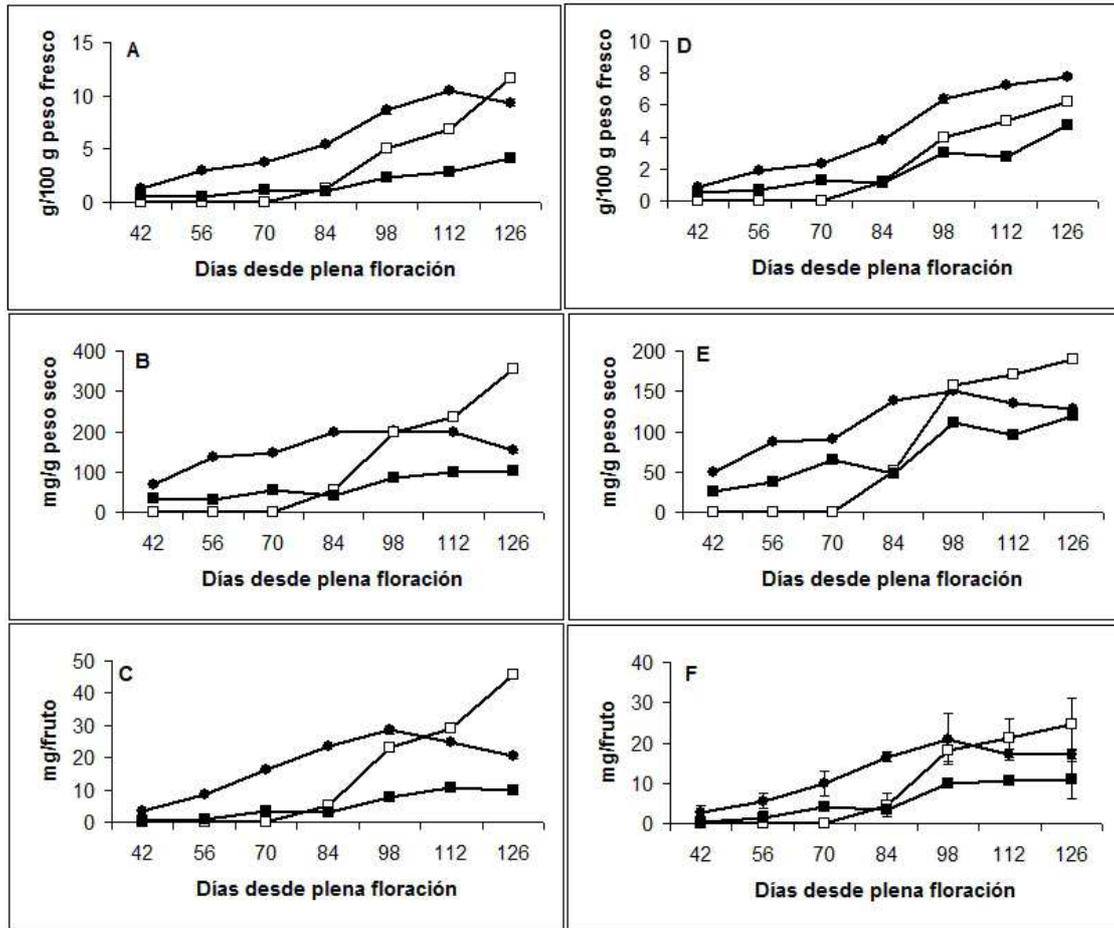
**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

**Tabla I.1.7.** Evolución en el contenido de hidratos de carbono en los frutos de *B. microphylla* en mg/fruto fresco. Valores medios del ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) y la estación de crecimiento como efectos principales, y glucosa (G), fructosa (F), glucosa + fructosa (G+F), fibra dietaria insoluble (FDI), fibra dietaria soluble (FDS) y fibra dietaria total (FDT) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>G+F</b>	<b>FDI</b>	<b>FDS</b>	<b>FDT</b>
<i>A = DPF</i>						
42	1,39g	1,01e	2,40f	13,95d	4,09c	18,04d
56	3,24f	2,27e	5,52e	21,72c	5,41bc	27,13c
70	6,48e	4,65d	11,13d	35,51b	9,82a	45,34ab
84	10,50d	8,17c	18,68c	40,25a	6,53b	46,78a
98	19,70c	16,4ab	36,09b	39,77a	9,97a	49,75a
112	21,56b	16,21b	37,77b	37,6ab	10,28a	47,86a
126	25,35a	17,55a	42,90a	38,29a	3,96c	42,25b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = estación de crecimiento</i>						
2004/05	17,94a	12,81a	30,76a	36,12a	10,70a	46,82a
2005/06	14,69b	9,76b	24,45b	33,30b	6,29b	39,59b
2007/08	5,17c	5,81c	10,97c	27,80c	4,47c	32,37c
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B (p)</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos



**Figura I.1.7.** Evolución del contenido de hidratos de carbono de los frutos de *B. microphylla*. **A, B y C**, contenido de glucosa expresado en g/100 g peso fresco de frutos, mg/g de peso seco de frutos y mg por fruto, respectivamente, y **D, E y F**, contenido de fructosa expresado en g/100 g peso fresco de frutos, mg/g de peso seco de frutos y mg por fruto, respectivamente, desde los 42 hasta los 126 DPF para las estaciones de crecimiento 2004/05 (●), 2005/06 (□) y 2007/08 (■). Las barras representan ± 1 error estándar de la media.

## Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos

**Figura I.1.8.** Evolución del contenido de hidratos de carbono de los frutos de *B. microphylla*. **A, B y C**, contenido de fibra dietaria insoluble expresado en g/100 g peso fresco de frutos, mg/g de peso seco de frutos y mg por fruto, respectivamente; **D, E y F**, contenido de fibra dietaria soluble expresado en g/100 g peso fresco de frutos, mg/g de peso seco de frutos y mg por fruto, respectivamente, desde los 42 hasta los 126 *DPF* para las estaciones de crecimiento 2004/05 (■), 2005/06 (□) y 2007/08 (▣). Las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

## **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

### **Contenido de ácidos orgánicos**

Cuando los días desde la plena floración fueron considerados como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en los contenidos de los ácidos cítrico, fumárico, málico, oxálico, tartárico y orgánicos totales expresados en mg/g peso fresco de los frutos (**Tabla I.1.8**), mg/g peso seco de los frutos (**Tabla I.1.9**) y mg por fruto (**Tabla I.1.10**). Los contenidos de ácido cítrico, fumárico y málico aumentaron durante el período de fructificación siendo máximo entre los 56 y 84 *DPF* para los tres términos de expresión estudiados (mg/g peso fresco de los frutos, peso seco de los frutos y mg por fruto), para luego disminuir hacia el final del período de fructificación. Así los contenidos máximos alcanzados para ácido cítrico, fumárico y málico fueron de 2,1, 0,05 y 14,0 mg/g peso fresco de los frutos. Los contenidos de ácido oxálico y tartárico variaron a lo largo del período de fructificación de acuerdo a los términos de expresión referidos (mg/g peso fresco de los frutos, peso seco de los frutos y mg por fruto). Así, el ácido oxálico presentó una tendencia variable a lo largo del período de fructificación cuando se expresó en términos de mg/g peso fresco de los frutos, mientras que el ácido tartárico presentó los máximos valores entre los 42 y 70 *DPF* (1,2 mg/g peso fresco de los frutos). Los ácidos oxálico y tartárico presentaron sus máximos valores a los 42 *DPF* cuando se expresaron en términos de peso seco (11,9 y 6,5 mg/g peso seco de los frutos, respectivamente), mientras que dichos máximos se

Cuando la estación de crecimiento fue considerada como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en los contenidos de ácido cítrico, fumárico y oxálico expresados en mg/g peso fresco de los frutos, mg/g peso seco de los frutos y mg por fruto. (**Tablas I.1.8, I.1.9 y I.1.10**). Los contenidos de ácido cítrico y oxálico fueron mayores en 2004/05 con respecto a las siguientes estaciones de crecimiento, por ej. (2,9 y 2,8 mg/g peso fresco de los frutos), mientras que el contenido de ácido fumárico fue mayor en 2007/08 (0,05 mg/g peso fresco de los frutos). Los contenidos de los ácidos orgánicos totales fueron máximos en 2004/05, aunque sólo presentaron diferencias significativas cuando fueron expresados en mg/g peso fresco de los frutos y mg/fruto.

Se encontraron interacciones significativas entre las variables que se muestran en las **Tablas I.1.8 a I.1.10** y en la **Fig. I.1.9**, por ejemplo, el contenido de ácido cítrico mostró una disminución abrupta después de alcanzar su punto máximo entre 70 y 84 *DPF* en 2004/05, mientras que esta disminución fue más suave para las siguientes temporadas de crecimiento. El contenido de ácido málico mostró un aumento brusco entre los 56 y 70 *DPF* en 2005/06 y 2006/07 cuando se expresó en términos de peso fresco de los frutos y peso seco de los frutos, mientras que este incremento fue más suave en 2004/05.

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

El patrón en los contenidos de ácidos orgánicos durante el período de fructificación varió de acuerdo a la temporada de crecimiento y los términos de su expresión, es decir, el ácido cítrico expresado en mg/g peso seco de frutos mostró picos a los 70 días desde la fase de plena floración en las temporadas 2004/05 y 2005/06, para luego disminuir hacia el final del período de fructificación, mientras que en la temporada 2007/08 el contenido de el ácido cítrico se mantuvo constante hasta el final de este período (**Figura I.1.9B**). Al expresar el ácido cítrico en mg/fruto los picos aparecieron más tarde, i. e a los 84, 98 y 112 días desde la fase de plena floración en las temporadas de cultivo 2004/05, 2005/06 y 2007/08, respectivamente (**Figura I.1.9C**).

**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

**Tabla I.1.8.** Evolución en el contenido de ácidos orgánicos en los frutos de *B. microphylla* en mg/g peso fresco de los frutos. Valores medios del ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) y la estación de crecimiento como efectos principales, y ácido cítrico (AC), fumárico (AF), málico (AM), oxálico (AO), tartárico (AT) y ácidos orgánicos totales (AOT) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>AC</b>	<b>AF</b>	<b>AM</b>	<b>AO</b>	<b>AT</b>	<b>AOT</b>
<i>A = DPF</i>						
42	0,68c	0,035ab	5,51c	2,24a	1,21a	9,68c
56	0,94bc	0,050a	7,97bc	1,92a	1,11ab	12,00bc
70	2,02a	0,041a	13,98a	2,17a	1,25a	19,49a
84	2,12a	0,019bc	12,04ab	1,56a	0,87ab	16,63ab
98	1,89a	0,009c	8,84bc	1,51a	0,67b	12,93bc
112	1,58ab	0,006c	5,97c	1,51a	0,69b	9,76c
126	1,69a	0,006c	6,84c	2,27a	0,97ab	11,80bc
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,019	0,002	<0,001
<i>B = Estación de crecimiento</i>						
2004/05	2,89a	0,005b	9,02	2,82a	1,14a	15,89a
2005/06	0,95b	0,031a	8,07	1,15b	0,71b	10,92b
2007/08	0,85b	0,035a	9,11	1,68c	1,05a	12,75b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,421	<0,001	<0,001	0,001
<i>Interacciones A x B (p)</i>	0,029	<0,001	0,243	0,039	0,029	0,247

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

**Tabla I.1.9.** Evolución en el contenido de ácidos orgánicos en los frutos de *B. microphylla* en mg/g peso seco de los frutos. Valores medios del ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) y la estación de crecimiento como efectos principales, y ácido cítrico (AC), fumárico (AF), málico (AM), oxálico (AO), tartárico (AT) y ácidos orgánicos totales (AOT) como variables dependientes ( $n = 6$ ).

<b>Efectos principales</b>	<b>AC</b>	<b>AF</b>	<b>AM</b>	<b>AO</b>	<b>AT</b>	<b>AOT</b>
<i>A = DPF</i>						
42	3,71c	0,186b	29,55bc	11,93a	6,48a	51,87bc
56	4,68c	0,285a	41,58b	9,95ab	5,89a	62,40ab
70	8,72a	0,202b	64,17a	9,88ab	5,82a	89,81a
84	8,17ab	0,080c	48,27ab	6,11bc	3,49b	66,13ab
98	5,61bc	0,030c	28,93bc	4,62c	2,13b	41,34bc
112	4,00c	0,021c	17,20c	3,77c	1,87b	26,88c
126	3,61c	0,014c	16,21c	4,96c	2,30b	27,11c
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = Estación de crecimiento</i>						
2004/05	9,29a	0,020b	31,73	9,77a	4,26	55,09
2005/06	4,08b	0,168a	36,67	5,48b	3,45	49,87
2007/08	3,13b	0,163a	37,41	6,70b	4,29	51,71
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,361	<0,001	0,134	0,656
<i>Interacciones A x B (p)</i>	0,002	<0,001	0,230	0,025	0,035	0,193

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

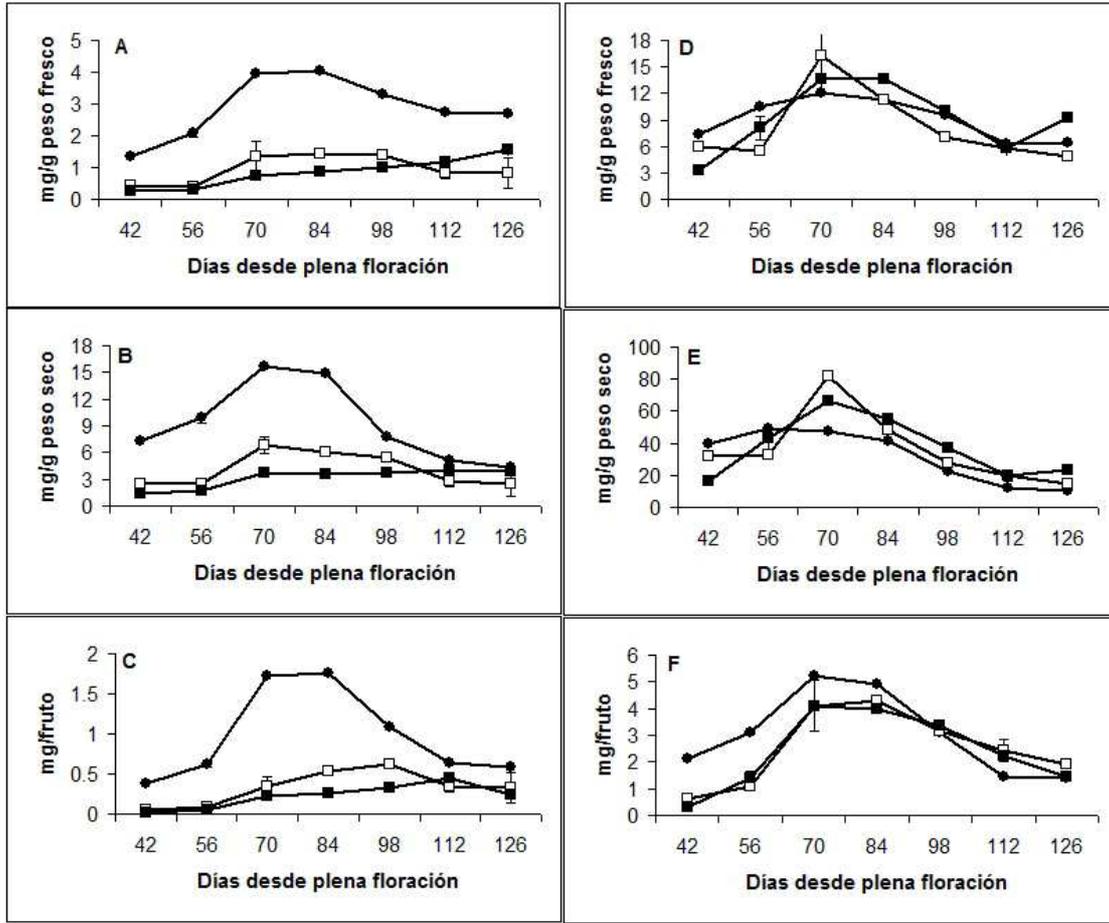
**Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

**Tabla I.1.10.** Evolución en el contenido de ácidos orgánicos en los frutos de *B. microphylla* en mg/fruto fresco. Valores medios del ANOVA considerando los días desde la plena floración (*DPF*) y la estación de crecimiento como efectos principales, y ácido cítrico (AC), fumárico (AF), málico (AM), oxálico (AO), tartárico (AT) y ácidos orgánicos totales (AOT) como variables dependientes ( $n = 6$ ).

<b>Efectos principales</b>	<b>AC</b>	<b>AF</b>	<b>AM</b>	<b>AO</b>	<b>AT</b>	<b>AOT</b>
<i>A = DPF</i>						
42	0,15d	0,004cd	1,01c	0,43b	0,23b	1,88d
56	0,25cd	0,009ab	1,87c	0,47ab	0,26b	3,12cd
70	0,76a	0,011a	4,47a	0,73a	0,40a	7,31a
84	0,85a	0,006bc	4,40a	0,60ab	0,32ab	7,43a
98	0,68ab	0,003cd	3,21b	0,53ab	0,23b	4,72b
112	0,48bc	0,002d	2,04c	0,44b	0,22b	3,43bc
126	0,42c	0,001d	1,83c	0,56ab	0,25b	3,11cd
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,023	0,002	<0,001
<i>B = Estación de crecimiento</i>						
2004/05	0,97a	0,001b	3,04	0,88a	0,36a	5,32a
2005/06	0,33b	0,006a	2,52	0,32b	0,19b	3,55b
2007/08	0,24b	0,008a	2,50	0,41b	0,26b	4,41b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,050	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B(p)</i>	<0,001	<0,001	0,050	0,008	0,001	0,007

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos



**Figura I.1.8.** Evolución del contenido de ácidos orgánicos de los frutos de *B. microphylla*. **A, B y C**, contenido de ácido cítrico expresado en mg/g peso fresco de frutos, mg/g de peso seco de frutos y mg por fruto, respectivamente y **D, E y F**, contenido de ácido málico expresado en mg/g peso fresco de frutos, mg/g de peso seco de frutos y mg por fruto, respectivamente, desde los 42 hasta los 126 DPF para las estaciones de crecimiento 2004/05 (●), 2005/06 (□) y 2007/08 (■). Las barras representan ± 1 error estándar de la media.

## **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

### **DISCUSIÓN**

#### **Análisis de crecimiento y evolución de los hidratos de carbono y ácidos orgánicos a lo largo de la ontogenia de los frutos**

Las tasas de crecimiento de los frutos varían extremadamente entre especies, según las prácticas culturales y entre los diferentes frutos en la misma copa. El período desde la antesis hasta la maduración de los frutos varía desde aproximadamente 3 semanas para los frutos de *Fragaria* spp., hasta 60 semanas en *Citrus sinensis*, mientras que en otros frutos este período se cumplimenta en 15 semanas (Kramer y Kozlowski, 1979). Para el caso de *B. microphylla*, el período de fructificación dura aproximadamente 18 semanas (126 días), alcanzándose el máximo peso fresco de los frutos entre los 84 y 112 DPF. Es bien sabido que la cinética del crecimiento de los frutos puede exhibir dos patrones generales (Sozzi, 2007). El primero de ellos, es una curva sigmoidea simple en la cual el crecimiento exponencial en tamaño es seguido por una desaceleración del crecimiento, un típico comportamiento de crecimiento de los frutos que no son de hueso. Un segundo tipo de crecimiento de frutos consiste en dos períodos de crecimiento sucesivos sigmoideos separados por una fase de crecimiento lenta (Coombe, 1976; Gil-Albert Velarde, 2006), observado en los frutales de hueso así como en los frutos de *Vitis* (Coombe y McCarthy, 2000) y *Ribes* (Wright, 1956; Fernqvist, 1961). En *B. microphylla*, el peso fresco y seco de los frutos cercanamente siguieron el patrón de crecimiento doble sigmoideo, y lo mismo se observó cuando el crecimiento fue evaluado a través de la evolución del diámetro ecuatorial y polar del fruto, aunque con una forma sigmoidea menos pronunciada. Los retrasos en el crecimiento pueden ser causados por el crecimiento de las semillas, y por supuesto las influencias de los factores ambientales y/o condiciones de cultivo no pueden ser descartadas. En *B. microphylla*, el primer período de crecimiento comprendió desde la fase de plena floración hasta aproximadamente 42-70 días después, dependiendo de la estación de crecimiento, período similar al mostrado por otros frutos como por ejemplo los de *Vitis* (Kennedy, 2002), pero más largo que para otros frutos, como ser los de *Ribes* (Toldam-Andersen y Hansen, 1997). Durante este primer período de crecimiento se forma el fruto y se producen las semillas. Una rápida división celular ocurre durante las primeras semanas, y hacia el final de este período, el número total de células dentro del fruto han quedado establecidas (Wright, 1956; Harris et al., 1968). La magnitud de la división celular se verá reflejada en el tamaño definitivo del fruto. En el siguiente período de transición o retardo, el tejido fresco crece lentamente pero las semillas continúan con su crecimiento rápidamente, tal como se ve reflejado en el peso seco de las semillas, de la misma manera que fuera citado para los frutos de *Ribes* (Toldam-

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

Andersen y Hansen, 1997). El comienzo de la segunda fase de crecimiento de los frutos de *B. microphylla*, i.e. el inicio de la maduración de los frutos, se correlaciona con un número de cambios en el metabolismo de las plantas, un proceso conducido por la energía derivada de la respiración. Previamente se ha citado que los cambios asociados con la maduración de los frutos incluye la pérdida de clorofila, el ablandamiento de la pulpa de los frutos, el desarrollo de olor y sabor, y una disminución en el peso seco debido principalmente a la respiración (Kramer y Kozlowski, 1979). En el caso de los frutos de *B. microphylla*, la firmeza disminuyó un 33% en el período que se extiende desde el día 42 hasta el día 84 desde la fase de plena floración cuando los frutos alcanzaron el máximo peso fresco, con un promedio de 0,8% por día de la tasa de maduración. La totalidad de la superficie de los frutos alcanza sus características finales y el color púrpura durante la segunda fase de crecimiento del fruto. Aproximadamente duplican su peso (en términos de peso seco) durante el lapso del crecimiento que necesitan para alcanzar la finalización del segundo período de crecimiento, presumiblemente debido a la división celular dada por el ingreso de agua, el ablandamiento de la pared celular y reconstrucción posterior de la misma, a la vez que por el alargamiento de los tejidos carnosos con la llegada de hidratos de carbono, compuestos de nitrógeno, y otras sustancias que incluyen minerales transportados desde los tejidos fuente. Una disminución en el peso fresco se observó a partir de los 84-112 *DPF* según la estación de crecimiento, un hecho que debe ser considerado para determinar el momento óptimo para la cosecha (Bisson, 2001). Durante la fructificación de *B. microphylla*, una fase inicial de rápida acumulación de los sólidos solubles puede ser atribuida a la hidrólisis de sacarosa produciendo glucosa y fructosa y, a continuación, en algún punto del desarrollo y el envejecimiento de la baya, un aumento en la concentración de los sólidos solubles puede surgir de la deshidratación de las frutas, como se ha informado anteriormente para *Vitis* (Bisson, 2001). Los sólidos solubles se encuentran en las frutas maduras de *B. microphylla* crecidas en las cercanías de Ushuaia a un promedio de 25,0 °Brix, siendo estos valores menores que los citados para los frutos de esta especie (33 °Brix) crecida naturalmente en el sur de Chile (Arribillaga García, 2001).

Una disminución de la firmeza de la fruta típicamente se asocia con la disolución de la lámina media de la pared celular, lo que resulta en una disminución de la adhesión intercelular, despolimerización, y solubilización de los polisacáridos de la pared hemicelulosa y pectinas celulares y, en algunos casos, hinchazón de la pared (Brummell y Harpster, 2001). La maduración también es acompañada por el incremento en la expresión de muchas enzimas de las células que degradan la pared, como las hidrolasas de polisacáridos, transglucosilasas, liasas, y de otras proteínas del

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

ablandamiento de la pared, como la expansina (Harker et al., 1997; Rose et al., 2003; Brummell, 2006). Por lo tanto, los modelos suelen atribuir el ablandamiento de los frutos a la degradación de los polisacáridos de la pared primaria y laminilla media (Rose et al., 2003; Brummell, 2006), aunque otros factores tales como la turgencia celular y la morfología también pueden estar implicados cuando se considera la textura de la fruta (Lin y Pitt, 1986; Shackel et al., 1991). De acuerdo con los resultados obtenidos, el ablandamiento de las bayas de *B. microphylla* ha estado estrechamente vinculado a los cambios en la composición de las paredes celulares del tejido de la fruta. Así fue citado para las bayas de *Vitis*, en el que la maduración se asocia sobre todo a la despolimerización de pectina y xiloglucano (Bisson, 2001).

Los contenidos de glucosa y fructosa en los frutos *B. microphylla* fueron más altos que los reportados para algunas especies de *Actinidia* (Boldingh et al., 2000), para *Ribes grossularia* (Mage, 2002) y para *Clidemia rubra* (Gordon et al., 2011), mientras que fueron comparables a los que se encuentran en *Arbutus unedo* (Ruiz-Rodríguez et al., 2011). La sacarosa se encontró sólo en trazas, como también fuera citado para *Clidemia rubra* (Gordon et al., 2011) y para *Arbutus unedo* (Ruiz-Rodríguez et al., 2011). En general, la sacarosa se produce en las bayas sólo en bajas concentraciones lo cual puede ser explicado por su función de transporte dentro de la planta y la inversión de inmediato a fructosa y glucosa en el lugar de acumulación (Talcott, 2007). Al comparar el contenido de azúcares en los frutos de *B. microphylla* (14,6%) con el de otras frutas como la cereza (9,9%), frutilla (5,5%), arándanos (6%), frambuesa (4,8%), y grosella negra (5%) (Souci et al., 2008), claramente sobresalen los primeros. El contenido de la fibra dietaria total en frutos de *B. microphylla* (15,2%) fue mayor que los reportados para las bayas de *Clidemia rubra* (8,8 g/100 g de peso fresco, Gordon et al., 2011), grosellas negras (6,8 g/100 g de peso fresco, Souci et al., 2008), *Camarinha* (6,5 g/100 g de peso fresco, Bramorski et al., 2011), y de *Vitis* (1 - 3,1%, Pak, 2001). De acuerdo con el contenido de fibra, las frutas *B. microphylla* pueden ser consideradas como frutas ricas en azúcares, tanto disponibles como no disponibles, lo que añade un perfil nutricional valioso a la luz de las recomendaciones nutricionales de la Food and Agricultural Organization y la World Health Organization (FAO/WHO 2003).

Al analizar los cambios en el crecimiento de los frutos junto con la evolución de los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos a lo largo del período de fructificación, se puede observar que los parámetros tales como la biomasa de los frutos y el tamaño alcanzan los valores máximos antes (70-98 *DPF*) que los máximos valores de los hidratos de carbono y los mínimos para los ácidos orgánicos (105 a 112 *DPF*), una conclusión que debe tenerse en cuenta al momento de definir el tiempo óptimo de

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

cosecha de acuerdo con la utilización de la fruta. Además, el análisis del crecimiento junto con la evolución de los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos expresados por fruto a lo largo del período de fructificación, podrían indicar la presencia de una deficiencia de los sustratos debido a una elevada la competencia interna, i.e mínimos contenidos de hidratos de carbono coincidentes por ejemplo con máximas tasas de crecimientos que conducen a una marcada caída de frutos (Toldam-Andersen y Hansen, 1997). En los frutos de *B. microphylla* se ha observado una marcha coincidente para los hidratos de carbono expresados en términos de peso fresco y seco comparado con respecto al fruto para el período estudiado, mientras que para el ácido málico no ocurrió lo mismo al inicio de la fructificación.

### **Análisis de crecimiento y evolución de los hidratos de carbono y ácidos orgánicos de los frutos entre estaciones de crecimiento.**

En la temporada 2004/05, el primer período de rápido aumento del peso fresco de los frutos terminó a los 42 *DPF*, seguido de un período de latencia hasta el día 56 y luego por un segundo período de rápido aumento hasta los 70 *DPF*. Luego de ello, el peso fresco de los frutos aumentó lentamente hasta el día 84 *DPF*, cuando alcanzó su valor máximo. Posteriormente, el peso fresco de los frutos disminuyó significativamente hasta el final del verano. En las siguientes temporadas de crecimiento, se observó el mismo patrón general de crecimiento del fruto, pero en la temporada 2005/06, el segundo período de rápido aumento de peso fresco de los frutos tuvo el mayor incremento y la disminución no fue tan brusca en comparación con 2004/05, mientras que en 2007/08 el período de demora se retrasó en el tiempo respecto a la temporada 2004/05. La evolución de peso seco de los frutos siguió el comportamiento del peso fresco de los frutos hasta la obtención de la máxima biomasa. Sin embargo, el peso seco de los frutos no presentó una disminución significativa después de este tiempo, sobre todo en 2004/05 y 2005/06. Para todas las estaciones estudiadas, el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco tuvo un incremento significativo a los 56 *DPF*, pero en el caso de la temporada 2004/05, este incremento se produjo de manera muy abrupta a partir del día 84 y hasta los 126 *DPF*. En conjunto, el diámetro ecuatorial y polar de los frutos siguió el mismo patrón de comportamiento que el peso fresco de los frutos, sobre todo hasta la obtención de los valores máximos. Es sabido que el crecimiento y composición de los frutos varía entre estaciones de crecimiento y condiciones ambientales (Biale, 1950; Boynton y Wilde, 1959; Kramer y Kozlowski, 1979; Predieri y Dris, 2005). Los efectos de las condiciones ambientales y culturales tanto en el contenido de azúcares como de antocianinas han sido descritos (Kéller y Hrazdina, 1998; Bisson, 2001). Las mayores

### **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

temperaturas diarias en 2004/05 comparadas con otras estaciones de crecimiento pueden estar correlacionadas con la mayor biomasa de los frutos y sus diámetros obtenidos durante el primer y segundo mes del crecimiento de los frutos, así como con el peso fresco de los frutos y con el mayor contenido de sólidos solubles y la relación sólidos solubles y acidez total titulable en el tercer y cuarto mes en la estación de crecimiento 2004/05. Es sabido también que la temperatura es un factor limitante del ritmo de la fotosíntesis en las plantas, por lo que a mayores temperaturas los fotoasimilados se producen a un ritmo mayor, posibilitando un incremento en el transporte de ellos y otros nutrientes desde las hojas a diferentes destinos, incluyendo los frutos (Madore y Lucas, 1995; Zamski y Schaffer, 1996). Para los frutos de *Ribes*, también hubo una correlación con las condiciones climáticas (Toldam-Andersen y Hansen, 1993). Los bajos contenidos en azúcares durante el primer período de rápido crecimiento de los frutos durante las estaciones de crecimiento 2005/06 y 2007/08 se pueden explicar por las mayores diferencias en las temperaturas medias diarias (cerca de 3,0 °C) con respecto a noviembre de la estación de crecimiento 2004/05. Los contenidos en sólidos solubles tuvieron comportamientos similares en comparación con los contenidos en azúcares en las diferentes estaciones de crecimiento, como fue demostrado por su correlación positiva y significativa ( $r = 0,713$ ;  $p < 0,001$ ). El contenido de glucosa fue mayor que el contenido de fructosa durante el proceso de fructificación, excepto en la temporada 2007/08 cuando desde los 56 *DPF* la relación entre glucosa y fructosa fue menor o cercana a 1.

El contenido de ácido málico expresado en mg/g peso seco de frutos presentó picos entre los 56 y 70 *DPF* en las estaciones de crecimiento 2004/05, 2005/06 y 2007/08, mientras que expresado en mg/fruto los picos se observaron entre los 70 y 84 *DPF* para las mismas temporadas de cultivo. El contenido decreciente de ácidos orgánicos a medida que el peso seco de los frutos aumenta ( $r = -0,403$ ;  $p = 0,013$ ) y con la maduración ( $r = -0,708$ ;  $p < 0,001$ ), tiende a ser un fenómeno general en las frutas, y está de acuerdo con los datos de la acidez total titulable medida como porcentaje del peso fresco ( $r = -0,612$ ;  $p < 0,001$ ). Sobre todo en las frutas donde predomina el ácido málico (como manzana y uva), una disminución de la acidez total se encuentra durante la maduración. En particular, un clima cálido da lugar a una concentración de ácidos más baja en estas frutas. Aparentemente, el ácido málico es el principal componente afectado por una degradación respiratoria aumentada por las temperaturas existentes durante la maduración (Toldam-Andersen y Hansen, 1997). La marcada degradación del ácido málico encontrada durante la maduración en la estación cálida inusual en la temporada 2004/05 evidencia el efecto de la temperatura sobre su síntesis en *B. microphylla*.

## **Crecimiento de los frutos. Hidratos de carbono y ácidos orgánicos**

### **CONCLUSIONES**

El crecimiento del fruto y la composición cuali-cuantitativa de los carbohidratos y ácidos orgánicos estudiados mostraron cambios significativos a lo largo de la ontogenia y entre estaciones de crecimiento, pudiendo ser considerados como marcadores de las fases de fructificación y de las condiciones ambientales. Se encontraron correlaciones significativas entre el peso de los frutos y los sólidos solubles, el contenido de los azúcares simples y los ácidos orgánicos, los cuales son parámetros de calidad de la fruta en parte responsables a su vez de la astringencia, textura, sabor y color.

Los patrones de acumulación de los hidratos de carbono y ácidos orgánicos durante la fructificación variaron dependiendo del grupo específico o el compuesto considerado, es decir, azúcares solubles y fibras o el tipo de ácido orgánico. Lo anterior junto con la definición de términos adecuados de referencia, es decir, el contenido de los compuestos sobre la base del peso del fruto fresco, seco o en base a fruto fresco por unidad, es de considerable importancia cuando se comparan con diferentes especies, ya sea desde un punto de vista práctico en cuanto al valor nutricional de una fruta o para la comprensión del efecto de factores tales como la luz y la fertilización en el período de precosecha.

## **CAPITULO 2**

### **EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

## Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

### INTRODUCCION

Durante las últimas décadas la investigación sobre prácticas dietéticas saludables se ha centrado particularmente en los efectos beneficiosos que pueden obtenerse a partir de la adopción de una dieta rica en frutas y verduras. De hecho, estos alimentos pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades crónicas, degenerativas, y enfermedades mediadas por el estrés oxidativo como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Roussos et al., 2009). Como resultado, actualmente la atención se dirige también hacia muchos frutos pequeños que se consideran una fuente de nutrientes orgánicos e inorgánicos y de factores de regulación metabólicos. Además, por sus propiedades nutricionales y medicinales se los considera como alimentos funcionales (Béliveau y Gingras, 2005; Kuskoski et al., 2005). De hecho, los pequeños frutos cultivados de *Ribes*, *Rubus* y de las especies de *Vaccinium* son una excelente fuente de productos naturales con propiedades antioxidantes (Deighton et al., 2002), que se atribuyen principalmente a su alto contenido en polifenoles, especialmente ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, así como a otros importantes antioxidantes naturales como el ácido ascórbico (vitamina C) (Béliveau y Gingras, 2005). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno, y atenuadores de oxígeno, y además también tienen una capacidad quelante potencial de metales (Kähkönen et al., 1999). La selección de un método estandarizado para evaluar la actividad antioxidante debe cumplir con algunos requisitos "ideales" (Prior y Schaich, 2005). El efecto secuestrador de los radicales DPPH (Shimada et al., 1992), la capacidad reductora en la transformación de  $Fe^{3+} - Fe^{2+}$  (Oyaizu, 1986) en presencia de los extractos de las plantas, así como la cuantificación de fenoles mediante el reactivo Folin-Ciocalteu han demostrado ser técnicas sencillas, rápidas, sensibles y precisas, mientras que exhiben una buena reproducibilidad. Se ha encontrado una buena correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante en diversos materiales vegetales (Ferreyra et al., 2007; Turkoglu et al., 2007).

Es importante entender cómo el contenido de los fenoles y los subgrupos cambian durante el crecimiento del fruto y también la forma de medir su actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en flavonoides y no flavonoides. Los flavonoides constituyen una porción significativa de los compuestos fenólicos en los frutos pequeños, por ejemplo en frutos de *Vitis* (Conde et al., 2007), e incluyen varias clases, tales como las proantocianidinas (taninos), antocianinas, y catequinas (flavan-3-ol monómeros). Las antocianinas son los componentes fenólicos principales de las bayas de pequeños frutos, y se ha demostrado que su actividad

### **Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

antioxidante está estrechamente relacionada con el contenido total de fenoles (Deighton et al., 2002). Estos metabolitos secundarios tienen un rol en la defensa de la planta, y se ha demostrado que poseen efectos beneficiosos contra diversas enfermedades (Hou, 2003). Los flavonoides existen ampliamente en el reino vegetal y son particularmente comunes en los tejidos de las hojas y de las flores (Larson, 1988; Zhishen et al., 1999). La biosíntesis de flavonoides es un proceso específico de los tejidos vegetales que está regulado por el desarrollo. Debido a su particular estructura química, se cree que estos compuestos tienen una variedad de funciones en las plantas, por ejemplo proporcionan protección contra la fotooxidación por alta irradiación lumínica y daño por radiación UV, participan en la defensa contra los patógenos, por su fluorescencia bajo irradiación de luz UV natural, a la cual son sensibles los insectos polinizadores, constituyen una guía hacia las flores, son responsables de los colores de las flores y de la pigmentación de los frutos, y también juegan un papel esencial en la reproducción (Gracia Nava, 2011). Los flavonoides también hacen su aporte a ciertas características de calidad en distintos productos alimenticios frescos y procesados, entre ellas la astringencia, textura, sabor y color (Vvedenskaya y Vorsa, 2004). Los factores genéticos y epigenéticos tales como los antecedentes genéticos de las plantas, las etapas de maduración del fruto, las condiciones ambientales durante el crecimiento de las mismas y las prácticas culturales empleadas, todos juntos influyen en la síntesis de los compuestos fenólicos (Kähkönen et al., 2001; Ferreyra et al., 2007) y en la constitución de su capacidad antioxidante (Roussos et al., 2009), resultando en algunos casos aún más relevante el rol de la ontogenia cuando las bayas se utilizan inmaduras, como por ejemplo en los arándanos (*Vaccinium* spp.) para la industria de jugos (Çelik et al., 2008).

Existen algunos antecedentes sobre el estudio de antioxidantes en especies nativas de la Patagonia chilena como en *Aristotelia chilensis*, *Ugna molinae*, *Fragaria chiloensis* (Fredes, 2009), así como también en *Ribes magellanicum*, *R. cucullatum*, *Gaultheria mucronata*, *G. antartica*, *Rubus geoides*, *Myrteola nummularia* y *Fuchsia magellanicum* (Ruiz et al., 2013). Recientemente en el género *Berberis* se realizaron estudios sobre el contenido de fenoles en las hojas (Koncic et al., 2010), en las raíces (Surveswaran et al., 2007; Tomosaka et al., 2008) y en los frutos (Fredes, 2009; Ruiz et al., 2010; 2013; 2014). También se informó el efecto beneficioso de los frutos de *Berberis* en el estrés oxidativo inducido por el cloranfenicol en la sangre humana (Albrecht et al., 2010). Sin embargo, hay una falta de información sobre el importante papel de los factores epigenéticos o de precosecha en la evolución del metabolismo secundario durante la ontogenia del fruto en *B. microphylla*.

## **Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

### *Hipótesis*

- La composición cuali-cuantitativa de los compuestos fenólicos de los frutos de *B. microphylla* varía a lo largo de su ontogenia.
- La actividad antioxidante debida a la presencia de compuestos antioxidantes en los frutos de *B. microphylla* varía a lo largo de su ontogenia.

### *Objetivos*

- Evaluar la evolución de la composición cuali-cuantitativa de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los frutos de *B. microphylla* a lo largo de su ontogenia, entre los 70 y 126 días desde la plena floración (*DPF*) durante la estación de crecimiento 2007-2008.
- Correlacionar la evolución de los compuestos fenólicos y de la actividad antioxidante de los frutos de *B. microphylla* a lo largo de su ontogenia, con el crecimiento y el contenido de hidratos de carbono y ácidos orgánicos, para entender las condiciones óptimas para la obtención del máximo contenido fenólico para su uso como alimento funcional en la preparación de extractos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Datos geográficos y parámetros climáticos**

Los datos geográficos y parámetros climáticos fueron descriptos en el CAPÍTULO 1, PARTE I.

### **Material vegetal y muestreos**

El material vegetal y muestreos fueron descriptos en el CAPÍTULO 1, PARTE I.

### **Evolución del color y del contenido de antocianinas**

Se registró el porcentaje de la superficie de los frutos con color púrpura, mientras que la cuantificación de las antocianinas se llevó a cabo mediante el método de pH diferencial de Giusti y Wrolstad (2001). Muestras ( $n = 6$ ) de 5 g de frutos inicialmente congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  se extrajeron en 50 ml de una solución 0,1% de ClH-MeOH durante 24 h a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego, se hicieron diluciones desde 1:5 hasta 1:80 con un buffer de ClK 0,025 M (pH 1) y un buffer de acetato de sodio 0,4 M (pH 4,5). Se registró la absorbancia a 510 y a 700 nm con un espectrofotómetro Shimadzu 1203 UV-Visible. El contenido de antocianinas en los tejidos de los frutos se determinó sobre la base de un coeficiente de extinción molar de  $26.900\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  y un peso molecular de 449,2 para la cianidina-3-glucósido. Los valores se expresaron en términos de mg/100 g peso fresco de frutos, mg/g peso seco de frutos y mg/fruto. Contenido de antocianinas en los frutos (mg/100 g *PPF*) =  $(A \times \text{peso molecular} \times \text{factor de dilución} \times \text{volumen inicial} / \epsilon \times \text{peso de la muestra}) \times 100$ ,

$$\text{donde } A \text{ (absorbancia)} = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4.5}$$

### **Preparación de los extractos de los frutos y rendimiento de la extracción**

Muestras ( $n = 6$ ) de 10 g de frutos secos se extrajeron con 100 ml de metanol a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h con agitación continua. Luego, el residuo se extrajo dos veces con volúmenes adicionales de 100 ml de metanol durante 48 h, y finalmente se combinaron los tres extractos. El rendimiento de la extracción se determinó gravimétricamente a partir de los extractos metanólicos llevados a cabo por triplicado. Los extractos se usaron luego para determinar los contenidos de flavonoides y fenoles totales, así como el efecto secuestrador de radicales DPPH y el poder reductor, como se describe más abajo.

## Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

### Contenido de Flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó de acuerdo a Zhishen et al. (1999). Brevemente, cada extracto metanólico (1,5 mg/250 µl de solución metanólica) se mezcló con 1,5 ml de agua destilada y 75 µl de 50 g/l nitrito de sodio. Después de 5 min, se agregaron 150 µl de 100 g/l cloruro de aluminio hexahidrato. Luego de 6 min, se incorporaron a la mezcla 500 µl de hidróxido de sodio 1M y 275 µl de agua destilada. Después de mezclar vigorosamente, se midió la absorbancia de las soluciones resultantes contra un blanco a 510 nm usando un espectrofotómetro Shimadzu 1203 UV-Vis. El contenido de flavonoides se obtuvo a partir de una curva de calibración usando (+)- catequina como estándar, y fue expresado como mg de equivalentes de (+)- catequina/100 g peso fresco de frutos, mg de equivalentes de (+)- catequina/g peso seco de frutos, y mg de equivalentes de (+)- catequina/fruto.

### Contenido de Fenoles

El contenido de fenoles fue determinado de acuerdo al método de Folin–Ciocalteu (Taga et al., 1984), con algunas modificaciones. Brevemente, se extrajeron 100 µl de cada extracto metanólico de una solución compuesta por 20 mg de extracto seco en 5 ml de metanol/agua-ClH (1,3%) (60:40 v/v). Posteriormente se agregaron 2 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio 2% (w/v) y 100 µl del reactivo de Folin–Ciocalteu 50%. Luego de 30 min en reposo a 24 °C, se midió la absorbancia de las soluciones coloreadas resultantes contra un blanco a 750 nm usando un espectrofotómetro Shimadzu 1203 UV-Vis. El contenido de fenoles se determinó a partir de una curva de calibración preparada usando ácido gálico como estándar, y fue expresado en mg de equivalentes de ácido gálico/100 g peso fresco de frutos, en mg de equivalentes de ácido gálico/g peso seco de frutos y mg de equivalentes de ácido gálico/fruto.

### Perfil de compuestos fenólicos por HPLC

Los compuestos fenólicos se extrajeron a partir de muestras ( $n = 3$ ) de 5 g de peso fresco del tejido congelado -20 °C y pulverizado utilizando una proporción tejido/metanol/hexano (0,2 g: 2 ml: 0.5 ml), durante una noche a 25 °C y 200 rpm. Luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. La fracción alcohólica se llevó a sequedad en *rotavapor*. Por último se resuspendió la muestra en 200 µl de metanol (método modificado de Torres et al., 2005) y luego se procedió al análisis de las mismas por HPLC, en un equipo Agilent 1100 System. Se utilizó una columna Eclipse XDB – C18, con un flujo de 1 ml/min volumen de inyección 5µl. La detección se realizó con MWD Agilent 1100 N° G1365 a distintas longitudes de onda (270, 280, 254 y 220

### **Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

nm). Los solventes de corrida utilizados fueron a) agua: ácido acético (99.90:0.10) y b) acetonitrilo: ácido acético (99.90: 0.10). La rampa fue diseñada partiendo de 15 % B hasta 36.5 % B a los 30 min. Los patrones utilizados para la identificación y calibración (Sigma) fueron por orden de tiempo de retención creciente los siguientes: ácido gálico, ácido clorogénico, catequina hidrato, rutina, ácido telúrico, quercetina, naringenina y kaempferol.

#### **Efecto secuestrador de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo**

Cada extracto metanólico (0,0–1,0 mg/ml) en metanol (2 ml) se mezcló con 0,25 ml de una solución metanólica conteniendo radicales 1,1- difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), resultando en una concentración final de 0,1 mM DPPH. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó en reposo durante 30 minutos en oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 517 nm contra un blanco usando un espectrofotómetro Shimadzu 1203 UV-Vis (Método de Shimada et al. 1992 modificado). Una baja absorbancia de la mezcla de reacción indica una elevada actividad de secuestro de radicales libres. El ácido ascórbico, el hidroxianisol butilado (BHA), y el  $\alpha$ - tocoferol fueron usados como antioxidantes estándar. La capacidad de los extractos metanólicos de secuestrar radicales DPPH se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto secuestrador DPPH (\%)} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}} / A_{\text{blanco}}) \times 100]$$

donde  $A_{\text{blanco}}$  es la absorbancia de la solución resultante de la reacción control (conteniendo todos los reactivos excepto el compuesto a ensayar) y  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la mezcla de reacción para el efecto secuestrador del compuesto. Para evitar la interferencia de las antocianinas,  $A_{\text{muestra}}$  se calculó restando la absorbancia obtenida con los extractos de los frutos en ausencia de DPPH. Los valores de efecto secuestrador de DPPH se calcularon para todos los extractos metanólicos y concentraciones de antioxidantes estándar bajo estudio. El valor  $CE_{50}$  (mg/ml) es la concentración efectiva del extracto metanólico a la cual la actividad antioxidante fue del 50% de la actividad máxima, obtenida por interpolación de un análisis de regresión lineal entre la concentración de la muestra (0 a 0,5 mg/ml) y el efecto secuestrador de DPPH.

#### **Poder Reductor**

El poder reductor se determinó siguiendo la metodología de Oyaizu (1986). Cada extracto metanólico (0,0–5,0 mg/ml) en metanol (2,5 ml) se mezcló con 2,5 ml de buffer fosfato de sodio 200 mM (pH 6,6) y 2,5 ml de ferricianuro de potasio 1%, y se incubó a 50 °C durante 20 min en oscuridad. Luego, se agregaron 2,5 ml de ácido tricloroacético al 10% (w/v) y la mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. La capa

### **Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

superior (5 ml) se mezcló con 5 ml de agua deionizada y 0,5 ml de cloruro férrico hexahidrato 0,1%, y luego se midió la absorbancia a 700 nm contra un blanco usando un espectrofotómetro Shimadzu 1203 UV-Vis. Una elevada absorbancia indica un mayor poder reductor. El ácido ascórbico, el hidroxianisol butilado (BHA), y el  $\alpha$ -tocoferol fueron usados como antioxidantes estándar. El poder reductor se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Poder reductor (\%)} = [100 - (A_{\text{máxima}} - A_{\text{muestra}} / A_{\text{máxima}}) \times 100]$$

donde  $A_{\text{máxima}}$  es el máximo valor de absorbancia obtenido con la solución coloreada desarrollado por la reacción de la sal de ferricianuro con el compuesto que se está ensayando, y  $A_{\text{muestra}}$  es el valor de absorbancia obtenido con la solución coloreada desarrollado por la reacción de la sal de ferricianuro con el compuesto que se está ensayando para cada concentración. Los valores de poder reductor (%) se calcularon para todas las concentraciones de extractos metanólicos y antioxidantes estándar bajo estudio. El valor  $CE_{50}$  (mg/ml) es la concentración efectiva del extracto metanólico a la cual el poder reductor fue del 50% del máximo poder reductor, obtenida por interpolación de un análisis de regresión lineal entre la concentración de la muestra (0 a 1 mg/ml) y el poder reductor.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron por ANOVA de una vía y las medias luego fueron separadas usando el Test de Rangos múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ . Los coeficientes de correlación lineal y análisis de regresión fueron hechos entre algunos pares de variables.

## **RESULTADOS**

### **Evolución del color de los frutos y del contenido de antocianinas**

El porcentaje de la superficie de los frutos con color púrpura cambió de manera significativa durante el período estudiado ( $p < 0,001$ ), aumentando a partir de los 70 *DPF* (20%) y alcanzando los valores más altos a los 112 (98,7%) y 126 (100%) *DPF*. El contenido de antocianinas se incrementó significativamente durante el período estudiado, en términos de peso fresco de frutos ( $p < 0,001$ ), peso seco de frutos ( $p < 0,001$ ) y por fruto ( $p < 0,001$ ) (**Fig. I.2.1A-C, Fig. I.2.2**), alcanzando un máximo en el día 126 *DPF* en términos de peso fresco y seco de frutos (752,7 mg/100 g de peso fresco de frutos y 16,9 mg/g de peso seco de frutos, respectivamente), y de manera similar por fruto (1,6 mg/fruto).

### **Rendimiento de los extractos metanólicos de los frutos**

El rendimiento en peso seco de los extractos metanólicos de los frutos aumentó significativamente durante el período de fructificación estudiado ( $p < 0,001$ ). Los valores mínimos se obtuvieron a los 70 y 84 *DPF* (379,1 y 365,7 mg extracto seco/g peso fresco de frutos, respectivamente), luego se incrementó a los 98 *DPF* a 421,9 mg extracto seco/g peso seco de frutos y alcanzó el mayor contenido desde los 112 a 126 *DPF* (453,3 y 443,2 mg extracto seco/g peso seco de frutos, respectivamente). El rendimiento de los extractos metanólicos se correlacionó positiva y significativamente con el contenido de antocianinas ( $r = 0,779$ ;  $p = 0,007$ ).

### **Contenido de flavonoides**

El contenido de flavonoides disminuyó significativamente durante el período de fructificación, en términos de peso fresco de frutos ( $p < 0,001$ ), peso seco de frutos ( $p < 0,001$ ), y por fruto ( $p < 0,001$ ) (**Fig. I.2.1A-C, Fig. I.2.3**). El mayor contenido se obtuvo en el día 70 *DPF* (604,0 mg equivalentes de (+)- catequina/100 g de peso fresco de frutos, 27,1 mg equivalentes de (+)- catequina/g peso seco de frutos y 1,7 mg/fruto), mientras que el contenido más bajo se obtuvo en el día 126 *DPF* (152,3 mg equivalentes de (+)- catequina/100 g de peso fresco de frutos, 3,4 mg equivalentes de (+)- catequina/g peso seco de frutos y 0,3 mg equivalentes de (+)- catequina /fruto).

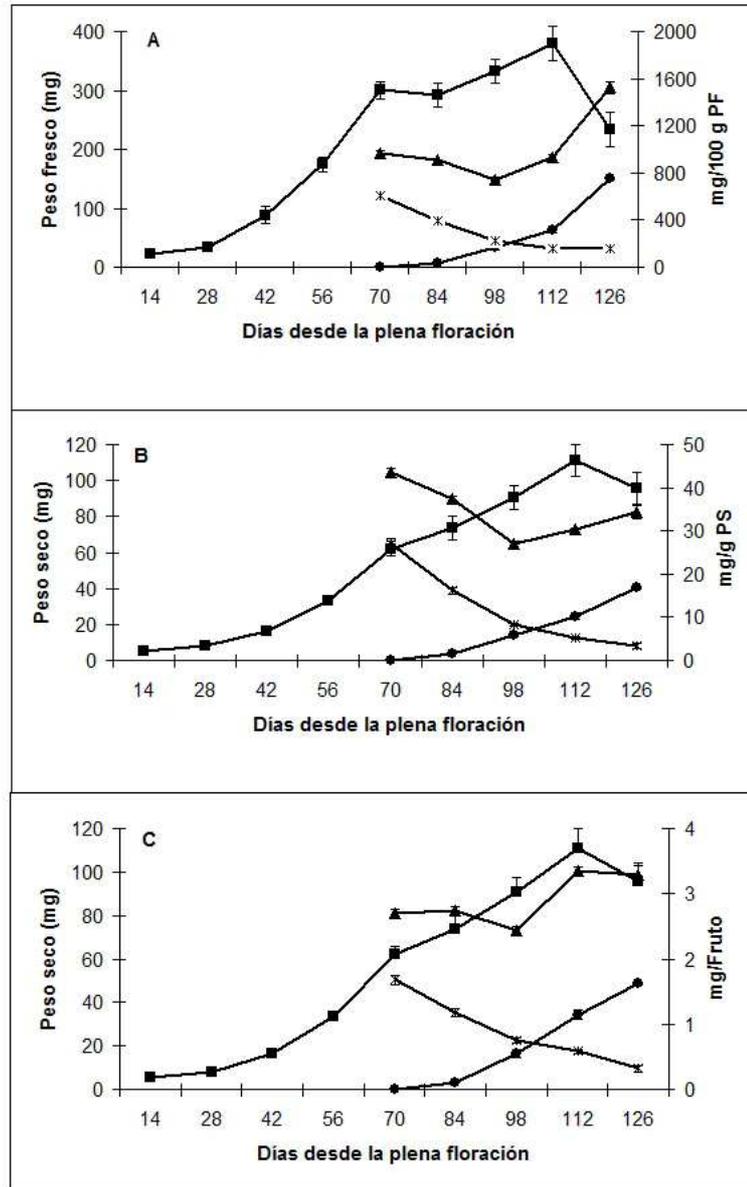
### **Contenido de fenoles**

El contenido de fenoles varió significativamente durante el período de fructificación, en términos de peso fresco de frutos ( $p < 0,001$ ), peso seco de frutos ( $p < 0,001$ ) y por fruto ( $p < 0,001$ ) (**Fig. I.2.1A-C, Fig. I.2.4**). Los picos máximos para el contenido de fenoles fueron diferentes cuando se expresa en peso fresco de frutos,

### **Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

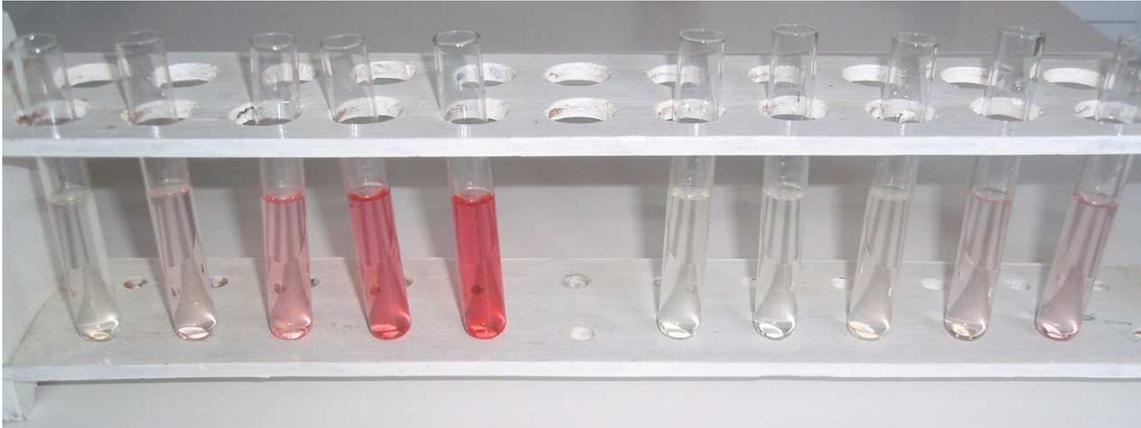
peso seco de frutos o por fruto. Al considerar el contenido de fenoles sobre la base peso fresco de frutos, esta variable disminuyó desde los 70 *DPF* a un mínimo en el día 98 *DPF* y luego aumentó a un máximo en el día 126 *DPF* (1.522,9 mg de equivalentes de ácido gálico/100 g peso fresco de frutos). Sin embargo, al examinar el contenido de fenoles sobre la base de peso seco de frutos, el máximo valor (43,5 mg equivalentes de ácido gálico/g peso seco de frutos) se registró a los 70 *DPF*, luego disminuyó a un mínimo en el día 98 *DPF* y luego aumentó en el día 126 *DPF*. Los valores máximos de fenoles por fruto se obtuvieron a los 112 y 126 *DPF* (3,4 y 3,3 equivalentes de ácido gálico mg/fruto, respectivamente).

### Compuestos fenólicos y actividad antioxidante



**Figura I.2.1.** Evolución de los contenidos de diferentes compuestos fenólicos durante la fructificación de *B. microphylla* **A)** expresado sobre la base de peso fresco (mg/100 g de peso fresco de frutos), **B)** expresado sobre la base de peso seco (mg/g peso seco de frutos) y **C)** expresado por unidad de fruto (mg/fruto). Contenido de antocianinas (◆); contenido de fenoles (▲); contenido de flavonoides (\*); (PFF) peso fresco de los frutos en A) y (PSF) peso seco de los frutos en B) y C) (■). Las barras de error representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

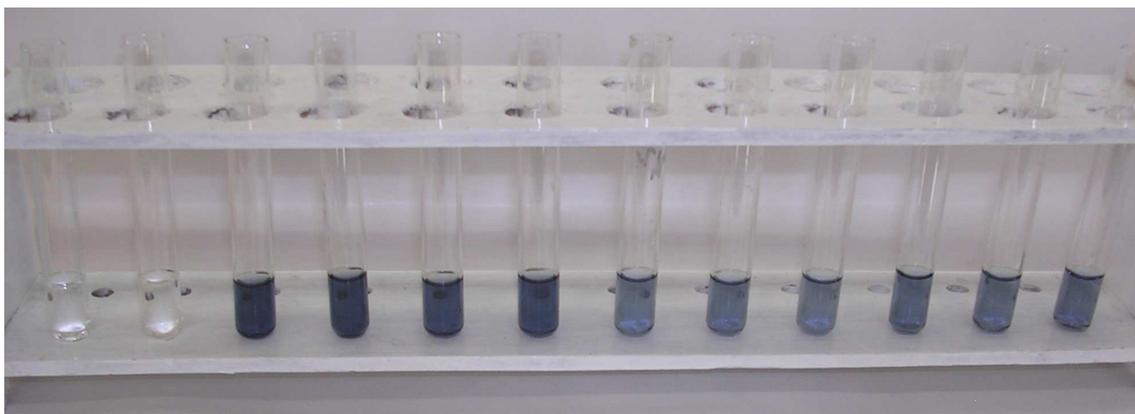
### Compuestos fenólicos y actividad antioxidante



**Figura I.2.2.** Cuantificación de las antocianinas en buffer pH 1 (izquierda) y pH 4,5 (derecha) a los 70, 84, 98, 112 y 126 *DPF* (de izquierda a derecha, respectivamente y para cada buffer), en los frutos de *B. microphylla*. Se observa un aumento en la intensidad del color púrpura entre los 70, 84, 98, 112 y 126 *DPF* en buffer pH 1 (izquierda) que está de acuerdo con el incremento del contenido de las antocianinas.



**Figura I.2.3.** Cuantificación de los flavonoides en el testigo (izquierda y sin coloración), y en los frutos de *B. microphylla* a los 70, 84, 98, 112 y 126 *DPF* (de izquierda a derecha, respectivamente). Se observa una disminución en la intensidad del color rojizo entre los 70, 84, 98, 112 y 126 *DPF* que está de acuerdo con la disminución del contenido de los flavonoides.



**Figura I.2.4.** Cuantificación de los fenoles en el testigo y en los frutos de *B. microphylla* a los 70, 84, 98, 112 y 126 *DPF* (2 tubos para cada *DPF* de izquierda a derecha, respectivamente). Se observa una variación en la intensidad del color azul entre los 70, 84, 98, 112 y 126 *DPF* que está de acuerdo con la variación del contenido de los fenoles.

#### Perfil de compuestos fenólicos

La catequina y los flavonoides totales disminuyeron significativamente desde los 70 *DPF* y hasta el final de la maduración de los frutos en términos de peso fresco de frutos (**Tabla I.2.1**), mientras que al considerar las variaciones en términos de peso seco de frutos, además de catequina y los flavonoides totales también variaron de manera significativa los contenidos de rutina y naringenina (**Tabla I.2.2**). El contenido de catequina fue máximo a los 70 *DPF* (244,9 mg/100 g peso fresco de frutos y 10,1 mg/g peso seco de frutos), para luego disminuir hacia el final del período de fructificación, tendencia que se mostró también en el contenido de los flavonoides totales (268,6 mg/100 g peso fresco de frutos y 11,7 mg/g peso seco de frutos). El contenido de rutina fue máximo a los 70 *DPF* (1,0 mg/g peso seco de frutos), mientras que el de naringenina lo fue a los 84 *DPF* (0,04 mg/g peso peso fresco de frutos de frutos) para luego disminuir hacia el final de la fructificación.

El contenido de los fenoles totales disminuyó significativamente desde los 70 *DPF* y hasta el final de la maduración de los frutos en términos de peso fresco de frutos (**Tabla I.2.3**), siendo máximo a los 70 *DPF* (459,2 mg/100 g peso fresco de frutos), mientras que al considerar las variaciones en términos de peso seco de frutos, además de los fenoles totales, también disminuyeron significativamente los contenidos de ácido clorogénico y ácidos fenólicos (**Tabla I.2.4**), con los valores máximos de 7,1, 8,6 y 19,7 mg/g peso seco de frutos para ácido clorogénico, ácidos fenólicos y fenoles totales, respectivamente. A continuación puede observarse un cromatograma de los

**Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

patrones utilizados (0,1 mg/ml) para la determinación del perfil de compuestos fenólicos a los 84 días desde la plena floración (**Fig. I.2.5**).

**Tabla I.2.1.** Evolución del contenido de compuestos fenólicos de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando los días desde la plena floración (*DPF*) como factor principal, y el contenido de catequina (CA), rutina (RU), quercitina (QU), naringenina (NA) y los flavonoides totales (FLT, suma de CA, RU, QU y NA) (mg/100 g peso fresco de frutos) como variables dependientes.

<b>Efecto principal</b>	<b>CA</b>	<b>RU</b>	<b>QU</b>	<b>NA</b>	<b>FLT</b>
<i>DPF</i>					
70	244,90a	22,05	1,65	0,000	268,62a
84	47,33b	21,15	2,65	0,000	72,15b
98	97,44b	14,02	4,55	0,010	116,35b
112	89,81b	15,65	1,35	0,007	106,84b
126	54,89b	13,08	2,95	0,009	71,75b
<i>p</i>	0,011	0,452	0,119	0,664	0,<001

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

**Tabla I.2.2.** Evolución del contenido de compuestos fenólicos de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando los días desde la plena floración (*DPF*) como factor principal, y el contenido de catequina (CA), rutina (RU), quercitina (QU), naringenina (NA) y los flavonoides totales (FLT, suma de CA, RU, QU y NA) (mg/g peso seco de frutos) como variables dependientes.

<b>Efecto principal</b>	<b>CA</b>	<b>RU</b>	<b>QU</b>	<b>NA</b>	<b>FLT</b>
<i>DPF</i>					
70	10,09a	0,99a	0,07	0,00b	11,66a
84	1,95b	0,87ab	0,11	0,04a	2,97b
98	3,51b	0,50ab	0,16	0,01ab	4,19b
112	2,91b	0,50ab	0,04	0,00b	3,46b
126	1,23b	0,29b	0,07	0,02ab	1,61b
<i>p</i>	0,004	0,024	0,121	0,035	0,002

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

**Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

**Tabla I.2.3.** Evolución del contenido de compuestos fenólicos de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) como factor principal, y el contenido de ácido clorogénico (ACL), felúrico (AFE), y gálico (AGA), los ácidos fenólicos (AFEN, suma de ACL, AFE y AGA) y los fenoles totales (FET, suma de FLT y AFEN) (mg/100 g peso fresco de frutos) como variables dependientes.

<b>Efecto principal</b>	<b>ACL</b>	<b>AFE</b>	<b>AGA</b>	<b>AFEN</b>	<b>FET</b>
<i>DPF</i>					
70	159,06	1,42	30,19	190,65	459,25a
84	127,59	2,02	19,85	149,51	221,61b
98	116,42	1,26	8,49	126,11	242,46b
112	135,94	1,85	32,52	170,31	277,11b
126	107,65	0,91	39,76	148,54	220,24b
<i>p</i>	0,274	0,725)	0,127	0,241	0,008

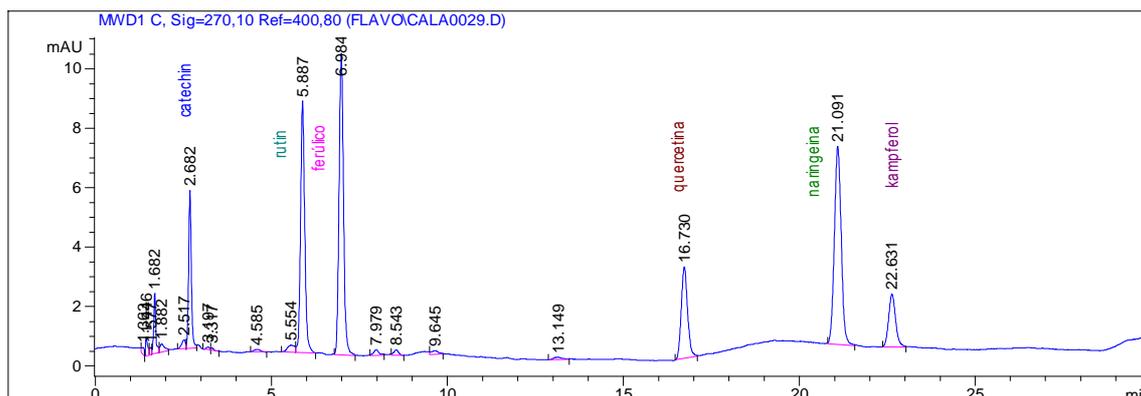
$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

**Tabla I.2.4.** Evolución del contenido de compuestos fenólicos de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando los días desde la plena floración (DPF) como factor principal, y el contenido de ácido clorogénico (ACL), felúrico (AFE), y gálico (AGA), los ácidos fenólicos (AFEN, suma de ACL, AFE y AGA) y los fenoles totales (FET, suma de FLT y AFEN) (mg/g peso seco de frutos) como variables dependientes.

<b>Efecto principal</b>	<b>ACL</b>	<b>AFE</b>	<b>AGA</b>	<b>AFEN</b>	<b>FET</b>
<i>DPF</i>					
70	7,14a	0,06	1,35	8,56a	19,72a
84	5,26ab	0,08	0,82	6,16ab	9,13b
98	4,19ab	0,04	0,30	4,54ab	8,73b
112	4,40ab	0,06	4,05	5,52ab	8,92b
126	2,42b	0,02	0,84	3,34b	4,95b
<i>p</i>	0,026	0,557	0,246	0,028	0,002

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

## Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

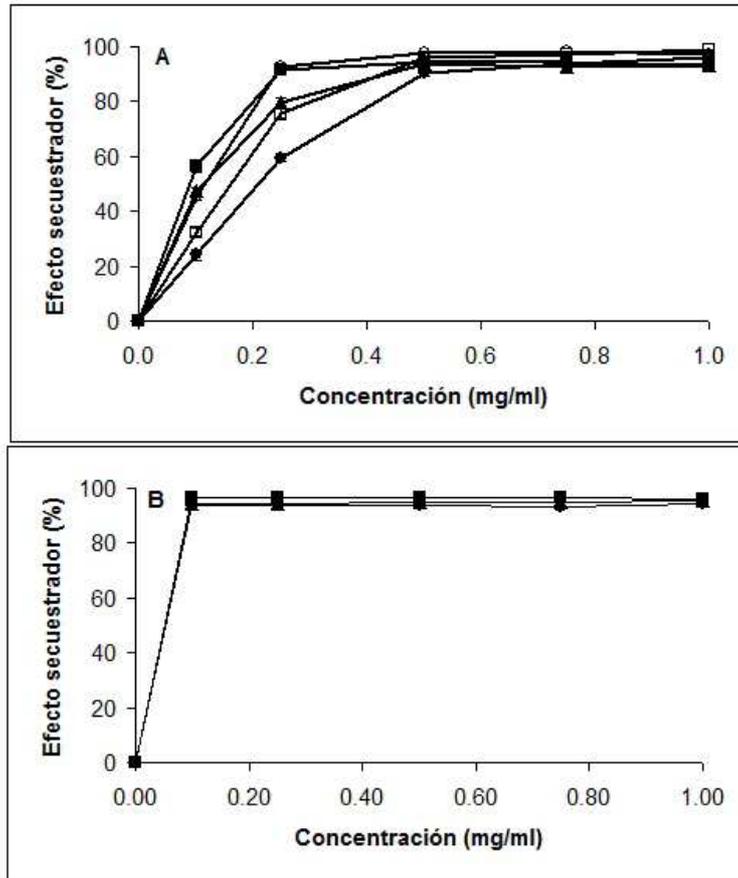


**Figura I.2.5.** Cromatograma de los patrones utilizados (0,1 mg/ml) para la determinación del perfil de compuestos fenólicos en los frutos de *B. microphylla* a los 84 días desde la plena floración.

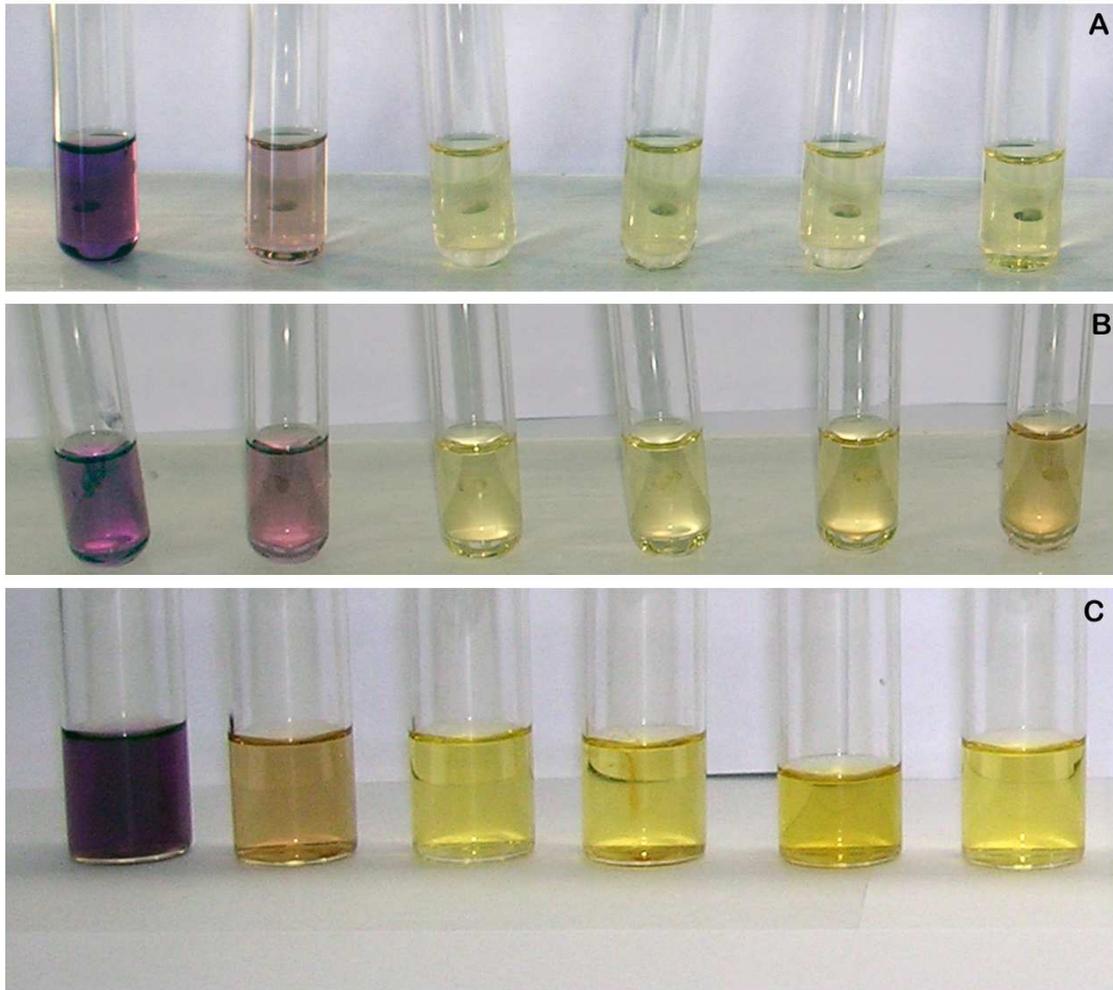
### Efecto secuestrador sobre los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo

El efecto secuestrador de los radicales DPPH varió durante el período de fructificación y con la concentración del extracto metanólico (**Fig. I.2.6A, Fig. I.2.7**). El efecto secuestrador de los radicales DPPH a los 70 y 126 *DPF* fue eficaz en una concentración menor (0,25 mg/ml) que a los 84, 98 y 112 *DPF* (0,50 mg/ml), lo que podría explicarse por el patrón similar de acumulación de contenido de fenoles y sus correlaciones significativas y positivas (**Tabla I.2.6**). El efecto secuestrador de los radicales DPPH de los antioxidantes estándar usados como referencia fue más efectivo en esta propiedad, mostrando la misma actividad a concentraciones más bajas (0,10 mg/ml) en comparación con la demostrada por los extractos metanólicos de los frutos (0,25 y 0,50 mg/ml) (**Fig. I.2.6B**). La  $CE_{50}$  varió significativamente entre los extractos metanólicos de diferentes días *DPF* (**Tabla I.2.5**). Los valores más bajos se encontraron a los 70 y 126 *DPF* (0,13 y 0,15 mg/ml, respectivamente), mientras que el valor más alto (0,23 mg/ml) se obtuvo a los 98 *DPF*.

### Compuestos fenólicos y actividad antioxidante



**Figura I.2.6A.** Efecto secuestrador de los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (%) en los extractos metanólicos de los frutos de *B. microphylla* a los 70 (■), 84 (▲), 98 (◆), 112 (◻) y 126 (◊) días *DPF* y en diferentes concentraciones de extracto metanólico (0,0 a 1,0 mg/ml). **B.** Efecto secuestrador de los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (%) en los extractos de los antioxidantes ácido ascórbico (■), BHA (▲) y  $\alpha$ -tocoferol (◆) y a diferentes concentraciones (0,0 a 1,0 mg/ml). Las barras de error representan  $\pm 1$  error estándar del promedio.



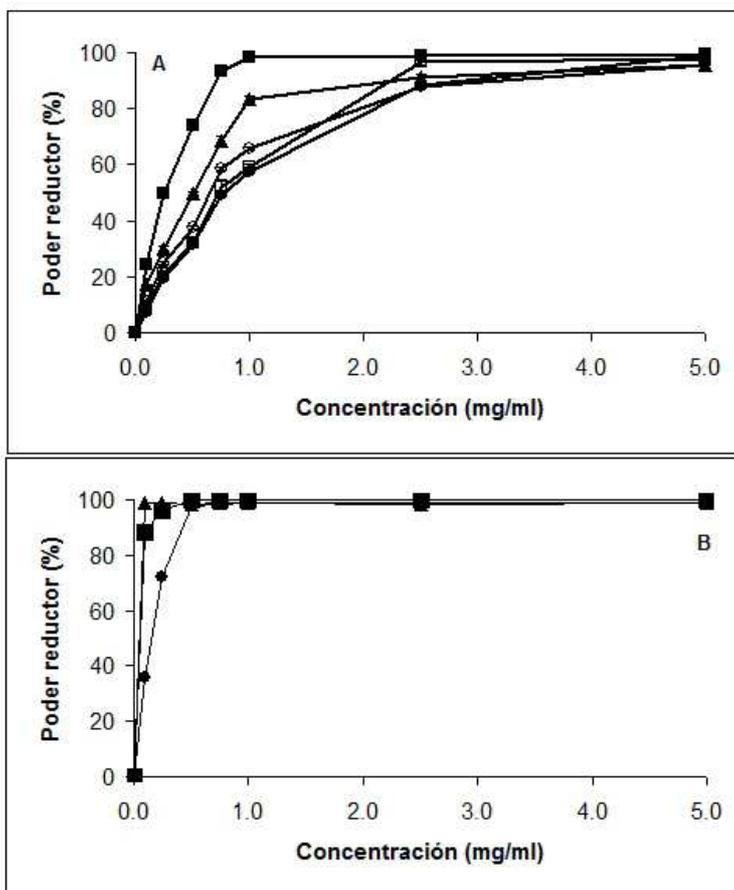
**Figura I.2.7.** Efecto secuestrador de DPPH en los frutos de *B. microphylla* a los 70 (A), 98 (B) y 126 DPF (C) y para concentraciones de extracto vegetal de 0,00; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 mg/ml (de izquierda a derecha). La presencia del color púrpura en el testigo, de un color amarillo intenso con 0,10 mg/ml de extracto de frutos y de color amarillo pálido frente a contenidos crecientes de extracto de frutos se explica por el hecho que este método se basa en la reducción de la absorbancia del radical DPPH por antioxidantes.

### Poder reductor

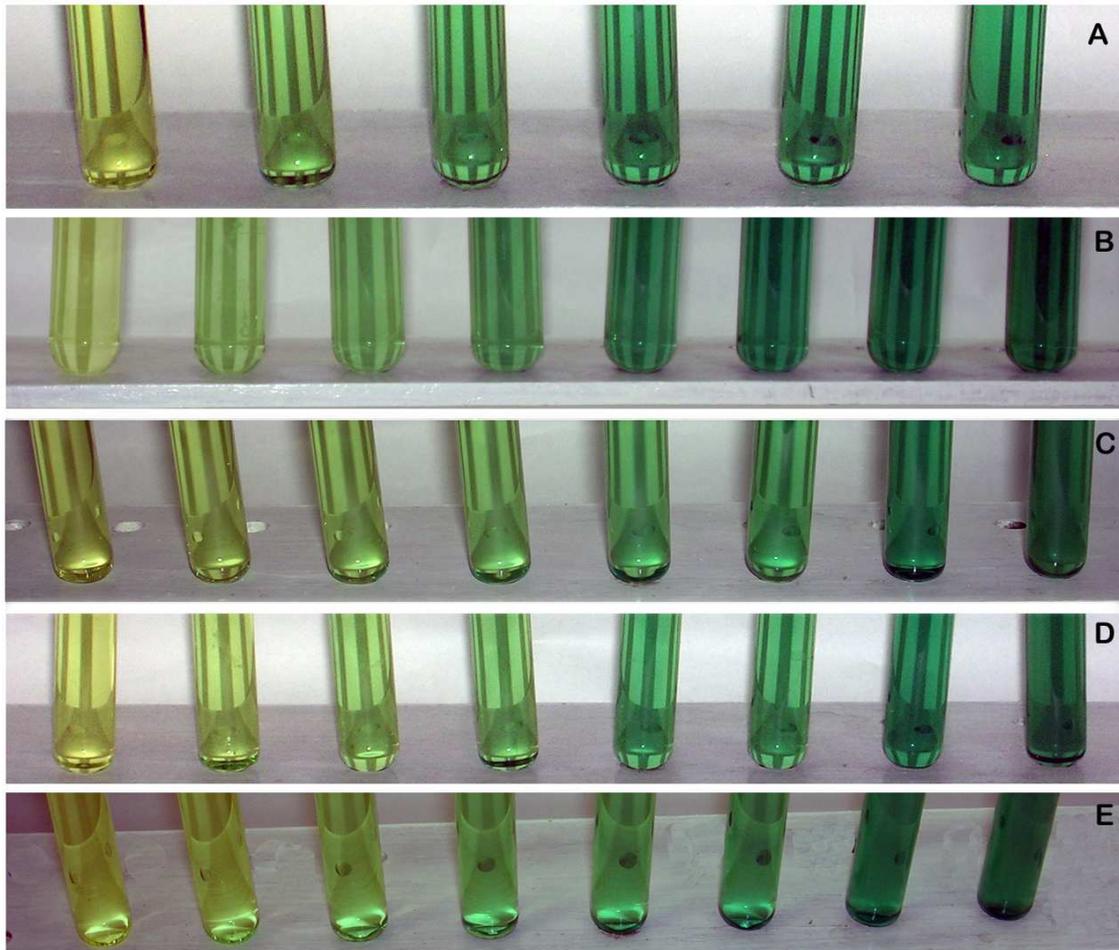
El poder reductor  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  varió durante el período de fructificación y con la concentración del extracto metanólico (**Fig. I.2.8A**; **Fig. I.2.9**). El poder reductor a los 70 DPF fue eficaz a una concentración menor (0,75 mg/ml) que a los 84, 98, 112 y 126 DPF (2,50 a 5,00 mg/ml), lo que podría explicarse por el patrón similar de evolución en el contenido de flavonoides (**Tabla I.2.6**). Además, el poder reductor de los antioxidantes estándar fue efectivo a concentraciones más bajas (0,10 a 0,75 mg/ml) que el poder reductor de los extractos metanólicos de los frutos (0,75 a 5,00 mg/ml)

### Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

(Fig. I.2.8B). La  $CE_{50}$  para el poder reductor fue significativamente diferente entre los extractos metanólicos obtenidos en diferentes días después de la fase de plena floración (Tabla I.2.5). Los valores más bajos se encontraron a los 70 *DPF* (0,36 mg/ml), mientras que los valores más altos (0,8 mg/ml) se dieron a los 98 y 112 *DPF*.



**Figura I.2.8A.** Poder reductor (%) en los extractos metanólicos de los frutos de *B. microphylla* a los 70 (■), 84 (▲), 98 (◆), 112 (◻) y 126 (◊) días *DPF* y en diferentes concentraciones de extracto metanólico (0,0 a 5,0 mg/ml). **B.** Poder reductor (%) en los extractos de los antioxidantes ácido ascórbico (■), BHA (▲) y  $\alpha$ -tocoferol (◆) y a diferentes concentraciones (0,0 a 5,0 mg/ml). Las barras de error representan  $\pm 1$  error estándar del promedio.



**Figura I.2.9.** Poder reductor en los frutos de *B. microphylla* a los 70 (A), 84 (B), 98 (C), 112 (D) y 126 DPF (E) y para concentraciones de extracto vegetal de 0,00; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 2,50 y 5,00 mg/ml (de izquierda a derecha) en B, C, D y E. La presencia del color amarillo pálido en el testigo, que va virando a un color verde pálido con 0,10 mg/ml de extracto de frutos para luego convertirse en verde intenso frente a contenidos crecientes de extracto de frutos se explica por el hecho que este método se basa en que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso. Este método no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones.

### Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

**Tabla I.2.5.** Concentración efectiva de los extractos metanólicos (CE<sub>50</sub>) (mg/ml) a los cuales los radicales DPPH fueron secuestrados en un 50% del máximo ES y el poder fue del 50% del máximo poder reductor en frutos de *B. microphylla* entre los 70 y 126 días desde plena floración (DPF).

Efecto principal	CE <sub>50</sub> ES	CE <sub>50</sub> PR
<i>DPF</i>		
70	0,13b	0,36c
84	0,16b	0,51bc
98	0,23a	0,80a
112	0,20a	0,77a
126	0,15b	0,65ab
<i>p</i>	<0,001	<0,001

Valor CE<sub>50</sub>: El valor CE<sub>50</sub> fue obtenido por la interpolación desde el análisis de regresión lineal entre la concentración de las muestras (mg/ml) y ES y PR.  $p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .



## **DISCUSIÓN**

En los frutos de *B. microphylla*, la biosíntesis de antocianinas se inició después de la fase de crecimiento lento del fruto (84 *DPF*), para luego aumentar notablemente durante el período de maduración cuando la biomasa de los frutos alcanzó su valor máximo, y siguió aumentando hasta el final del período de fructificación, incluso cuando la biomasa de los frutos disminuía. Las condiciones precisas que inician la síntesis de antocianinas no están bien establecidas, pero se ha argumentado razonablemente que la acumulación de azúcar proporciona el sustrato necesario para la síntesis de estos compuestos (Jackson, 2008). La baja producción de antocianinas durante las primeras etapas del crecimiento del fruto se puede explicar porque la asignación de carbono se utiliza principalmente para mantener el aumento de la biomasa del metabolismo primario, cuando el crecimiento es muy activo. Por otro lado, cuando el crecimiento termina, el carbono ya no se necesita en grandes cantidades para el metabolismo primario y entonces pueden comenzar a sintetizarse los metabolitos secundarios (Bourgaud et al., 2001), hecho que podría explicar la correlación positiva y significativa encontrada entre las antocianinas y el color, los sólidos solubles y la relación entre los sólidos solubles y la acidez total titulable en los frutos de *B. microphylla* (**Tabla I.2.6**). El contenido de antocianinas encontrado en los frutos de *B. microphylla* en la madurez (753 mg/100 g de peso fresco de frutos) fue comparable al reportado por Ruiz et al. (2010) en *B. microphylla* del sur de Chile. Sin embargo, el contenido de antocianinas encontrado en este trabajo (10 a 18 mg/g peso seco) fue mayor que el observado en los frutos de *B. buxifolia* en la madurez crecidos en Chile (Arribillaga García, 2001; Mariangel et al., 2013; Reyes-Farias et al., 2014) y mayor que la de otras bayas color púrpura, como *Ribes nigrum* (350 mg/100 g peso fresco de frutos), *Rubus* spp. (55-60 mg/100 g peso fresco de frutos), *Fragaria* spp. (40 mg/100 g peso fresco de frutos) (Lister et al., 2002), y *Vaccinium* spp. (1,2 mg/g *PPF*) (Zheng y Wang, 2003). Las antocianinas son los principales componentes fenólicos de las frutas finas, y su actividad antioxidante está estrechamente relacionada con el contenido de fenoles totales (Deighton et al., 2002).

La síntesis de flavonoides, i.e. aquellos compuestos que se detectan a 510 nm, como la quercetina cuando se forman complejos con el aluminio, tiende a disminuir y cesar durante la maduración, como se encontró para las uvas, y con compuestos fenólicos no flavonoides (Jackson, 2008). Este patrón de acumulación del contenido de flavonoides y posterior descenso durante la maduración sugiere su degradación y la utilización para la biosíntesis de otros compuestos y/o su asociación con otros compuestos celulares por enlaces covalentes estables. El comportamiento descrito podría explicar el hecho que en los frutos de *B. microphylla*, el contenido de

### **Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

flavonoides fue positiva y significativamente correlacionado con la acidez total titulable, mientras que fue negativa y significativamente correlacionado con el color, los sólidos solubles, la relación sólidos solubles y acidez total titulable y las antocianinas. En el estudio de Cheel et al. (2007), el contenido de flavonoides varió entre 30,0 y 123,2 mg de equivalentes de quercetina/100 g peso fresco de frutos de *Fragaria* sp. Los flavonoides determinados por HPLC, en particular la catequina y rutina, siguieron los mismos patrones de acumulación que los flavonoides cuantificados por el método espectrofotométrico.

En algunas bayas la síntesis de compuestos fenólicos comienza poco después del inicio del desarrollo del fruto, como en la uva (Jackson, 2008), donde algunas antocianinas pueden ser sintetizadas previamente, pero en la mayoría la producción involucra a otros compuestos fenólicos flavonoides o no flavonoides. El contenido de fenoles en *B. microphylla* disminuyó significativamente desde la fase de crecimiento lento hasta los 98 *DPF*, alcanzando un mínimo justo cuando los sólidos solubles comienzan a acumularse, para iniciar luego otro aumento más pronunciado hasta llegar a un máximo al final del período de maduración. El descenso inicial podría deberse, en parte, a la disminución en el contenido de tanino que se encuentra en la uva (Conde et al., 2007); Estos fenoles particulares juegan un papel importante en la defensa contra los depredadores (Raffo et al., 2004). En el momento en que los frutos comenzaron a madurar a los 98 *DPF* y el contenido de fenoles alcanzó su valor mínimo, el contenido de antocianinas todavía no mostraba un alto nivel mientras que el contenido de flavonoides comenzaba a mostrar una marcada disminución. El contenido de fenoles considerado sobre una base de peso fresco demostró un comportamiento similar al de los sólidos solubles, la relación entre los sólidos solubles y la acidez total titulable y las antocianinas (**Tabla I.2.6**); el contenido de fenoles considerado sobre una base de peso seco, experimentó un comportamiento similar a la firmeza y al contenido de flavonoides, como es mostrado por las correlaciones significativas y positivas encontradas entre ellos (**Tabla I.2.6**), mientras que además se encontró una correlación negativa y significativa con el peso seco y el color de los frutos. Las diferencias observadas en la presentación de los picos máximos fenólicos al principio y al final del período de maduración pueden deberse al diferente contenido de materia seca: el peso seco del fruto como porcentaje de peso fresco se duplicó a los 126 *DPF* (39,8%) con respecto al día 70 *DPF* (20,6%). Además, el metabolismo de los compuestos fenólicos varía según el estado fisiológico de los frutos, y desde un punto de vista bioquímico, sus tasas de producción se basan en la participación de muchas enzimas claves, aunque también hay una limitación impuesta por la disponibilidad de los precursores. Por lo tanto, se espera que cada clase de

### Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

compuestos fenólicos muestre un patrón diferente de acumulación durante e la maduración, apareciendo sus picos máximos en diferentes tiempos (Raffo et al., 2004), explicando así también las diferencias encontradas en el rendimiento de los extractos metanólicos durante la maduración. En general, el contenido de compuestos fenólicos es mayor en los frutos inmaduros con respecto a los frutos maduros, con excepción de las antocianinas (Kähkönen et al., 2001). La evolución del contenido de fenoles en otros frutales puede mostrar una caída durante el crecimiento, e incluso puede continuar disminuyendo de manera constante, como ocurre en algunas especies con frutos poco coloreados (variedades de uva blanca, mango y plátano), o puede aumentar con la maduración, como ocurre en los frutos rojos (manzanas), con acumulación de antocianinas o flavonoides (Häkkinen et al., 2000). Los fenoles disminuyen en moras y frutillas a medida que la fruta madura (Wang y Lin, 2000). Los contenidos fenólicos en frutos maduros de *B. microphylla* presentados en esta tesis (27 a 34 mg/g peso seco de frutos) fueron superiores a los frutos de esta especie provenientes de plantas crecidas en Chile (13,44 mg/g peso seco) (Reyes-Farias et al., 2014) y comparables a los citados por Mariangel et al. (2013). A su vez, los contenidos fenólicos en frutos maduros de *B. microphylla* obtenidos en esta tesis fueron comparables con los encontrados para *Vaccinium myrtillus* (33 a 38 mg/g peso seco de frutos) (Kähkönen et al., 2001) y *Ribes nigrum* (1000 mg/100 g peso fresco de frutos) (Deighton et al., 2002), y superiores a los de otras bayas de color púrpura-rojizo, como *Ribes rubrum* (14 mg/g peso seco de frutos), *Fragaria ananassa* (16 a 24 mg/g peso seco de frutos) (Kähkönen et al., 2001), *Rubus idaeus* (300 mg/100 g peso fresco de frutos) (Lister et al., 2002), y a especies de *Fragaria* nativas de América del Sur (106 a 268 mg/100 g peso fresco de frutos) (Cheel et al., 2007). Los ácidos clorogénico, gálico, ferúlico y la quercitina y rutina también fueron detectados en frutos de *B. microphylla* de plantas crecidas en Chile (Mariangel et al., 2013; Ramirez et al., 2015).

Los ácidos fenólicos determinados por HPLC y en particular el ácido gálico siguieron los mismos patrones de acumulación que para los fenoles cuantificados por el método espectrofotométrico.

El efecto secuestrador del DPPH se correlacionó positiva y significativamente con la acidez total titulable, con flavonoides ( $R^2 = 40,8$ ;  $y = 30,6893 + 0,8693 x$ ) y con los fenoles ( $R^2 = 71,1$ ;  $y = 1,6468 x - 15,6222$ ) en términos de peso fresco de frutos (**Tabla I.2.6**), como se informó para *Diospyros kaki* L. cv. Mopán (Chen et al., 2008), mientras que no se correlacionó con el contenido de antocianinas tal como fue encontrado en frutillas (Cheel et al., 2007). El efecto secuestrador del DPPH

### Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

observado en *B. microphylla* fue comparable al reportado para los frutos de *B. vulgaris* (Motalleb et al., 2005) y de la corteza de *B. koreana* (Qadir et al., 2009).

Los valores de poder reductor más bajos se encontraron a los 70 *DPF* (0,36 mg/ml), mientras que los valores más altos se obtuvieron a los 98 *DPF* (0,80 mg/ml), para disminuir luego a 0,65 mg/ml a los 126 *DPF*. El poder reductor se correlacionó positiva y significativamente con el color, la acidez total titulable, con los flavonoides ( $R^2 = 80,4$ ,  $y = 6.2790 + 0.6229 x$ ) y con los fenoles ( $R^2 = 82,8$ ;  $y = -17.5062 + 0.9074 x$ ) en términos de *PSF*, como se encontró para *B. vulgaris* y *B. croatica* (Koncic et al., 2010), mientras que se correlacionó negativa y significativamente con el contenido de antocianinas (**Tabla I.2.6**). El ensayo de TEAC mostró una correlación positiva y significativa entre fenoles y la actividad antioxidante en las frutas de *B. microphylla* (Ruiz et al., 2010). Las relaciones descritas podrían explicar los máximos valores del efecto secuestrador del DPPH y poder reductor obtenidos a los 70 *DPF*, así como los valores mínimos para el efecto secuestrador del DPPH a los 98 *DPF*, y la contribución de los flavonoides y fenoles que son responsables, al menos en parte, de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *B. microphylla*. Aunque el efecto secuestrador del DPPH en los extractos de *B. microphylla* fue más efectivo a menor concentración (0,50 mg/ml) de lo que fue para el poder reductor (0,75 a 5 mg/ml), se produjo una fuerte relación entre ambos métodos en cuanto a la actividad antioxidante, como se muestra por la correlación lineal significativa entre ambos parámetros (**Tabla I.2.6**). Además, cabe destacar que el efecto secuestrador del DPPH y el poder reductor de los extractos de los frutos de *B. microphylla* mostraron sus valores máximos a concentraciones de los extractos metanólicos de los frutos apenas mayores que las correspondientes a los antioxidantes estándar para la misma actividad de extinción de radicales de DPPH. La actividad antioxidante de los frutos y su composición fenólica implica relaciones complejas, y por lo tanto es muy difícil de describir con herramientas estadísticas (Kähkönen et al., 2001). Las actividades antioxidantes atribuidas a estas sustancias presentan diferencias dentro de los subgrupos de compuestos, por lo tanto, las propiedades antioxidantes de un compuesto dentro de un grupo pueden variar notablemente. Por ello, niveles similares de un compuesto específico no implica necesariamente una respuesta antioxidante igual. La sinergia, es decir, la capacidad de un compuesto antioxidante para mejorar al sumarse con la actividad de otro, es otra razón para esas divergencias. Las diferencias también pueden surgir de la metodología utilizada para analizar la actividad antioxidante. Por ejemplo, mientras que el método de ORAC determina correlaciones positivas con las antocianinas en los extractos de arándano (Prior et al., 1998), el método DPPH no muestra ninguna correlación con las antocianinas en frutillas (Cheel

**Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

et al., 2007; Ferreyra et al., 2007), lo que explica la relación compleja entre la actividad antioxidante de los frutos y su composición fenólica (Kähkönen et al., 2001).

## **CONCLUSIONES**

Los patrones de variación de compuestos fenólicos durante el crecimiento y maduración de los frutos de *B. microphylla* varían cuali y cuantitativamente dependiendo del grupo específico considerado, es decir, antocianinas, flavonoides o fenoles, y pudieron correlacionarse con las características de calidad de la fruta, incluyendo el peso del fruto, la firmeza y el color, los sólidos solubles, la acidez y sus relaciones, todos ellos responsables de la astringencia, textura, sabor y color. Ello reviste importancia en la definición de términos adecuados de referencia, es decir, la concentración de los metabolitos secundarios determinada sobre la base del peso de fruta fresca o seca, o sobre una base de fruta por unidad, cuando se comparan estos valores con otras especies. También es importante desde un punto de vista práctico, considerar la variación de la actividad antioxidante durante la fructificación, cuando desde esta propiedad el valor funcional de la fruta tiene que ser examinado y compararse con la existente en otros frutos. Los métodos espectrofotométricos para cuantificar el contenido de fenoles son simples, rápidos y muy precisos, aunque no son característicos de un componente específico. La información obtenida sobre los patrones de acumulación de estos metabolitos secundarios durante el crecimiento de *B. microphylla* y la maduración de los frutos permite una particular y mejor comprensión del efecto de los factores de pre cosecha como la luz y la fertilización en este período. Este conocimiento contribuirá a la selección de las prácticas más adecuadas y a la asignación de las mejores alternativas de uso como ser en la definición del comienzo de la maduración para el mercado fresco, el final de la maduración para la utilización industrial, etc.

En cuanto a la actividad antioxidante, evaluada en comparación con la de sustancias antioxidantes patrones y en comparación con la informada para otras especies de frutas pequeñas, se encuentra que los frutos de *B. microphylla* poseen una excelente actividad antioxidante, una propiedad que puede contribuir a la calificación de su valor funcional.

## PARTE II

### ESTUDIOS EN PLANTAS DE *B. microphylla* G. Forst. EN UN CULTIVO EXPERIMENTAL EN MACETAS

## **CAPITULO 1**

### **ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO EXPERIMENTAL EN MACETAS**

## **INTRODUCCIÓN**

La capacidad de adaptación de las plantas a diversas condiciones ambientales como la luz, la humedad y el nivel de nutrientes en el suelo, determinan los procesos de crecimiento y desarrollo (Lieffers et al., 1999; Heinemann et al., 2000; Lencinas et al., 2007). El factor ambiental como un efector epigenético puede manifestarse en las respuestas fenológicas (Galloway y Burgess, 2012), fisiológicas afectando el intercambio de gases y el rendimiento fotosintético, la producción y compartimentalización de la biomasa, la morfología de la hoja y la captura de agua (Sun et al., 1995; Evans y Poorter, 2001; Damesin, 2003; Reynolds y Frochot, 2003; Sardans et al., 2006; Lencinas et al., 2007; Martínez Pastur et al., 2007), así como la composición de diferentes órganos como los frutos (Abd El-Razek et al., 2011; Lobos et al., 2013). Es así que las condiciones ambientales juegan un rol significativo en la regulación del metabolismo primario y secundario de las plantas (De Bolt et al., 2008), siendo particularmente la luz uno de los factores ambientales que mayormente influyen el crecimiento y distribución fitogeográfica de las especies vegetales (Boardman, 1977, Lambers et al., 1998). En efecto, cuando se considera la fisiología ambiental de los arbustos, la radiación solar es de especial importancia debido a su rol como fuente de energía que influye la fotosíntesis de las hojas (Field y Mooney, 1983), dirigiendo la producción biológica de la materia seca (Peri y Lasagno, 2006) y consecuentemente el rendimiento de los frutos. En los ambientes naturales, las plantas suelen experimentar frecuentes fluctuaciones en irradiancia, desde sol pleno a sombra, causadas por el sombreado dentro del propio canopy (Knapp y Smith, 1987), o por la proximidad a otras plantas. En plantas de *Berberis* creciendo en poblaciones naturales de la Patagonia, se ha registrado la variación en la intensidad de luz dentro del canopy, encontrándose que a la mitad de la altura de los arbustos la incidencia de la luz fue de sólo el 30% de la intensidad plena, con una alta variación entre plantas (9,1 al 74,4%) (Peri y Lasagno, 2006). Cabe destacar que dado el hábito de crecimiento arbustivo sumado a la propagación natural por rizomas de las especies de *Berberis*, ya en los primeros años de las plantas se producen grandes cambios en la disponibilidad de luz dentro de las mismas. Diversas prácticas como la remoción de hojas, poda y el uso de mallas media sombra para modificar la radiación y la temperatura, son herramientas de manejo ampliamente usadas en diversos cultivos, y que podrían ser útiles en la mitigación de las condiciones ambientales extremas. Diversos estudios se han llevado a cabo para determinar las respuestas a varias combinaciones de niveles de sombreado y colores de mallas mediasombra en las plantas ornamentales (Schiappacasse et al., 2007; Ovadia et al., 2009; Saifuddin et al., 2010), en hortalizas (Rylski y Spigelman, 1986a, b; López et al., 2007) y en frutales

### **Cultivo experimental en macetas**

(Stampar et al., 2001; Shahak et al., 2004a; b; Cohen et al., 2005; Jakopic et al., 2007; Dufault y Ward, 2009). Sin embargo, existen escasos antecedentes sobre la aclimatación fisiológica de las plantas de *Berberis*, siendo uno de ellos un estudio previo sobre la aclimatación de las hojas de *B. buxifolia* y *B. heterophylla* frente a distintas intensidades de luz y disponibilidad de agua (Peri et al., 2011).

Asimismo es ampliamente conocido que la disponibilidad de nutrientes y el pH de los suelos son factores que influyen el crecimiento y la distribución de las especies vegetales nativas (Wade et al., 2011), resultando determinantes no solo en el crecimiento vegetativo, sino también en el rendimiento y en la calidad de los frutos en las plantas y ello también es válido en el caso de los arbustos (Jeppsson, 2000). Particularmente los frutales menores o frutas finas necesitan muchos elementos minerales para un normal crecimiento y desarrollo (Oregon State University, 2007). Los tres elementos primarios, nitrógeno, fósforo y potasio, son los macronutrientes minerales que se usan en mayores cantidades que el resto de los elementos; siendo por ello necesario suplementar los suelos en los cuales se plantan regularmente los cultivos.

En el caso de *B. microphylla*, se trata de una especie que crece en ambientes con diferente disponibilidad de agua y nutrientes como en matorrales costeros, en márgenes y claros de los bosques de *Nothofagus*, en áreas húmedas de la estepa y a lo largo de corrientes y ríos (Moore, 1983; Orsi, 1984). En este contexto, las respuestas fenológicas y morfofisiológicas de las plantas a diferentes niveles de luz, agua y nutrientes juegan un rol importante en su distribución. Particularmente en Tierra del Fuego, se ha encontrado que diversas poblaciones de *B. microphylla* crecen en ambientes con diferentes contenidos de nutrientes inorgánicos, a saber nitrógeno (rango de 0,1 a 0,6% en los primeros 10 cm de suelo) y fósforo (rango de 2,2 a 47,4 ppm en los primeros 10 cm de suelo) (datos no publicados).

El estudio del comportamiento ecofisiológico de *B. microphylla* frente a diferentes condiciones de intensidad de luz y disponibilidad de nutrientes permitirá conocer su adaptabilidad fenotípica, i.e. la tolerancia y aclimatación de las plantas frente a los cambios en las condiciones de crecimiento.

### **Objetivos**

El objetivo del presente capítulo es caracterizar el material vegetal y describir las condiciones ambientales de crecimiento y desarrollo de las plantas, i.e. frente a tres intensidades de luz y tres niveles de fertilización a lo largo de tres estaciones de crecimiento.

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal

Se emplearon plantas de *B. microphylla* que se obtuvieron mediante propagación clonal por rizomas (Arena y Martínez Pastur, 1995; Arena et al., 1998) a partir de plantas de una población natural ubicada en las cercanías de la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego (54° 48' LS, 68° 19' LO, 30 msnm).

En octubre de 2006, las plantas de 2 años de edad presentaban 1 brote crecido en la estación de crecimiento anterior con una longitud promedio de 8,5 cm y un desvío estándar  $\pm 0,88$  cm (**Fig. II.1.1**), sin presentar diferencias significativas entre las mismas ( $p = 0,315$ ). Las plantas se colocaron en macetas (1 planta por maceta) de polietileno negro (12 l), conteniendo el mismo suelo (7 kg) donde crecía la población de la cual se obtuvieron las plantas, presentando las siguientes características: textura franco arenosa; pH  $5,23 \pm DS 0,03$ ; porcentaje de materia orgánica  $13,88 \pm DS 0,78$ ; nitrógeno total  $0,32\% \pm DS 0,03$ ; fósforo disponible  $35,82 \text{ ppm} \pm DS 0,74$ ; potasio disponible  $117,00 \text{ ppm} \pm DS 10,12$  y porcentaje de humedad a capacidad de campo  $43,24 \pm DS 3,40$ .



**Figura II.1.1.** Plantas de *Berberis microphylla* al inicio del cultivo experimental en macetas.

### **Intensidad de luz**

Se proveyeron tres niveles de intensidad de irradiación lumínica mediante el empleo de una malla media sombra negra de rafia: intensidad de luz alta (100% de la radiación natural, sin empleo de malla), media (57% de la radiación natural, empleando una capa de malla) y baja (24% de la radiación natural, empleando dos capas de malla). La malla media sombra fue colocada sobre una estructura tipo túnel de 1,20 m de altura máxima. Para establecer este gradiente de irradiación lumínica, se tuvo en cuenta la variación de la intensidad de luz registrada años anteriores dentro de la parte aérea de los arbustos, desde la parte superior de la misma y hasta la mitad de su altura ( $35,4 \pm 5,5\%$  de la intensidad de luz recibida), en plantas crecidas naturalmente en las cercanías de Ushuaia, Tierra del Fuego. La intensidad de luz se midió utilizando un Luxímetro (Tenmars Lux/FC Light meter TM 201) colocado a una altura de 0,80 m del suelo. Las mediciones se realizaron al mediodía de los días sin nubes y durante los meses de octubre a marzo de las tres estaciones de crecimiento, y se encontró que la intensidad de luz fue en promedio del 100,0, 57,1 y 24,1% de la luz natural incidente para alta, media y baja intensidad, respectivamente. Para el período comprendido entre mediados de diciembre y mediados de enero de las estaciones de crecimiento estudiadas y para la cercanía de la ciudad de Ushuaia, el valor promedio registrado para la densidad de flujo fotónico fue de  $2197,1 \pm 498,20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , valor comparable con los registrados años anteriores en Tierra del Fuego por Martínez Pastur et al. (2007).

La temperatura del aire, la temperatura del suelo a 15 cm de profundidad y la humedad relativa del aire se registraron mediante sensores acoplados a un *data logger* Marca HOBO 8K ubicado en cada tratamiento de intensidad de luz a lo largo de la estación de crecimiento (Octubre a Marzo) y durante las tres estaciones de crecimiento, registrando valores cada una hora. Dos veces por semana se registraba la humedad del suelo en 10 macetas por tratamiento, usando un medidor de humedad Aquaterr Soil Moisture M-300 Instrument. Cuando el porcentaje de humedad del suelo era inferior al 55-60% de la humedad a capacidad de campo, se regaba hasta alcanzar una humedad del 70% de la capacidad de campo.

Las temperaturas del aire y del suelo fueron muy similares en las estaciones de crecimiento 2007/08 y 2008/09, siendo a su vez mayores que las registradas en la estación de crecimiento 2009/10 (**Tabla II.1.1, Fig. II.1.2-4**).

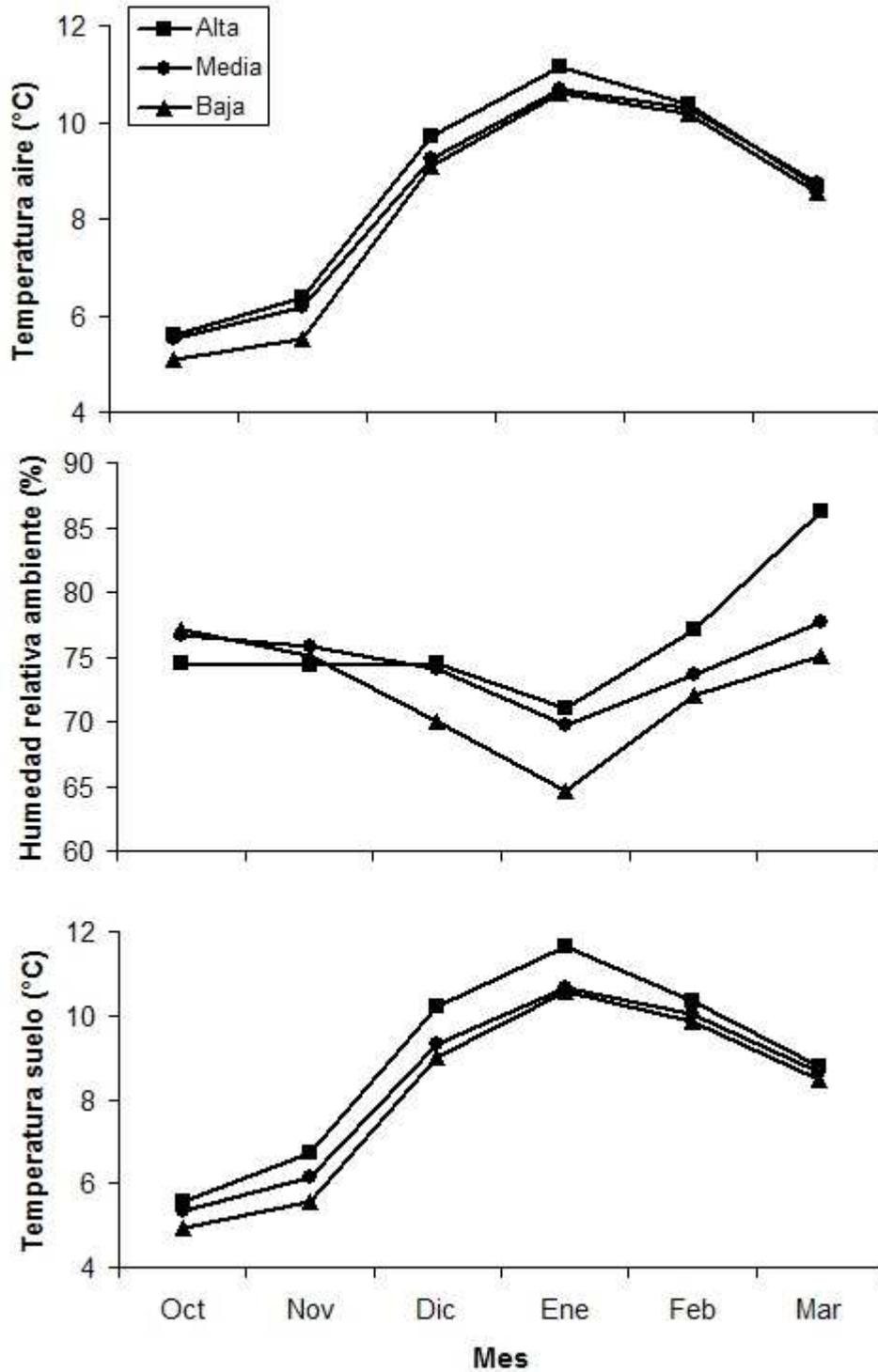
**Cultivo experimental en macetas**

**Tabla II.1.1.** Valores medios de temperatura del aire (°C), temperatura del suelo (°C) y humedad relativa del ambiente (%) en las intensidades de luz alta, media y baja, entre los meses de octubre a marzo para las estaciones de crecimiento 2007/08, 2008/09 y 2009/10.

	<b>2007/08</b>	<b>2008/09</b>	<b>2009/10</b>
<i>Temperatura del aire</i>			
Alta	8,64	9,08	7,75
Media	8,44	8,57	7,34
Baja	8,17	7,96	7,17
<i>Temperatura del suelo</i>			
Alta	8,87	8,78	8,45
Media	8,35	8,18	7,07
Baja	8,08	8,08	7,05
<i>Humedad relativa ambiente</i>			
Alta	76,28	75,15	70,89
Media	74,60	77,85	79,51
Baja	72,34	72,41	71,39

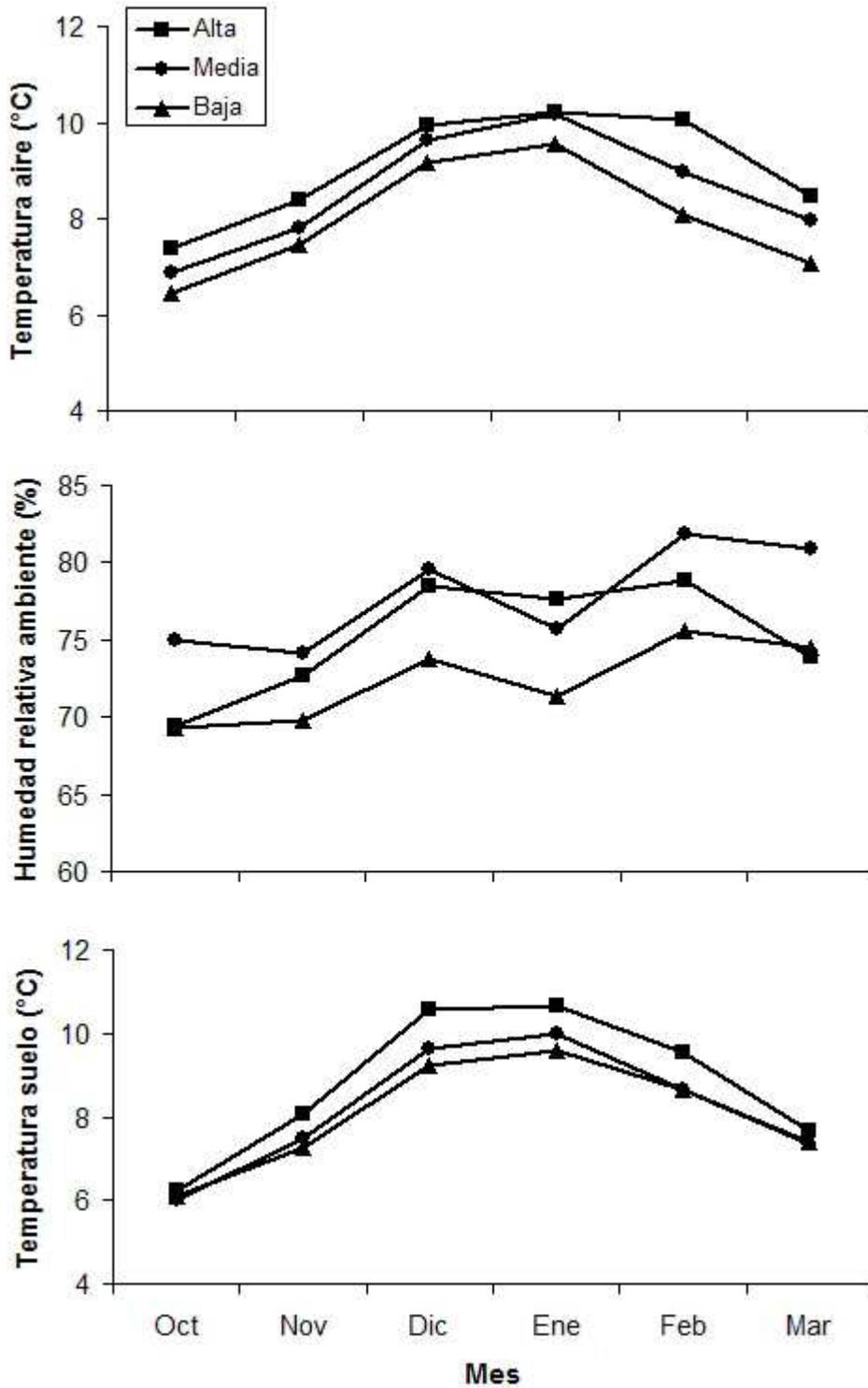
Las bajas temperaturas del aire y del suelo registradas particularmente en el mes de noviembre de 2009 para las tres intensidades de luz afectaron el promedio de temperatura de dicha temporada de crecimiento (**Fig. II.1.3**).

Cultivo experimental en macetas

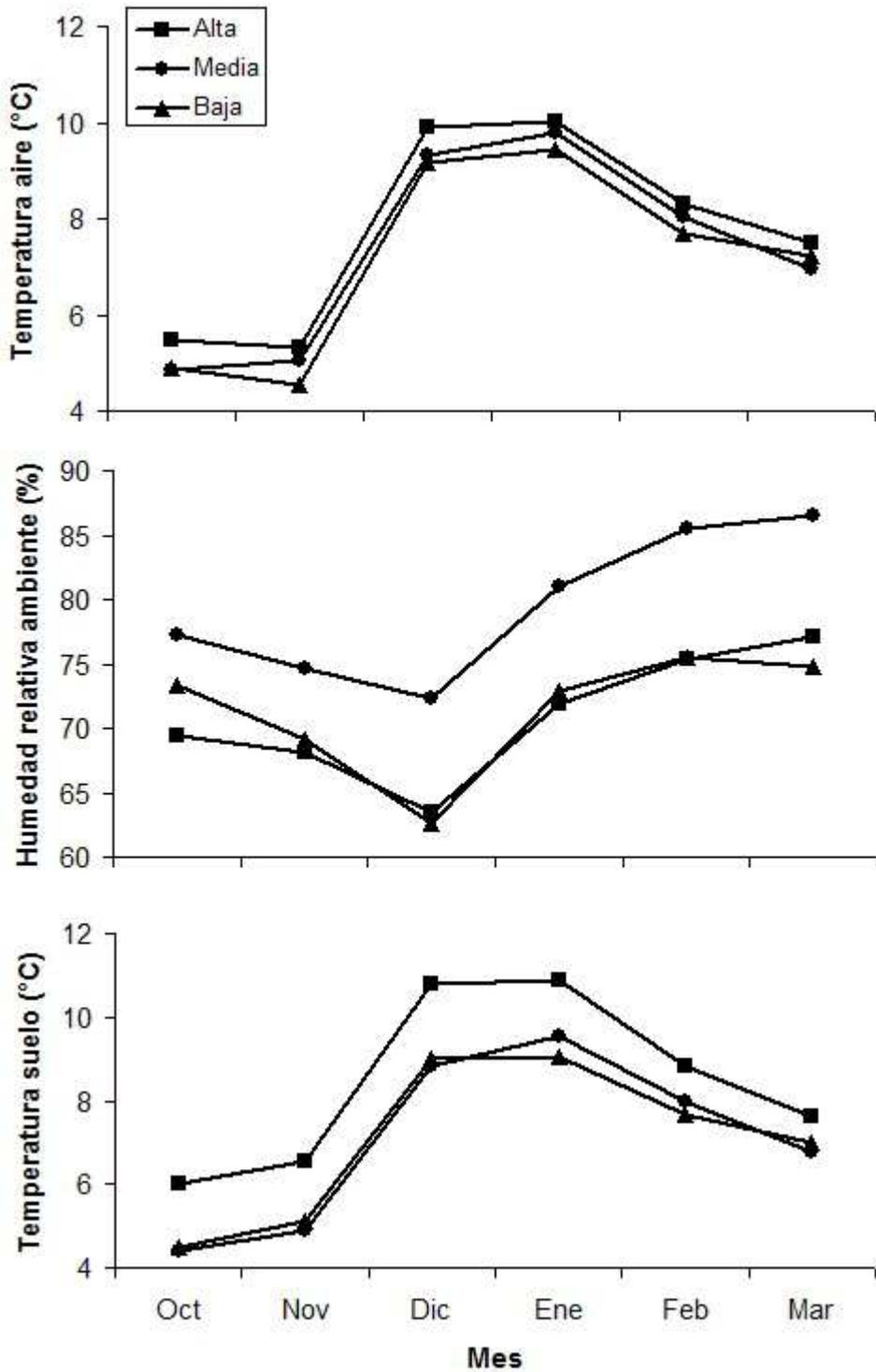


**Figura II.1.2.** Temperatura media del aire (°C), humedad relativa media del ambiente (%) y temperatura media del suelo (°C) a lo largo de la estación de crecimiento 2007/08 (octubre a marzo) bajo distintas intensidades de luz (alta, media y baja).

Cultivo experimental en macetas



**Figura II.1.3.** Temperatura media del aire (°C), humedad relativa media del ambiente (%) y temperatura media del suelo (°C) a lo largo de la estación de crecimiento 2008/09 (octubre a marzo) bajo distintas intensidades de luz (alta, media y baja).



**Figura II.1.4.** Temperatura media del aire (°C), humedad relativa media del ambiente (%) y temperatura media del suelo (°C) a lo largo de la estación de crecimiento 2009/10 (octubre a marzo) bajo distintas intensidades de luz (alta, media y baja).

### Cultivo experimental en macetas

Al observar la evolución de las temperaturas del aire y del suelo a lo largo la estación de crecimiento puede destacarse que los máximos valores se obtuvieron en los meses de enero, aunque particularmente en la estación de crecimiento 2009/10, en el mes de diciembre se registraron temperaturas similares a las de enero. Al comparar las temperaturas del aire y del suelo entre las tres intensidades de luz, puede observarse que las mayores temperaturas se registraron en alta intensidad de luz, siguiéndole media y baja intensidad de luz (**Tabla II.1.1, Fig. II.1.2-4**).

Si bien la humedad relativa del ambiente fue similar en las tres estaciones de crecimiento (**Tabla II.1.1, Fig. II.1.2-4**), la evolución de dicho parámetro a lo largo de cada estación de crecimiento mostró variaciones entre las estaciones de crecimiento (**Fig. II.1.2-4**). Así, en 2007/08 los valores mínimos se observaron en enero, mientras que en 2008/09 esta tendencia no fue tan marcada, y en 2009/10 se presentaron los mínimos en diciembre. En estos casos, dichos mínimos de humedad relativa del ambiente fue coincidente con las menores precipitaciones y/o con la combinación de las variables precipitación y temperatura. Al comparar la humedad relativa del ambiente entre las tres intensidades de luz, puede observarse que los mayores valores se obtuvieron en alta intensidad en 2007/08, mientras que en las siguientes estaciones se obtuvieron en media intensidad de luz (**Tabla II.1.1, Fig. II.1.2-4**).

### Fertilización inorgánica

Se realizó el aporte de los macronutrientes Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) en una relación N:P:K 1:0,6:1,2 y en 3 niveles: 0,00; 3,36 y 6,72 g por planta, denominados 0, 1 y 2 respectivamente, los que se aportaron en partes iguales (0; 1,68 y 3,36 g) en dos épocas durante cada estación de crecimiento: al inicio de la plena floración (fines de octubre) y durante el crecimiento de los brotes (principio de enero), según experiencias previas (Arena y Vater, 2003). Los fertilizantes empleados fueron: nitrato de amonio ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ), superfosfato triple de calcio ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ) y sulfato de potasio ( $\text{SO}_4\text{K}_2$ ) (**Tabla II.1.2**). Estos fertilizantes son los utilizados para el cultivo de especies de frutales menores de los géneros *Ribes* y *Rubus* en Tierra del Fuego.

**Tabla II.1.2.** Fertilizantes y elementos aportados (g) por planta de *B. microphylla* a lo largo de la estación de crecimiento según los niveles de fertilización.

Nivel de fertilización	$\text{NO}_3\text{NH}_4$ (N)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (P)	$\text{SO}_4\text{K}_2$ (K)
0	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1	1,50 (0,50)	0,66 (0,30)	1,20 (0,60)
2	3,00 (1,00)	1,32 (0,60)	2,40 (1,20)

### **Diseño experimental**

Se diseñó un ensayo factorial compuesto por el factor intensidad de luz (con el nivel alta, media y baja intensidad de luz) y el factor fertilización (con el nivel 0, 1 y 2 de fertilización), quedando las siguientes combinaciones: A0, A1, A2, M0, M1, M2, B0, B1 y B2. Para cada combinación de intensidad de luz y nivel de fertilización, se asignaron 100 plantas. Las macetas se rotaron de lugar periódicamente. El ensayo se instaló en el campo experimental del Centro Austral de Investigaciones Científicas, Ushuaia, Tierra del Fuego.

### **CONCLUSIONES**

Las temperaturas del aire y del suelo y la humedad relativa ambiente variaron con la intensidad de luz de los tratamientos. Las temperaturas del aire y del suelo fueron mayores en alta intensidad de luz, para disminuir en media y baja intensidad de luz. La humedad relativa ambiente fue mayor en alta intensidad en 2007/08, mientras que en las siguientes estaciones de crecimiento los máximos valores se obtuvieron en intensidad de luz media.

## **CAPITULO 2**

### **FENOLOGÍA**

## **INTRODUCCIÓN**

Los órganos aéreos vegetativos y reproductivos presentes a lo largo del ciclo de crecimiento de las plantas muestran diferentes aspectos de acuerdo a la fecha precisa en la estación de crecimiento. Estos cambios se llaman fases fenológicas y el estudio de la sucesión en el tiempo de estas fases se denomina fenología (Gil-Albert Velarde, 2006), la que está estrechamente influenciada por el clima y por los cambios estacionales. Es ampliamente conocido que la disponibilidad de luz, fotoperíodo, temperatura, agua y nutrientes en el suelo afectan la fenología de diversas especies vegetales (Gil Albert Velarde, 2006; Fremlin et al., 2011, Galloway y Burgess, 2012). Desde el punto de vista climatológico, las fases asociadas a la fenología del cultivo son claves para la interpretación adecuada de los cambios ocurridos en las mismas en respuesta a factores bioclimáticos cambiantes. De allí que, desde el punto de vista agronómico, una mejor comprensión de las consecuencias de un microclima particular permite prever las respuestas de las plantas. Por otro lado, desde un punto de vista económico, el conocimiento de las etapas fenológicas pueden predecir un probable brote de plagas, la necesidad de una fertilización específica, la aplicación de un producto de regulación del crecimiento vegetal, etc (García-Carbonell et al., 2002). El conocimiento de la fenología de una especie es una herramienta muy útil; la velocidad de cambio en las fases fenológicas demuestra el grado de adaptación de la especie vegetal a condiciones climáticas cambiantes, y dichos cambios pueden ocurrir más rápidamente que los cambios composicionales en la planta (Fremlin et al., 2011). La velocidad de cambio en las fases fenológicas también es llamada energía de fase, y es la mayor o menor fuerza con que se desarrolla la fase y que se valora por el número de días que tarda en manifestarse desde el primero al último órgano (Gil Albert Velarde, 2006). Así, el monitoreo de los eventos fenológicos tales como la brotación o floración, es un indicador para evaluar los efectos del cambio climático sobre la fisiología de las plantas.

La reducción de la intensidad de luz y la modificación de su calidad mediante el empleo de mallas media sombra pueden influir sobre el momento preciso de la inducción floral, a la vez de provocar cambios cuali-cuantitativos en la producción de los frutos en la estación de crecimiento siguiente (Lobos et al., 2013). Por otro lado, la nutrición mineral en la relación suelo-planta, y por ende la fertilización del suelo también puede afectar el desarrollo fenológico de las plantas (Fremlin et al., 2011).

**Hipótesis**

La fenología de *B. microphylla* es afectada por la intensidad de luz y la temperatura, el nivel de fertilización y las estaciones de crecimiento.

**Objetivos**

El objetivo de esta experiencia fue evaluar la fenología en plantas de *B. microphylla* cultivadas en diferentes intensidades de luz y niveles de fertilización durante las estaciones de crecimiento 2008/09 y 2009/10.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y condiciones de crecimiento

El material vegetal y las condiciones de crecimiento fueron descritos en el CAPITULO 1, PARTE II.

### Fenología

Los factores principales que se consideraron fueron: la intensidad de luz (baja, media y alta), el nivel de fertilización (0, 1 y 2), la fecha expresada en semanas (1, 2, 3 y 4) a lo largo de los meses de septiembre (S), octubre (O), noviembre (N) y diciembre (D),(S3, S4, O1, O2, O3, O4, N1, N2, N3, N4, D1, D2) y la estación de crecimiento (2008/09 y 2009/10).

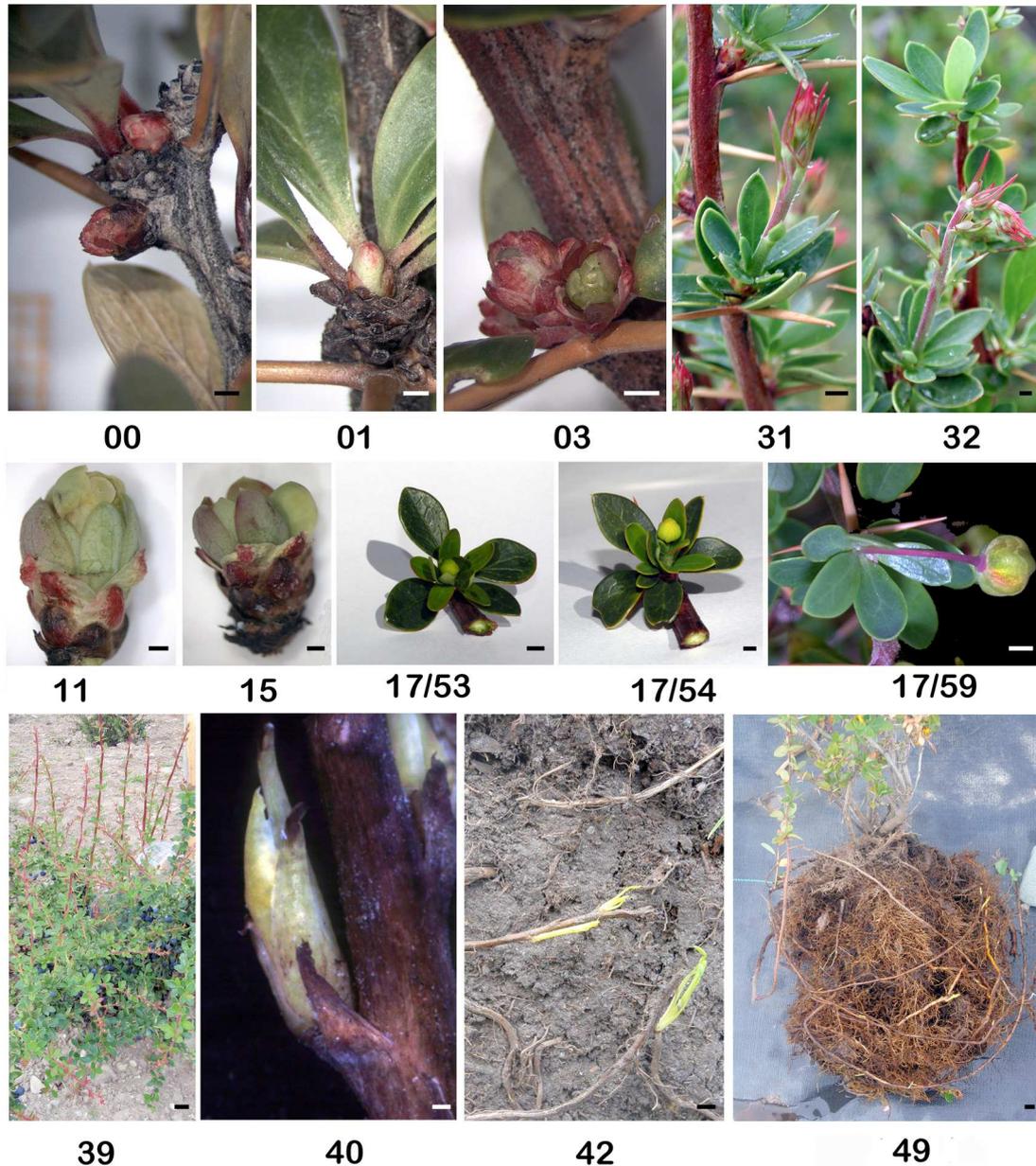
Al inicio de la estación de crecimiento 2008/2009, se eligieron en forma aleatoria 20 plantas por tratamiento, y semanalmente se evaluaron algunas de las variables caracterizadas previamente para esta especie en plantas crecidas en una población natural, según la escala BBCH (Arena et al., 2013). Entre las variables vegetativas se evaluaron: apertura de yema (**Fig. II.2.1, cód. 03**), despliegue de hoja (**Fig. II.2.1, cód. 15**), expansión de hojas (**Fig. II.2.1, cód. 17/54**) y alargamiento de brotes (**Fig. II.2.1, cód. 38**). Entre las variables reproductivas se evaluaron: botón floral verde (**Fig. II.2.1, cód. 17/54**), botón floral amarillo (**Fig. II.2.2, cód. 59**), flor abierta (**Fig. II.2.2, cód. 65**), fruto cuajado (**Fig. II.2.2, cód. 71**) y fructificación (**Fig. II.2.2, cód. 75**). El criterio adoptado para establecer la presencia de una fase en una planta se basó en la presencia de la variable cuantificada en el 50% o más de dicha planta y a su vez, cuando esta situación se dio en el 50% o más de las plantas muestreadas se consideró que dicha fase se presentó en el tratamiento siguiendo a Fleckinger (1955) con modificaciones.

### Relación carbono/nitrógeno

Al inicio de cada estación de crecimiento y en el mes de noviembre, se eligieron al azar 5 plantas por tratamiento para realizar las mediciones en aquellas hojas nuevas crecidas en la estación de crecimiento en la porción medial de las ramas fructíferas formadas en la estación de crecimiento anterior. El material vegetal se secó en una estufa a 65 °C hasta peso constante y luego se molió en un molinillo conteniendo una malla de acero inoxidable de 1 mm. En muestras de hojas secas (0,5 a 1,0 g) se determinó el contenido de nitrógeno mediante la técnica de Kjeldahl utilizando un Buchi K350 (Buchi, Flawil, Switzerland), mientras que el contenido de carbono se determinó mediante un espectrómetro de emisión de plasma (ICPS 1000 III, Shimadzu, Kyoto, Japón). Luego se calculó la relación carbono/nitrógeno.

## Fenología

Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza de 4 vías y las medias se separaron mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .



**Figura II.2.1.** Fases fenológicas registradas en las plantas de *B. microphylla* en una población natural de Ushuaia, Tierra del Fuego, según la escala BBCH. Fase de crecimiento principal 0 (desarrollo de la yema), 1 (crecimiento de la hoja), 3 (crecimiento del brote), 4 (órganos de propagación vegetativa) y 5 (emergencia de flores), con sus correspondientes códigos de fenofases. Barras 00 – 15 y 40 = 1 mm; 17/53 – 17/59 = 2 mm; 39; 42 y 49 = 10mm. Según Arena et al., 2013.

**Figura II.2.2.** Fases fenológicas en las plantas de *B. microphylla* en una población natural de Ushuaia, Tierra del Fuego, según la escala BBCH. Fase de crecimiento principal 5 (emergencia de flores), 6 (floración), 7 (desarrollo del fruto) y 8 (maduración de frutos), con sus correspondientes códigos de fenofases. Barras = 5 mm. Según Arena et al., 2013.

## RESULTADOS

### Fenología

El análisis de las fases fenológicas vegetativas, considerando la intensidad de luz como efecto principal, mostró diferencias significativas en los porcentajes de plantas con apertura de yema, despliegue de hoja, expansión de hojas y alargamiento de brotes (**Tabla II.2.1**). El despliegue de hojas y el alargamiento de brotes fueron máximos en alta intensidad de luz (41,6 y 7,4%, respectivamente), mientras que la apertura de yemas y la expansión de hojas fueron mayores en media intensidad de luz (11,8 y 44,9%, respectivamente).

El nivel de fertilización afectó significativamente los porcentajes de apertura de yema, despliegue de hoja y alargamiento de brotes (**Tabla II.2.1**), siendo la apertura de yema y el despliegue de hojas mayores cuando el aporte de fertilizante fue máximo (11,3 y 38,2%, respectivamente), mientras que alargamiento de brotes lo fue sin el aporte de fertilización (5,8%).

La fecha a lo largo de la estación de crecimiento también afectó los porcentajes de apertura de yema, despliegue de hoja, expansión de hojas y alargamiento de brotes (**Tabla II.2.1**), siendo la apertura de yemas máxima en la cuarta semana de septiembre y primera de octubre (36,3 y 33,9%, respectivamente), mientras que el despliegue de hojas lo fue en la tercera semana de octubre (82,3%), y la expansión de hojas y alargamiento de brotes lo fueron entre la cuarta semana de noviembre y principios de diciembre (94,1 y 17,8%, respectivamente).

Por último, la apertura de yema, la expansión de hojas y el alargamiento de brotes fueron máximos en la estación de crecimiento 2008/09 (11,8, 47,4 y 9,4%, respectivamente), mientras que el despliegue de hojas lo fue en 2009/10 (47,3%) (**Tabla II.2.1**).

Se encontraron interacciones significativas para las variables mencionadas entre los factores principales (**Tabla II.2.1**, **Fig. II.2.3**), principalmente debido a incrementos diferenciales en los valores de las variables. Así, para la apertura de yema, despliegue de hoja y expansión de hojas los valores máximos se presentaron antes en las plantas de los tratamientos intensidad de luz alta y media con respecto a los de intensidad de luz baja (**Fig. II.2.3A-C**), mientras que el alargamiento de brotes fue mayor en los tratamientos de intensidad de luz alta con respecto a los de intensidad de luz media y baja (**Fig. II.2.3D**). Del mismo modo, los valores máximos de estas variables correspondientes a plantas expuestas al mayor nivel de fertilización se anticiparon con respecto a los exhibidos en plantas de los otros tratamientos de fertilización (niveles 0 y 1). Por otra parte, el alargamiento de brotes se manifestó en 2008/09 mientras que dicha variable no se observó en 2009/10.

**Tabla II.2.1.** Fases fenológicas vegetativas en las plantas de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización, la semana del mes y la estación de crecimiento como factores principales y el porcentaje de plantas con apertura de yemas (AY), despliegue de hojas (DH), expansión de hojas (EH) y alargamiento de brotes (AB) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>AY</b>	<b>DH</b>	<b>EH</b>	<b>AB</b>
<i>A = intensidad de luz</i>				
Baja	8,26b	30,36c	33,68c	3,82b
Media	11,80a	36,20b	44,86a	2,92b
Alta	9,65b	41,60a	39,17b	7,36a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>				
0	9,37ab	35,07b	39,30	5,76a
1	9,00b	34,84b	39,86	5,28a
2	11,35a	38,25a	38,54	3,05b
<i>p</i>	0,016	<0,001	0,259	<0,001
<i>C = semana del mes</i>				
S3	19,00b	0,28g	0,00f	0,00b
S4	36,32a	14,92f	0,00f	0,00b
O1	33,95a	43,14d	0,28f	0,00b
O2	18,75b	70,56b	0,55f	0,00b
O3	8,89c	82,29a	3,05f	0,00b
O4	1,39d	74,65b	22,78e	0,00b
N1	0,55d	62,70c	37,50d	0,28b
N2	0,00d	49,58d	50,90c	0,55b
N3	0,00d	21,87e	78,33b	2,22b
N4	0,00d	10,14f	90,07a	17,78a
D1	0,00d	1,67g	93,26a	17,78a
D2	0,00d	8,33g	94,10a	17,78a
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>D = estación de crecimiento</i>				
2008/09	11,85a	24,81b	47,40a	9,40a
2009/10	7,96b	47,29a	31,06b	0,00b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B x C x D (p)</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

$p = \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

El análisis de las fases fenológicas reproductivas, considerando la intensidad de luz como efecto principal, mostró diferencias significativas en los porcentajes de plantas con botón floral verde, botón floral amarillo, flor abierta, fruto cuajado y fructificación (**Tabla II.2.2**), siendo los valores para botón floral verde y fructificación mayor en alta intensidad de luz (7,2 y 15,7%, respectivamente), mientras que los valores para botón floral amarillo, flor abierta y fruto cuajado fueron mayores bajo intensidad de luz media (19,7, 18,2 y 7,7%, respectivamente).

El nivel de fertilización afectó significativamente la proporción de plantas con flor abierta (**Tabla II.2.2**), siendo significativamente mayor cuando el aporte de fertilizante fue máximo (20,2%).

## Fenología

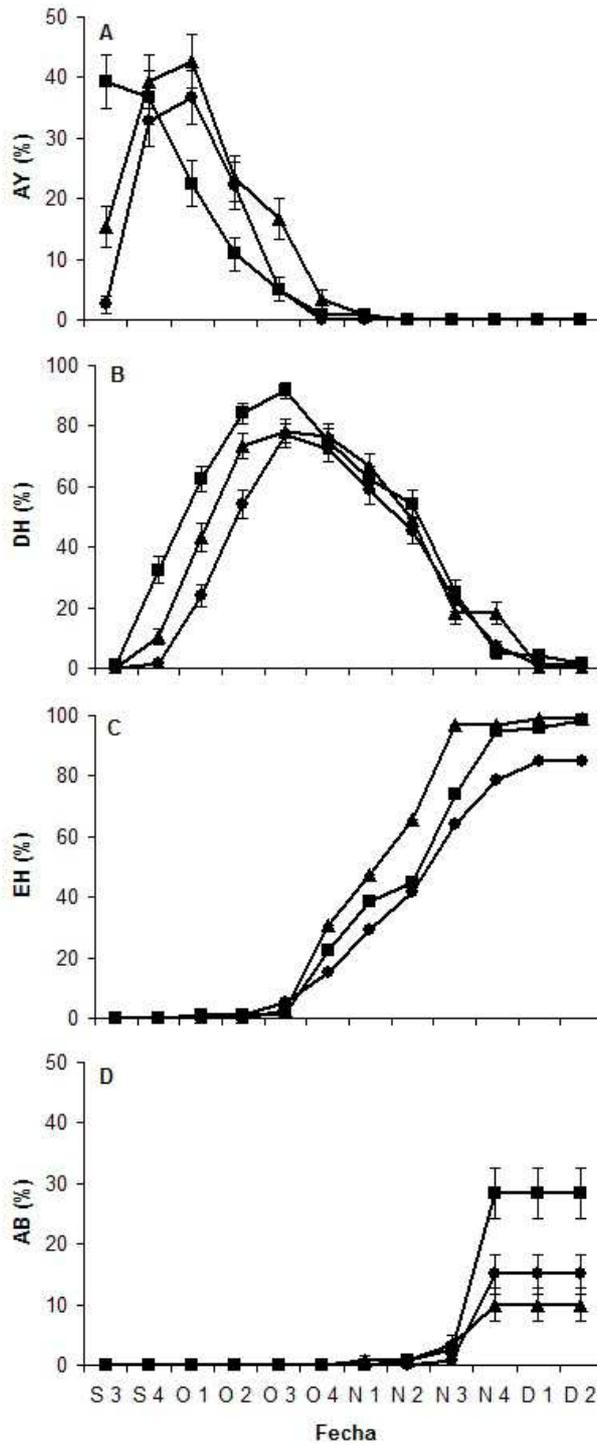
La fecha a lo largo de la estación de crecimiento también afectó los valores de botón floral verde, botón floral amarillo, flor abierta, fruto cuajado y fructificación (**Tabla II.2.2**), registrándose para botón floral verde el máximo valor en la segunda y tercera semana de octubre (23,1 – 21,8%), para botón floral amarillo en la cuarta semana de octubre (57,9%), para flor abierta en la cuarta semana de noviembre (43,1%), mientras que fruto cuajado y fructificación lo fueron en la tercer semana de noviembre y segunda semana de diciembre (16,4 y 51,7%, respectivamente).

Por último, mientras que los valores para botón floral verde, botón floral amarillo y flor abierta fueron máximos en la estación de crecimiento 2009/10 (7,1, 24,7 y 22,5%, respectivamente), los correspondientes a fruto cuajado y fructificación lo fueron en 2008/09 (8,0 y 13,7%, respectivamente). Cabe destacar que la fructificación a lo largo de la segunda quincena de diciembre, enero y febrero tuvo un comportamiento diferencial de acuerdo a la intensidad de luz, siendo mínimo el porcentaje de plantas con frutos bajo intensidad de luz baja, dada la alta abscisión de los mismos.

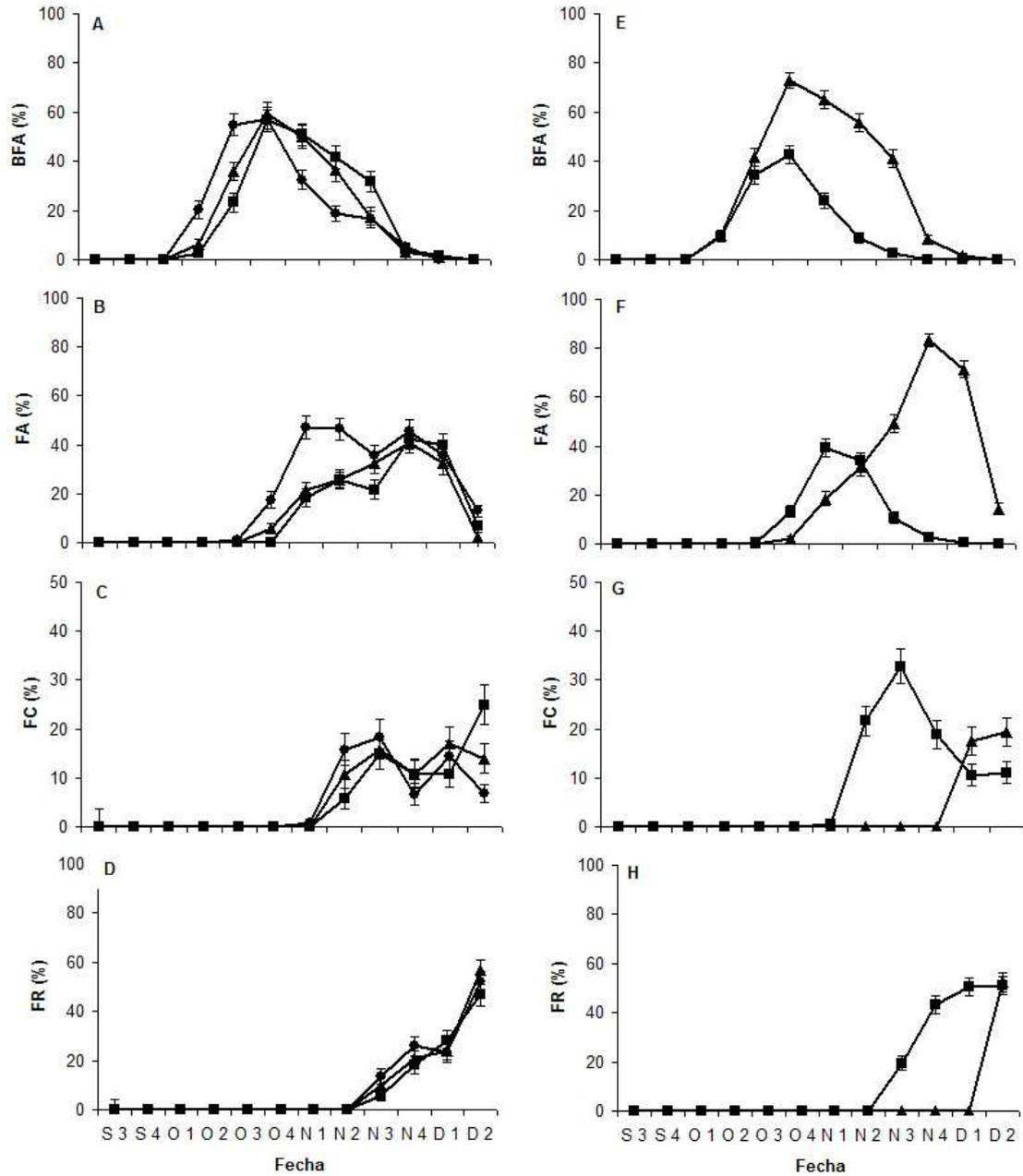
Se encontraron interacciones significativas para las variables mencionadas entre los factores principales (**Tabla II.2.2, Fig. II.2.4**), principalmente debido a incrementos diferenciales en los valores de las variables. Así, para botón floral amarillo, flor abierta y fruto cuajado los valores máximos correspondientes al mayor nivel de fertilización se anticiparon con respecto a los niveles 0 y 1 (**Fig. II.2.4A- C**). Por otra parte, flor abierta, fruto cuajado y fructificación se adelantaron en 2008/09 con respecto a 2009/10 (**Fig. II.2.4F-H**). Pueden observarse también las diferencias encontradas en las fases reproductivas de los tratamientos L2, M2 y O2 mediante los fenogramas de la Figura **Fig. II.2.5**).

**Tabla II.2.2.** Fases fenológicas reproductivas en las plantas de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz (A), el nivel de fertilización (B), la semana del mes (C) y la estación de crecimiento (D) como factores principales y el porcentaje de plantas con botón floral verde (BFV), botón floral amarillo (BFA), flor abierta (FA), fruto cuajado (FC) y fructificación (FR) como variables dependientes.  $p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey  $p \leq 0,05$ .

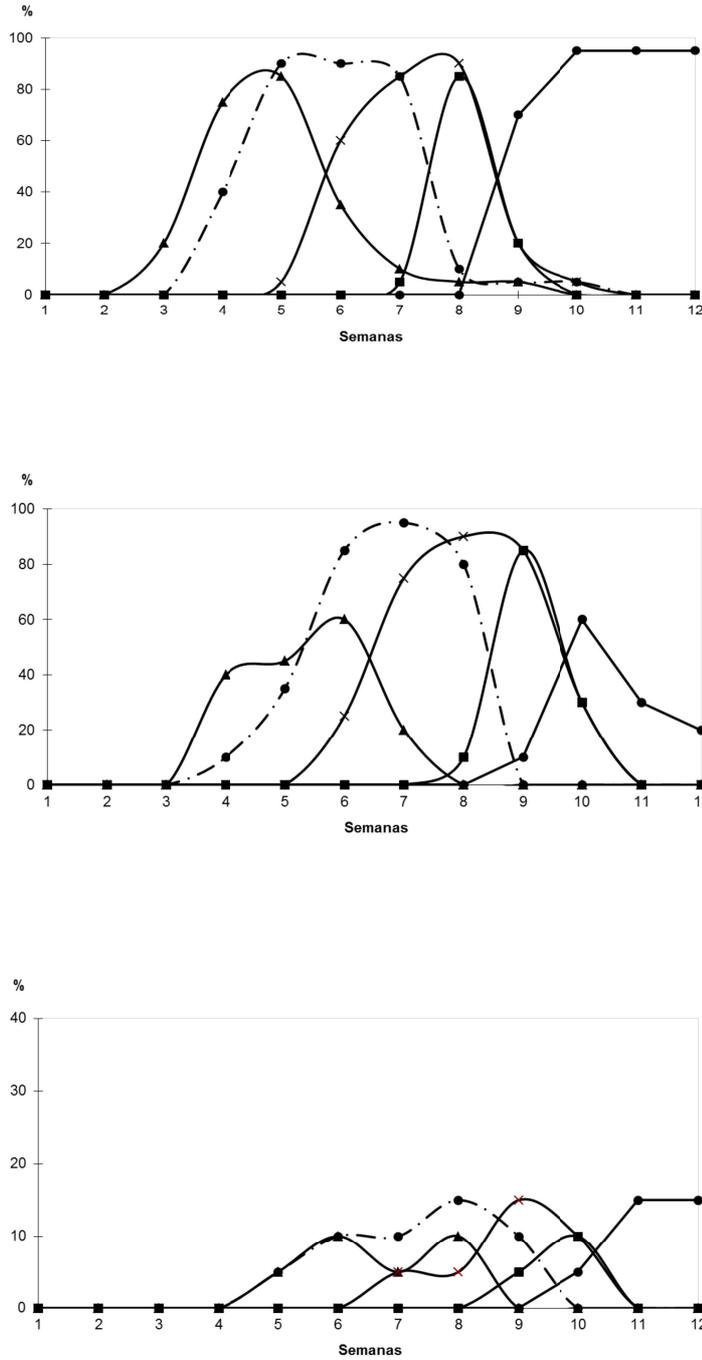
<b>Efectos principales</b>	<b>BFV</b>	<b>BFA</b>	<b>FA</b>	<b>FC</b>	<b>FR</b>
<i>A = intensidad de luz</i>					
Baja	2,97b	15,10b	11,47b	2,86c	2,53c
Media	5,60a	19,74a	18,19a	7,73a	8,87b
Alta	7,22a	17,50ab	16,80a	5,97b	15,69a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>					
0	5,42	17,70	12,92b	5,62	8,26
1	5,40	17,46	13,38b	5,71	9,30
2	4,98	17,17	20,17a	5,23	9,53
<i>p</i>	0,796	0,870	<0,001	0,756	0,114
<i>C = semana del mes</i>					
S3	0,00c	0,00f	0,00e	0,00d	0,00d
S4	0,00c	0,00f	0,00e	0,00d	0,00d
O1	4,22bc	0,00ef	0,00e	0,00d	0,00d
O2	23,14a	9,71e	0,00e	0,00d	0,00d
O3	21,76a	38,08bc	0,28e	0,00d	0,00d
O4	8,78b	57,89a	7,78d	0,00d	0,00d
N1	3,89c	44,44b	28,96c	0,28d	0,00d
N2	1,11c	32,36c	32,63bc	10,83bc	0,00d
N3	0,28c	21,93d	29,94c	16,39a	9,72c
N4	0,00c	4,04f	43,11a	9,44c	21,67b
D1	0,00c	0,90f	36,00b	14,07ab	25,28b
D2	0,00c	0,00f	7,18d	15,25ab	51,73a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>D = estación de crecimiento</i>					
2008/09	3,38b	10,18b	8,42b	7,96a	13,70a
2009/10	7,15a	24,70a	22,55a	3,08b	4,36b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B x C x D (p)</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001



**Figura II.2.3.** Porcentaje de plantas de *B. microphylla* con apertura de yema (AY) en **A**, despliegue de hoja (DH) en **B**, expansión de hojas (EH) en **C** y alargamiento de brotes (AB) en **D**, mostrando las interacciones entre la fecha y la intensidad de luz baja (●), media (▲) y alta (■). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura II.2.4.** Porcentaje de plantas de *B. microphylla* con botón floral abierto (BFA), flor abierta (FA), fruto cuajado (FC) y fructificación (FR), mostrando las interacciones en A, B, C, y D entre la fecha y el nivel de fertilización 0 (■), 1 (▲) y 2 (●), y en E, F, G, y H entre la fecha y la estación de crecimiento 2008/09 (■) y 2009/10 (▲). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura II.2.5.** Fenogramas de las fases reproductivas de las plantas de *B. microphylla* en los tratamientos L2 (arriba), M2 (medio) y O2 (abajo) durante la estación de crecimiento 2008-2009. Capullo (▲), receptividad estomática (●), antesis (×), caída de pétalos (■) y fruto (◆).

### Relación carbono/nitrógeno

## **Fenología**

La intensidad de luz afectó significativamente ( $p = 0,026$ ) la relación carbono/nitrógeno en las hojas al inicio de la estación de crecimiento, siendo significativamente superior en alta intensidad de luz (25,2) con respecto a media y baja intensidad de luz (17,4 y 19,9). Sin embargo, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento no afectaron significativamente dicho parámetro ( $p = 0,515$  y  $p = 0,090$ , respectivamente), encontrándose que la relación carbono/nitrógeno fue de 19,6, 20,3 y 22,7 para los niveles de fertilización 0, 1 y 2, mientras que tomó valores de 21,5 y 20,1 para 2008/09 y 2009/10 respectivamente. No se encontraron interacciones significativas entre los factores estudiados ( $p = 0,543$ ).

## **DISCUSIÓN**

### **Cambios en la fenología a lo largo de la estación de crecimiento**

Las primeras fases fenológicas vegetativas, apertura de yema y despliegue de hoja, comenzaron a acontecer a partir de mediados de septiembre y durante octubre, para dar posteriormente lugar a la expansión de hojas a partir de fines de este mes y durante el resto del período estudiado. El alargamiento de brotes comenzó a fines de noviembre para continuar a lo largo de la estación de crecimiento. La primera fase fenológica reproductiva (botón floral verde) comenzó a acontecer a partir de comienzos de octubre, mientras que la fase correspondiente al botón floral amarillo lo hizo a partir de mediados del mismo mes y su duración estuvo estrechamente relacionada con el tratamiento. La fase de flor abierta se manifestó a lo largo de noviembre para luego dar lugar a la de fruto cuajado a partir de mediados del mismo mes y por último a la fase de fructificación hacia fines de noviembre. La fenología de los órganos vegetativos y reproductivos en estas condiciones experimentales fue comparable a la fenología observada en las plantas en las condiciones de crecimiento naturales (Arena et al., 2003; 2011).

### **Cambios en la fenología con la intensidad de luz**

Las variables apertura de yema, despliegue de hoja, expansión de hojas, y alargamiento de brotes pudieron relacionarse con la intensidad de luz y la temperatura media del aire y del suelo, siendo mayores el despliegue foliar y el alargamiento de brotes en alta intensidad de luz, mientras que la apertura de yemas y la expansión de la hoja fueron mayores en media intensidad de luz. Por otra parte, las variables botón floral verde, botón floral amarillo, flor abierta, fruto cuajado y fructificación también pudieron correlacionarse con la intensidad de luz y la temperatura media del aire y del suelo, apareciendo para ellas los mayores valores bajo exposición de intensidad de luz alta y media. Es así que mientras la totalidad de las fases fenológicas vegetativas se presentaron en todas las combinaciones de intensidad de luz y nivel de fertilización, la totalidad de las fases reproductivas se presentaron sólo en las combinaciones de intensidad de luz media y alta con los tres niveles de fertilización, dado que en intensidad de luz baja y con los tres niveles de fertilización las variables botón floral verde, botón floral amarillo, flor abierta, fruto cuajado y fructificación se presentaron en menos del 50% de las plantas. Estos resultados demuestran que la intensidad de luz afectó la fenología; en efecto, la ocurrencia de las fases se adelantó en intensidad de luz alta y media con respecto a baja, pudiendo correlacionarse además con las mayores temperaturas del aire y del suelo desde el inicio del ensayo (CAPÍTULO 1, PARTE II), como fuera observado por Lechowicz (1984). Además, la mayor relación

## Fenología

carbono/nitrógeno encontrada al principio de la estación de crecimiento en las hojas de las plantas bajo intensidad de luz alta (25,2) en relación a obtenidas para media (17,4) y baja (19,8) intensidad de luz, podría explicar estos resultados. En árboles deciduos se encontró que una actividad fotosintética reducida debido a bajos niveles de luz puede afectar negativamente la diferenciación floral a causa de flujos de hidratos de carbono reducidos desde los tejidos foliares (Corelli-Grappadelli, 2003). La intensidad de la luz también afectó la fenología de *Campanulastrum americanum* Small (Galloway y Burgess, 2012) y *Malus domestica* (Smit, 2007), así como también la de especies nativas de la Patagonia como *Nothofagus pumilio* (Martínez Pastur et al., 2007) y *Osmorhiza depauperata* (Lencinas et al., 2012).

### Cambios en la fenología con el nivel de fertilización

Las variables apertura de yema, despliegue de hoja y alargamiento de brotes pudieron relacionarse con el nivel de fertilización, alcanzando valores máximos las dos primeras en el nivel de fertilización mayor (2), mientras que el alargamiento de brotes fue mayor en los niveles de fertilización 0 y 1. La variable flor abierta también pudo relacionarse con el nivel de fertilización, siendo mayor en el nivel 2. La fertilización afectó la fenología, en donde la ocurrencia de las fases se adelantó en los niveles de fertilización 1 y 2 con respecto al nivel 0. Estos resultados también podrían relacionarse con la mayor relación carbono/nitrógeno encontrada al principio de la estación de crecimiento en las hojas de las plantas, que fue máxima en el nivel de fertilización 2 con respecto al 1 y 0, tanto en intensidad de luz alta (relación carbono/nitrógeno de 22,7, 22,2 y 30,9 para los niveles de fertilización 0, 1 y 2, respectivamente) como en intensidad de luz media (relación carbono/nitrógeno de 16,7, 17,0 y 18,1 para los niveles de fertilización 0, 1 y 2, respectivamente). La menor relación carbono/nitrógeno observada al inicio de la estación de crecimiento en las plantas con nivel de fertilización 0 y 1 podría justificar el mayor crecimiento vegetativo observado. El adelantamiento en la ocurrencia de algunas fases fenológicas en respuesta a la fertilización con N:P:K (35:10:5) también se observó en diversas especies del sotobosque boreal en Canadá (Fremlin et al., 2011). Por ejemplo, en *Calluna vulgaris*, el agregado de nitrógeno promovió una apertura de yemas más temprana (Nord y Lynch, 2009).

### Cambios en la fenología entre las estaciones de crecimiento

Las dos primeras fases fenológicas vegetativas (apertura de yema y despliegue de hoja) presentaron mayor energía de fase en 2008/09 con respecto a 2009/10, mientras que la tercera y cuarta fase fenológica vegetativa de expansión de hojas y

## **Fenología**

alargamiento de brotes acontecieron antes en 2008/09 con respecto a 2009/10. Sin embargo, el despliegue de hoja adquirió valores mayores en 2009/10 con respecto a 2008/09. La fase de botón floral amarillo también presentó mayor energía de fase en 2008/09. Ambas variables, botón floral y flor abierta, presentaron valores mayores en 2009/10 con respecto a 2008/09, debido al mayor número de plantas bajo intensidad de luz media y baja que presentaron las mencionadas fases fenológicas. Las fases fenológicas fruto cuajado y fructificación se adelantaron en 2008/09 con respecto a 2009/10, presentando a su vez en 2008/09 los máximos valores. Estos resultados muestran que la eficiencia reproductiva fue mayor en 2008/09 con respecto a 2009/10. El adelantamiento de algunas de las fases vegetativas y reproductivas en 2008/09 con respecto a 2009/10 se debería a las diferentes condiciones ambientales existentes entre ambas estaciones de crecimiento, pudiendo destacarse que noviembre de 2009 fue un mes con temperaturas atípicamente bajas (CAPÍTULO 1, PARTE II), poniendo en evidencia la relación entre la fenología de *B. microphylla* y los factores climáticos, como fue observado para otras especies (García-Carbonell et al., 2002). Las temperaturas que se producen antes y durante la floración afectan la duración del período de floración y particularmente las temperaturas bajas durante dicho período retrasan la caída de pétalos (Sozzi, 2007).

## **CONCLUSIONES**

La fenología de las plantas de *B. microphylla* mostró cambios con la intensidad de luz, el nivel de fertilización, la semana del mes y la estación de crecimiento.

Las plantas cultivadas bajo 57 y 100% de intensidad de luz, con mayores temperaturas del aire y del suelo y con fertilización presentaron el adelantamiento de algunas fases fenológicas vegetativas y reproductivas, a la vez que los máximos porcentajes de plantas con la presencia de las variables consideradas. Sólo en las combinaciones de intensidad de luz alta y media y con los tres niveles de fertilización se presentaron la totalidad de las fases fenológicas vegetativas y reproductivas (o sea en un 50% o más de las plantas) en las dos estaciones de crecimiento estudiadas. Las plantas presentaron en 2008/09 el adelantamiento de algunas fases fenológicas vegetativas y reproductivas con respecto a 2009/10, a la vez se presentaron los mayores porcentajes de plantas con la presencia de fruto cuajado y fructificación. Sin embargo, en 2009/10, se observaron los mayores porcentajes de plantas con botón floral verde, botón floral amarillo y flor abierta. Estos resultados muestran que la eficiencia reproductiva fue mayor en 2008/09 con respecto a 2009/10.

Los cambios fenológicos observados en las plantas de *B. microphylla* se pudieron relacionar con las condiciones ambientales de los tratamientos y con los niveles de fertilización, y de manera consistente con la relación carbono/nitrógeno determinada en las hojas de las plantas al principio de la estación de crecimiento, indicando que las plantas presentan una capacidad de aclimatación fenológica a dichas condiciones de crecimiento.

## **CAPITULO 3**

### **CONTENIDO DE NUTRIENTES Y PIGMENTOS FOLIARES**

## **INTRODUCCIÓN**

Las plantas tienen la capacidad de adaptarse a diversas situaciones ambientales como aquellas colocadas por diferentes condiciones de luz, humedad y nivel de nutrientes minerales en el suelo. Tal adaptación ocurre entre otros, mediante cambios en el contenido foliar de nutrientes (Sardans et al., 2006), y de sus pigmentos foliares (Valladares et al., 2000; Damesin, 2003; Larcher, 2003; Zúñiga et al., 2006; Lichtenthaler et al., 2007). Existen algunos antecedentes en los cuales se ha observado una variación en el contenido de nutrientes minerales y pigmentos foliares de arbustos siempreverdes (Katahata et al., 2007; Muller et al., 2011) como respuesta a variaciones en las condiciones ambientales. En este sentido, el conocimiento de los cambios en los contenidos de nutrientes y pigmentos foliares serían de valor para establecer correlaciones con diversas variables morfofisiológicas y bioquímicas, y en última instancia con el crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas de *B. microphylla*.

## **Hipótesis**

El contenido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio foliar en plantas de *B. microphylla* es afectado por la intensidad de luz y la temperatura, el nivel de fertilización y las estaciones de crecimiento.

El contenido de las clorofilas A y B y de los carotenoides foliar en plantas de *B. microphylla* es afectado por la intensidad de luz y la temperatura, el nivel de fertilización y las estaciones de crecimiento.

## **Objetivos**

Evaluar la variación en el contenido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio foliar en plantas de *B. microphylla* cultivadas bajo diferentes intensidades de luz y niveles de fertilización durante las estaciones de crecimiento 2008/09 y 2009/10.

Evaluar la variación en el contenido de las clorofilas A y B y de carotenoides foliar en plantas de *B. microphylla* cultivadas bajo diferentes intensidades de luz y niveles de fertilización durante las estaciones de crecimiento 2008/09 y 2009/10.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Contenido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio foliar

Los factores principales que se consideraron fueron: la intensidad de luz (baja, media y alta), el nivel de fertilización (0, 1 y 2) y la estación de crecimiento (2008/09 y 2009/10). A comienzos del mes de marzo se eligieron al azar 5 plantas por tratamiento, y se seleccionaron las hojas nuevas crecidas en la estación de crecimiento ubicadas en la porción medial de los ramos formados en la estación de crecimiento anterior. Las hojas se secaron en una estufa a 65 °C por 7 días hasta peso constante y luego se molieron en un molinillo conteniendo una malla de acero inoxidable de 1 mm para posteriormente obtener las muestras secas (0,5 a 1 g), en las cuales se determinó el contenido de nitrógeno usando la técnica de Kjeldahl utilizando un Buchi K350 (Buchi, Flawil, Switzerland), mientras que el carbono, el fósforo y el potasio se determinaron mediante un espectrómetro de emisión de plasma (ICPS 1000 III, Shimadzu, Kyoto, Japón).

Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza de 3 vías y las medias se separaron a través del test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

### Contenido de pigmentos foliares

Los factores principales que se consideraron fueron: la intensidad de luz (baja, media y alta), el nivel de fertilización (0, 1 y 2), el mes (noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo) y la estación de crecimiento (2008/09 y 2009/10). A mediados de cada mes se eligieron al azar 5 plantas por tratamiento, y se seleccionaron las hojas nuevas crecidas en la estación de crecimiento en la porción medial de las ramas formadas en la estación de crecimiento anterior. De las hojas se obtuvieron los discos foliares (**Fig. II.3.1**), los que fueron inmediatamente pesados y conservados refrigerados hasta la cuantificación de los pigmentos foliares. También se analizó la relación peso fresco/superficie foliar. Las clorofilas A y B y los carotenoides se determinaron mediante el método espectrofotométrico de Sims y Gamon (2002). Brevemente, dos discos foliares con una superficie 0,28 cm<sup>2</sup> cada uno se maceraron en 2 ml de una solución acuosa buffer tris-acetona (80% v/v, pH 7,8), y luego se centrifugaron a 1610 x g por 10 min a 20 °C. En el sobrenadante se determinó la absorbancia a 470, 537, 647 y 663 nm para obtener los contenidos en µm/g de la clorofila A  $(0,01373 \times \text{Abs}_{663}) - (0,000897 \times \text{Abs}_{537}) - (0,003046 \times \text{Abs}_{647})$ , la clorofila B  $(0,02405 \times \text{Abs}_{647}) - (0,004305 \times \text{Abs}_{537}) - (0,005507 \times \text{Abs}_{663})$  y los carotenoides  $(\text{Abs}_{470} - (17,1 \times (\text{clorofila A} + \text{clorofila B}) - 9,479 \times \text{Antocianinas}) / 119,26)$ , siendo las antocianinas cuantificadas mediante la ecuación  $(0,08173 \times \text{Abs}_{537}) - (0,00697 \times \text{Abs}_{647}) -$

### Nutrientes y pigmentos foliares

( $0,002228 \cdot \text{Abs}_{663}$ ). Los contenidos de pigmentos expresados en  $\text{mmol/m}^{-2}$  de área foliar fueron funciones de los contenidos expresados más arriba en  $\mu\text{m/g}$ , del volumen total de la solución de extracción y del área de la hoja total extractada.

Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza de 4 vías, luego las medias fueron separadas a través del Test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .



**Figura II.3.1.** Discos ( $0,28 \text{ cm}^2$ ) obtenidos de las hojas de *B. microphylla* para la cuantificación de los pigmentos.

## RESULTADOS

### Contenido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio foliar

Cuando la intensidad de luz fue considerada como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en los contenidos de carbono, nitrógeno, potasio y la relación carbono/nitrógeno foliar (**Tabla II.3.1**), siendo ambos, el contenido de carbono y la relación carbono/nitrógeno mayores en intensidad de luz alta (48,0% y 37,0 respectivamente), mientras que los contenidos de nitrógeno y de potasio lo fueron en intensidad de luz baja (2,0% y 5.970,9 ppm respectivamente), al igual que el de fósforo (878,2 ppm), aunque en este caso sin mostrar diferencias significativas.

El nivel de fertilización afectó significativamente el contenido de los nutrientes foliares, a excepción del carbono (**Tabla II.3.1**), siendo los valores correspondientes a nitrógeno, fósforo y potasio mayores cuando el aporte de fertilizante fue máximo (2,0%, 1.003,7 ppm y 6.087,4 ppm respectivamente), mientras que la relación carbono/nitrógeno fue mayor sin fertilización (37,5).

Por último, en la estación de crecimiento 2009/10 las hojas presentaron mayores contenidos de fósforo y potasio (911,7 y 5.367,5 ppm respectivamente) con respecto a 2008/09, mientras que el contenido de carbono, nitrógeno y la relación carbono/nitrógeno no varió significativamente entre ambas estaciones de crecimiento (**Tabla II.3.1**).

Se encontraron interacciones significativas entre los factores principales para el potasio foliar (**Tabla II.3.1**, **Fig. II.3.2**). Se observó que el contenido de potasio en 2008/09 fue mayor en los tratamientos bajo mayores intensidades de luz y con fertilización, mientras que en 2009/10 se revirtió en parte esta tendencia, siendo mayor en las hojas de plantas de los tratamientos con baja intensidad de luz y fertilización.

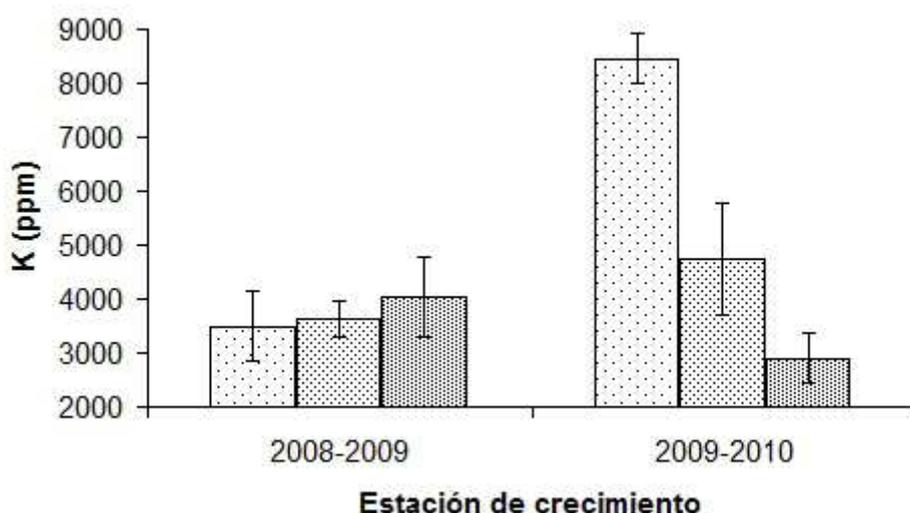
**Nutrientes y pigmentos foliares**

**Tabla II.3.1.** Nutrientes inorgánicos de las hojas de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA al inicio del mes de marzo, considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales y el contenido de carbono orgánico (%) (C), nitrógeno (%) (N), relación carbono/nitrógeno (C/N), fósforo (ppm) (P) y potasio (ppm) (K) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>C/N</b>	<b>P</b>	<b>K</b>
<i>A = intensidad de luz</i>					
Baja	47,22b	2,01a	23,98c	878,24	5.970,91a
Media	47,24b	1,62b	31,41b	861,15	4.194,24b
Alta	48,05a	1,37c	36,97a	797,94	3.471,76b
<i>p</i>	0,010	<0,001	<0,001	0,550	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>					
0	47,33	1,37c	37,54a	696,15b	2.947,45c
1	47,59	1,68b	29,58b	837,51ab	4.602,06b
2	47,59	1,96a	25,24c	1.003,68a	6.087,4a
<i>p</i>	0,599	<0,001	<0,001	0,001	<0,001
<i>C = estación de crecimiento</i>					
2008/09	47,53	1,62	31,44	779,84b	3.723,77b
2009/10	47,48	1,71	30,13	911,71a	5.367,50a
<i>p</i>	0,830	0,202	0,324	0,043	<0,001
<i>Interacciones A x B x C (p)</i>	0,990	0,306	0,283	0,929	0,024

*p* = ≤ 0,05. Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a *p* ≤ 0,05.

### Nutrientes y pigmentos foliares



**Figura II.3.2.** Contenidos foliares de potasio (K) en *B. microphylla* considerando la interacción entre la estación de crecimiento (2008/09 y 2009/10) y la intensidad de luz baja (· · ·), media (· · · · ·) y alta (· · · · ·). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.

#### Contenido de pigmentos foliares

Cuando la intensidad de luz fue considerada como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en los contenidos de los pigmentos foliares expresados tanto en términos de peso fresco (**Tabla II.3.2**) como de superficie foliar (**Tabla II.3.3**), siendo los contenidos de las clorofilas A y B y los carotenoides mayores en intensidad de luz baja. Así, los contenidos de las clorofilas A y B y los carotenoides en intensidad de luz baja expresados en términos de peso fresco fueron de 1,3, 0,5 y 0,6  $\mu\text{mol/g}$  respectivamente, mientras que en términos de superficie fueron de 0,4, 0,1 y 0,2  $\text{mmol/m}^2$  respectivamente. La relación clorofila A/B fue significativamente superior en condiciones de intensidad de luz alta y media con respecto a intensidad de luz baja (**Tablas II.3.2-3**). La relación peso/superficie foliar aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) desde intensidad de luz baja a alta (0,029 a 0,036, respectivamente).

El nivel de fertilización afectó significativamente los contenidos de los pigmentos foliares expresados tanto en términos de peso fresco (**Tabla II.3.2**) como de superficie foliar (**Tabla II.3.3**), siendo los contenidos de las clorofilas A y B y los carotenoides mayores con los máximos niveles de fertilización. Así, los contenidos de las clorofilas A y B y los carotenoides con el nivel de fertilización 2 expresados en términos de peso fresco fueron de 1,1, 0,4 y 0,6  $\mu\text{mol/g}$  respectivamente, mientras que en términos de superficie fueron de 0,4, 0,1 y 0,2  $\text{mmol/m}^2$  respectivamente. La relación clorofila A/B fue significativamente superior con el nivel de fertilización 1 con respecto a las plantas sin fertilización (**Tablas II.3.2-3**). La relación peso/superficie

### Nutrientes y pigmentos foliares

foliar aumentó significativamente ( $p = 0,046$ ) desde el nivel de fertilización 0 al 2 (0,032 a 0,033, respectivamente).

El mes a lo largo de la estación de crecimiento también afectó significativamente los contenidos de los pigmentos foliares expresados tanto en términos de peso fresco (**Tabla II.3.2**) como de superficie foliar (**Tabla II.3.3**), siendo los contenidos de las clorofilas A y B mayores en los meses de enero y febrero, mientras que los carotenoides fueron máximos en enero. Así, los contenidos de las clorofilas A y B y los carotenoides en enero, expresados en términos de peso fresco, fueron de 1,1, 0,4 y 0,6  $\mu\text{mol/g}$  respectivamente, mientras que en términos de superficie fueron de 0,4, 0,1 y 0,2  $\text{mmol/m}^2$  respectivamente. La relación clorofila A/B fue significativamente superior al inicio y al final de la estación de crecimiento con respecto a los meses de enero y febrero (**Tablas II.3.2-3**). La relación peso/superficie foliar aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) con el mes (0,030 a 0,034, respectivamente), siendo máxima en febrero.

Por último, en la estación de crecimiento 2009/10 las hojas presentaron mayores contenidos de clorofilas A y B con respecto a 2008/09 expresados tanto en términos de peso fresco (**Tabla II.3.2**) como de superficie foliar (**Tabla II.3.3**), mientras que el contenido de carotenoides no varió significativamente entre ambas estaciones de crecimiento en términos de  $\mu\text{mol/g}$ . Así, los contenidos de las clorofilas A y B en 2009/10 expresados en términos de peso fresco fueron de 1,1 y 0,4  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente, mientras que en términos de superficie fueron de 0,4 y 0,1  $\text{mmol/m}^2$ , respectivamente. La relación peso/superficie foliar aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) con la estación de crecimiento (0,031 a 0,033, respectivamente), siendo máxima en 2009/10.

Se encontraron interacciones significativas entre los factores estudiados y para todos los pigmentos (**Tablas II.3.2-3, Fig. II.3.3-5**), donde los contenidos de pigmentos foliares en los tratamientos con fertilizante bajo distinto régimen de irradiación lumínica tuvieron una variación en su comportamiento a lo largo de los meses y en las dos estaciones de crecimiento. La clorofila A varió significativamente entre los niveles de fertilización en alta intensidad de luz (0,21 a 0,34  $\text{mmol/m}^2$ ), mientras que dichas diferencias fueron menores en intensidad de luz media y legaron a ser mínimas en baja intensidad de luz (0,39 a 0,42  $\text{mmol/m}^2$ ) (**Fig. II.3.3A**). La misma tendencia se observó para la clorofila B y los carotenoides (**Fig. II.3.4A y II.3.5A**). La clorofila A varió significativamente entre los meses en intensidad de luz alta (0,21 a 0,29  $\text{mmol/m}^2$ ), con un pico en el mes de enero (0,33  $\text{mmol/m}^2$ ), mientras que en intensidad de luz baja la clorofila A permaneció constante a partir de enero (**Fig. II.3.3B**). La misma tendencia se observó para la clorofila B y los carotenoides (**Fig. II.3.4B y II.3.5B**). Si bien los

### **Nutrientes y pigmentos foliares**

contenidos de clorofilas A y B presentaron diferencias entre los años y en las diferentes intensidades luz (**Fig. II.3.3C y II.3.4C**), el contenido de carotenoides sólo varió entre ambas estaciones de crecimiento en media intensidad de luz (**Fig. II.3.5C**).

**Nutrientes y pigmentos foliares**

**Tabla II.3.2.** Pigmentos ( $\mu\text{mol/g}$  PF) en las hojas de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización, el mes y la estación de crecimiento como factores principales y la clorofila A (A), clorofila B (B), carotenoides (CR) y la relación clorofila A/clorofila B (A/B) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>CR</b>	<b>A/B</b>
<i>A = intensidad de luz</i>				
Baja	1,338a	0,477a	0,649a	2,812b
Media	0,942b	0,315b	0,523b	3,040a
Alta	0,764c	0,248c	0,479c	3,075a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>				
0	0,891c	0,312c	0,510c	2,950b
1	1,024b	0,343b	0,540b	3,006a
2	1,129a	0,383a	0,601a	2,972ab
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,017
<i>C = mes</i>				
Noviembre	0,766c	0,251c	0,496c	2,998a
Diciembre	1,044b	0,344b	0,579ab	3,030a
Enero	1,145a	0,397a	0,605a	2,918b
Febrero	1,124a	0,396a	0,561b	2,879b
Marzo	0,995b	0,346b	0,511c	3,053a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>D = estación de crecimiento</i>				
2008/09	0,959b	0,319b	0,552	2,987
2009/10	1,071a	0,374a	0,549	2,965
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,7070	0,1706
<i>Interacciones A x B x C x D (p)</i>	<0,001	0,003	<0,001	<0,001

$p = \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

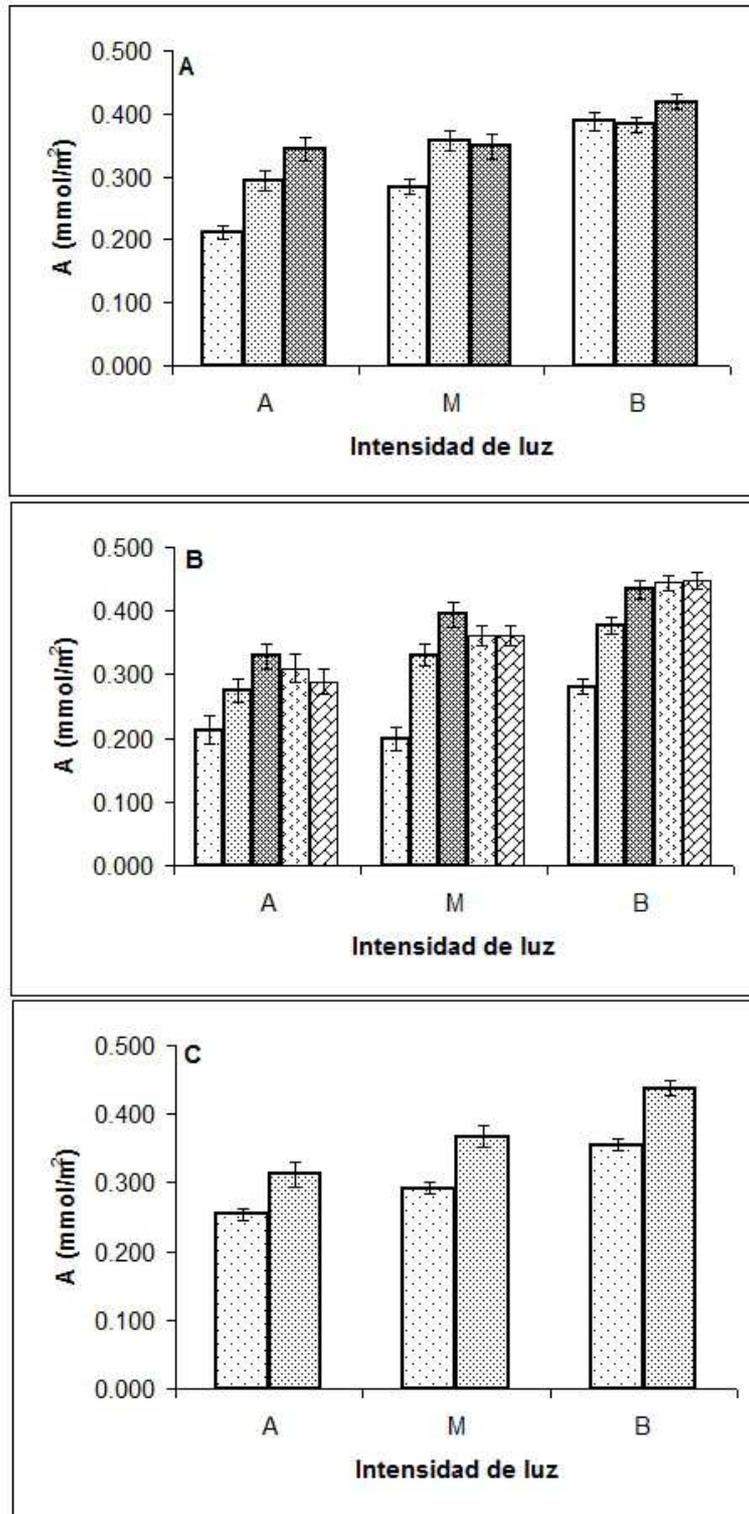
**Nutrientes y pigmentos foliares**

**Tabla II.3.3.** Pigmentos (mmol/m<sup>2</sup>) en las hojas de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, la concentración de fertilizante, el mes y la estación de crecimiento como factores principales y la clorofila A (A), clorofila B (B), carotenoides (CR) y la relación clorofila A/clorofila B (A/B) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>CR</b>	<b>A/B</b>
<i>A = intensidad de luz</i>				
Baja	0,397a	0,142a	0,192a	2,856b
Media	0,323b	0,108b	0,183b	3,087a
Alta	0,283c	0,092c	0,176b	3,123a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>				
0	0,294c	0,101c	0,171c	2,996b
1	0,345b	0,115b	0,183b	3,052a
2	0,370a	0,126a	0,197a	3,018ab
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,017
<i>C = mes</i>				
Noviembre	0,231c	0,076d	0,150c	3,045a
Diciembre	0,328b	0,108c	0,183b	3,0780a
Enero	0,385a	0,133a	0,206a	2,924b
Febrero	0,372a	0,131ab	0,186b	3,101b
Marzo	0,366a	0,123b	0,193b	3,053a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>D = estación de crecimiento</i>				
2008/09	0,300b	0,099b	0,175b	3,033
2009/10	0,372a	0,128a	0,192a	3,011
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,170
<i>Interacciones A x B x C x D (p)</i>	<0,001	<0,001	0,329	<0,001

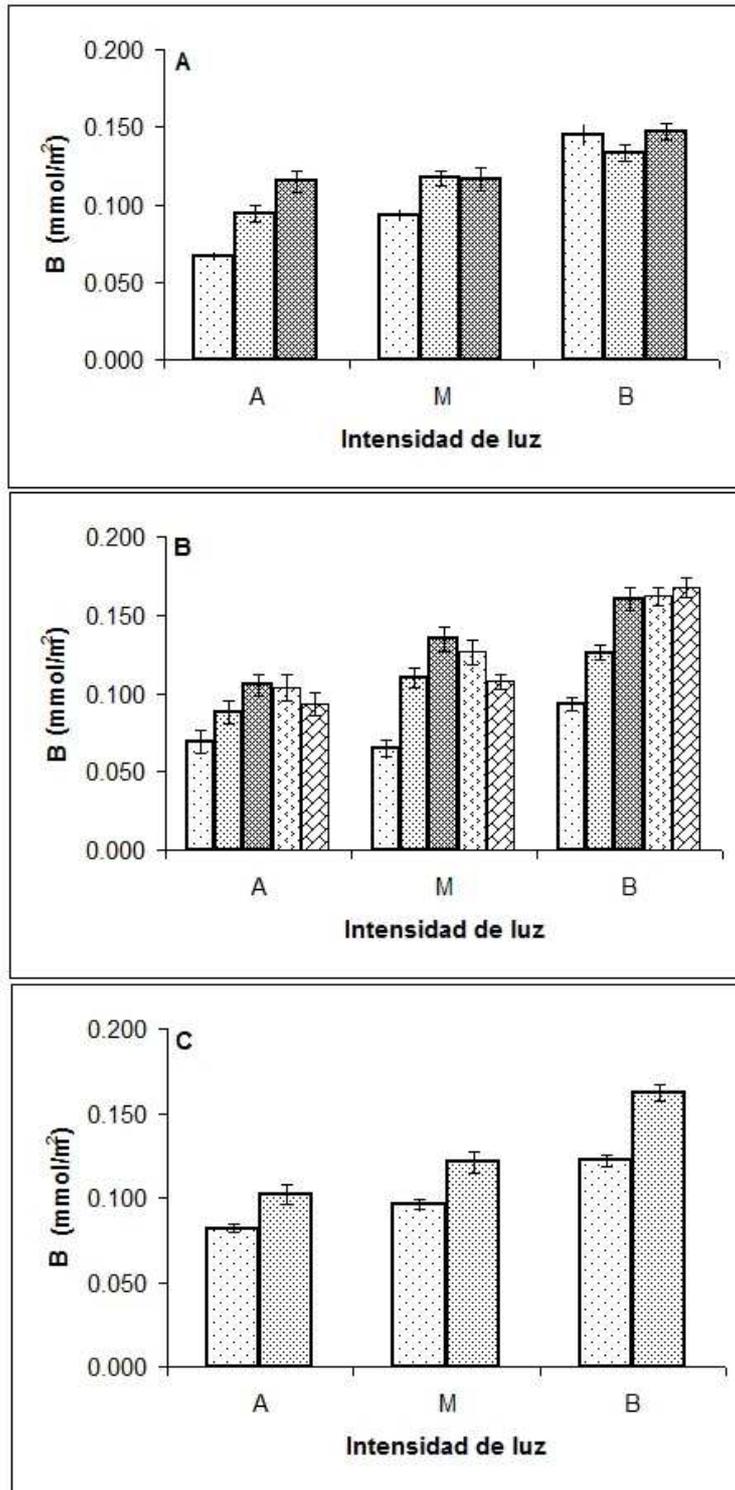
*p* = ≤ 0,05. Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a *p* ≤ 0,05.

Nutrientes y pigmentos foliares



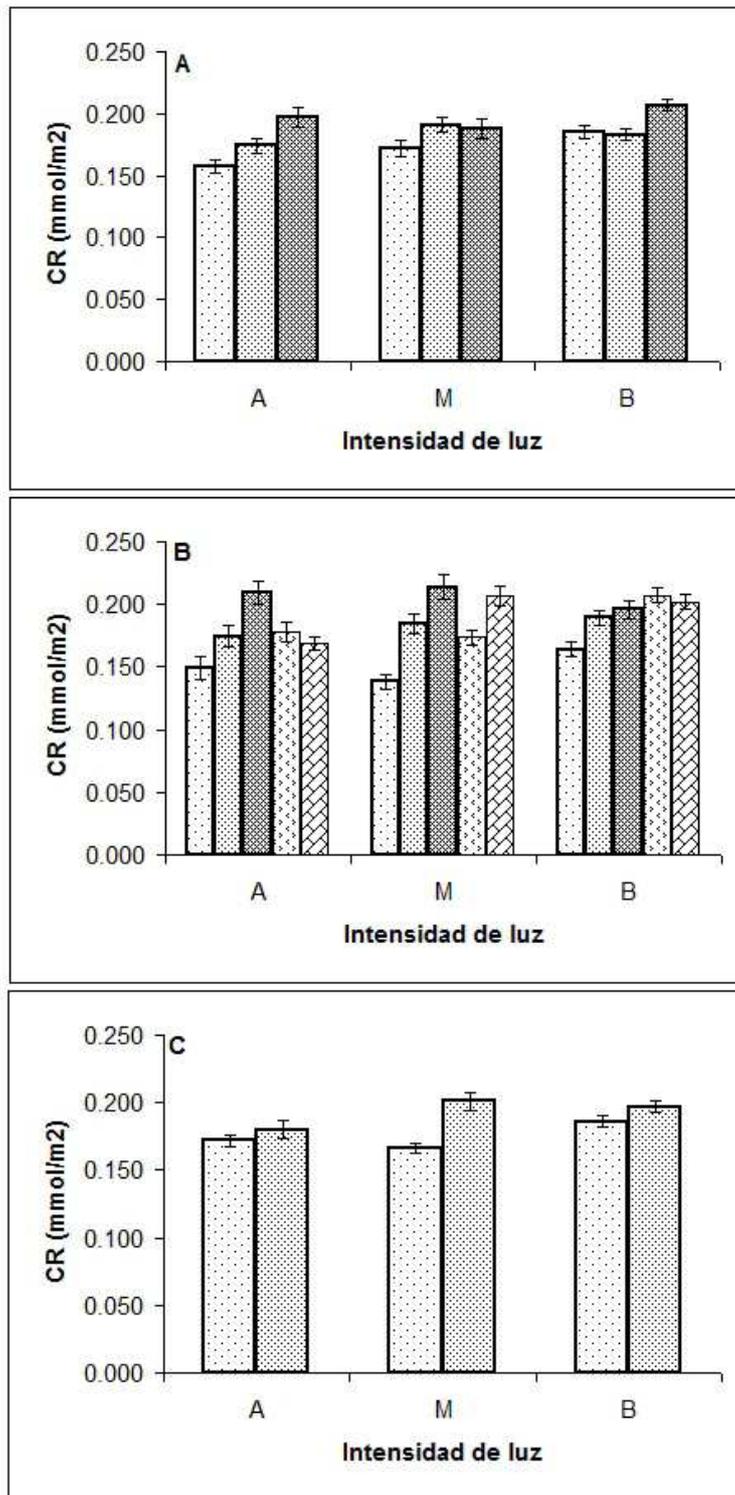
**Figura II.3.3.** Contenido foliar de clorofila A (A) en *B. microphylla*, mostrando las interacciones en **A** entre la intensidad de luz y el nivel de fertilización 0 (·), 1 (·) y 2 (·), en **B** entre la intensidad de luz y el mes (noviembre (·), diciembre (·), enero (·), febrero (·) y marzo (·)), y en **C** entre la intensidad de luz y la estación de crecimiento (2008/09 (·), y 2009/10 (·)). Las barras representan ± error estándar de la media.

Nutrientes y pigmentos foliares



**Figura II.3.4.** Contenido foliar de clorofila B (B) en *B. microphylla*, mostrando las interacciones en **A** entre la intensidad de luz y el nivel de fertilización 0 (·), 1 (··) y 2 (···), en **B** entre la intensidad de luz y el mes (noviembre (·), diciembre (··), enero (···), febrero (···) y marzo (···)), y en **C** entre la intensidad de luz y la estación de crecimiento (2008/09 (·), y 2009/10 (··)). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.

Nutrientes y pigmentos foliares



**Figura II.3.5.** Contenido foliar de carotenoides (CR) en *B. microphylla*, mostrando las interacciones en **A** entre la intensidad de luz y el nivel de fertilización 0 (· · ·), 1 (· · · ·) y 2 (· · · · ·), en **B** entre la intensidad de luz y el mes (noviembre (· · ·), diciembre (· · · ·), enero (· · · · ·), febrero (· · · · · ·) y marzo (· · · · · · ·), y en **C** entre la intensidad de luz y la estación de crecimiento (2008/09 (· · ·), y 2009/10 (· · · ·)). Las barras representan ± error estándar de la media.

**DISCUSIÓN**

## Nutrientes y pigmentos foliares

### Contenido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio foliar

El contenido de nutrientes en los tejidos foliares, raíces o tallos, está relacionado a los procesos fisiológicos asociados a la respiración, la fotosíntesis, y los procesos de absorción de nutrientes minerales y agua (Marschner, 1995), absorción que a su vez es particularmente influenciada por la combinación de los factores ambientales como el agua en el suelo (Austin y Sala, 2002; Peri et al., 2008) y disponibilidad de luz (Larcher, 2003).

El contenido de carbono, nitrógeno y potasio foliares y la relación carbono/nitrógeno en *B. microphylla* pudo correlacionarse con la intensidad de luz y la temperatura del aire y del suelo, siendo el carbono y la relación carbono/nitrógeno mayores en intensidad de luz alta. Estos resultados no coinciden con los encontrados para plántulas de *Nothofagus pumilio* creciendo en diferentes intensidades de luz (Soler Esteban et al., 2011), en donde el mayor contenido de carbono se obtuvo en plántulas crecidas en intensidad de luz baja, hecho que podría explicarse por un lado por el estrés de las plantas bajo condiciones de intensidad de luz baja que puede afectar la cantidad de dióxido de carbono que ingresa a través de la apertura estomática, alterando la relación entre los nutrientes fijados (Kendrick y Kronenberg, 1994; Larcher, 2003; Baquedano y Castillo, 2006), y por el otro porque el patrón de absorción de nutrientes, asimilación y partición de fotoasimilados puede ser distinto al de *B. microphylla* por tratarse de plántulas en la fase juvenil sin capacidad de cumplimentar el desarrollo i.e. floración y fructificación.

Por otra parte, el contenido de nitrógeno fue mayor en baja intensidad de luz, hecho que estaría sugiriendo que el contenido de nitrógeno en plantas crecidas en intensidad de luz baja estaría en exceso para los requerimientos fisiológicos y entonces representan un consumo de lujo (Evans et al., 2001) si se considera la producción de formaciones fructíferas y de frutos en las plantas (CAPÍTULO 5, PARTE II). Ha habido también mayor tasa fotosintética, mayor fijación de CO<sub>2</sub> y aumentó el numerador en la relación C/N, mientras que a baja irradiancia sucedió lo contrario (CAPÍTULO 4, PARTE II). Estos resultados coinciden con los obtenidos para plántulas de *N. pumilio* que presentaron los mayores contenidos foliares de nitrógeno bajo un 26% de la intensidad de luz natural (Soler Esteban et al., 2011). Asimismo, en *Abies balsamea* creciendo bajo diferentes tratamientos de luz (10, 40, 70 y 100% de la intensidad de luz ambiental), el contenido de nitrógeno fue mayor (2,7%) bajo un 40% intensidad de luz (Evans et al., 2001). Al igual que lo encontrado para el nitrógeno, el contenido de potasio fue mayor en intensidad de luz baja, como también se encontró en plántulas de *N. pumilio* (Soler Esteban et al., 2011). El potasio estimula además la fijación de CO<sub>2</sub>, mejorando la fotosíntesis para aquellas plantas que crecen en

### **Nutrientes y pigmentos foliares**

intensidad de luz baja (Marschner, 1995). Este mineral, al igual que otros nutrientes como magnesio y calcio, se relaciona con la turgencia celular, la entrada de agua, la regulación del pH y la estructura celular (Marschner, 1995), disminuyendo su concentración cuando la disponibilidad de luz y contenido de agua en el suelo se incrementa, en forma similar a lo encontrado para *N. pumilio* (Soler Esteban et al., 2011). Si bien el fósforo no varió significativamente entre las distintas intensidades de luz, su contenido fue mayor en baja intensidad de luz, probablemente debido al fenómeno de consumo lujurioso descrito para el nitrógeno (Evans et al., 2001), mientras que en intensidades de luz media y alta se mantiene aproximadamente constante. Si bien el contenido de nitrógeno y potasio foliar se encuentra dentro de lo esperable (Peinemann, 1998), el contenido de fósforo en las hojas de las plantas bajo ensayo podría considerarse como bajo. Sin embargo, valores similares de contenido de fósforo fueron encontrados en las hojas de las plantas crecidas naturalmente en la población de origen ( $850 \pm 50$  ppm).

El contenido de nitrógeno, fósforo y potasio así como la relación de carbono/nitrógeno foliares se correlacionaron con el nivel de fertilización. El aporte de dosis crecientes de fertilizantes propició el aumento del contenido de nitrógeno foliar, coincidiendo con lo encontrado en *Abies balsamea* (Evans et al., 2011), al igual que los contenidos de fósforo y potasio. Cabe destacar que los contenidos de fósforo y potasio fueron superiores en la estación de crecimiento 2009/10 en relación a los obtenidos en la estación de crecimiento 2008/09, presentándose particularmente para el potasio un mayor contenido en las hojas de plantas de los tratamientos con baja intensidad de luz y fertilización en la estación de crecimiento 2009/10. Estos resultados podrían estar indicando que en dicha temporada dicho elemento estaría en exceso para los requerimientos fisiológicos y entonces representan un consumo de lujo (Evans et al., 2001) si se considera la producción de formaciones fructíferas y de frutos en las plantas (CAPÍTULO 5, PARTE II).

### **Contenido de pigmentos foliares**

Con relación a los procesos fotosintéticos controlados por la luz incidente, si bien es más apropiado usar el área foliar como un sistema de referencia para analizar los niveles de clorofila y carotenoides (Lichtenthaler et al., 2007), pudo observarse que al expresar los contenidos en relación al peso foliar se obtuvieron resultados similares. La síntesis de clorofila y carotenoides en las plantas está regulada por factores endógenos (por ejemplo la actividad enzimática) y exógenos (como la disponibilidad de nutrientes, agua y luz) durante los procesos de crecimiento y diferenciación (Gehring et al., 1977; Timko, 1998; Valladares et al., 2000). Los contenidos de los

### Nutrientes y pigmentos foliares

pigmentos foliares pudieron correlacionarse con la relación peso/superficie foliar, con la intensidad de luz y la temperatura del aire y del suelo al disminuir 1,7, 1,9 y 1,3 veces para clorofila A y B y carotenoides expresados por unidad de peso desde intensidad de luz baja a alta, lo que podría ser explicado tal vez a través de la destrucción de los pigmentos por foto-inhibición (Larcher, 2003; Zúñiga et al., 2006). Los contenidos de pigmentos foliares encontrados en *B. microphylla* están de acuerdo con aquellos reportados para diversas especies forestales (Valladares et al., 2000; Lee et al., 2003; Zúñiga et al., 2006; Lichtenthaler et al., 2007; Aranda et al., 2008; Soler Esteban et al., 2011). Los valores de la relación entre los contenidos de las clorofilas A/B en intensidad de luz alta (2,8–3,6) y en intensidad de luz baja (2,5–3,1) son característicos de las hojas de tipo sol y de sombra respectivamente (Damesin, 2003), los cuales fueron algo inferiores que las reportadas para especies de *Nothofagus* (Hogan et al., 1997; Lee et al., 2003; Torres Netto et al., 2005; Zúñiga et al., 2006). Los carotenoides son usualmente considerados por tener dos grandes funciones en la fotosíntesis. Ellos sirven como pigmentos accesorios recolectores de luz y además pueden actuar para proteger los pigmentos clorofílicos de la reacción de foto-oxidación destructiva perjudicial en alta irradiación lumínica (Valladares et al., 2000; Ort, 2001; Baquedano y Castillo, 2006; Lichtenthaler et al., 2007). Los resultados obtenidos en *B. microphylla* indicarían que actúan como pigmentos accesorios recolectores de luz ya que siguen la misma tendencia que las clorofilas, o sea su contenido es máximo en las hojas expuestas a intensidad de luz baja.

Los contenidos de los pigmentos en las hojas están cercanamente relacionados con los contenidos de los nutrientes en las hojas (Larcher, 2003), dada la composición química de los pigmentos (Timko, 1998), así como con los procesos fisiológicos relacionados (Damesin, 2003), hecho que explicaría los mayores contenidos de los pigmentos foliares en los tratamientos con fertilización con respecto a aquellos sin fertilización (las clorofilas A y B y los carotenoides aumentaron 1,3, 1,2 y 1,2 veces expresados por unidad de peso, respectivamente), afectando la formación de los cloroplastos (Field y Mooney, 1986) y su eficiencia fotosintética (Martínez Pastur et al., 2007), aunque estando influenciados por la intensidad de luz.

Por otra parte, se pudo observar una estrecha correlación entre el contenido de los pigmentos foliares y la presentación (el *timing*) de las fases fenológicas en los tratamientos con intensidad de luz alta y fertilización (CAPÍTULO 2, PARTE II), en donde la precocidad en la presentación de algunas fases vegetativas pudo haber favorecido la formación de pigmentos foliares. Además se observó una estrecha relación entre el contenido de los pigmentos foliares y la relación peso/superficie foliar, coincidiendo el máximo contenido de pigmentos con los máximos valores de esta

### **Nutrientes y pigmentos foliares**

relación observados en el mes de febrero. Una relación similar se observó entre la relación peso/superficie foliar entre las dos estaciones de crecimiento.

## **CONCLUSIONES**

El contenido de los nutrientes foliares carbono, nitrógeno, fósforo y potasio de las plantas de *B. microphylla* mostró cambios con la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento. Las hojas de las plantas cultivadas bajo intensidad de luz alta y con mayores temperaturas del aire y del suelo presentaron los mayores contenidos de carbono y relación carbono/nitrógeno, mientras que aquellas hojas de las plantas cultivadas con el nivel de fertilización 2 presentaron los mayores contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio. Las hojas de las plantas presentaron los mayores contenidos de fósforo y potasio en 2009/10.

El contenido de la clorofila A y B y carotenoides de las plantas de *B. microphylla* mostró cambios con la intensidad de luz, el nivel de fertilización, el mes y la estación de crecimiento. Las hojas de las plantas cultivadas bajo intensidad de luz alta y con mayores temperaturas del aire y del suelo presentaron la mayor relación clorofila A/B. Las hojas de las plantas cultivadas con el nivel de fertilización 2 presentaron los mayores contenidos de clorofila A, B y carotenoides, mientras que aquellas con el nivel de fertilización 1 presentaron la mayor relación clorofila A/B. Las hojas de las plantas presentaron los mayores contenidos de clorofila A, B y carotenoides en los meses de enero y febrero, mientras que a su vez estos valores fueron máximos en 2009/10. Se encontraron interacciones significativas entre los factores estudiados.

Las hojas de las plantas cultivadas bajo 100% de intensidad de luz y con 3,4 y 6,7 g de fertilizante presentaron los mayores contenidos de carbono (47,7%) y una relación clorofila A/B de 3,1 y 3,0 respectivamente.

Los cambios observados en los contenidos de nutrientes y pigmentos foliares de las plantas de *B. microphylla* se pudieron relacionar con las condiciones ambientales de los tratamientos y con los niveles de fertilización, y de manera consistente con la fenología de las plantas y la relación peso/superficie foliar, indicando que las plantas presentaron una capacidad de aclimatación en la composición foliar bajo las condiciones ensayadas.

## **CAPITULO 4**

### **ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA**

## **INTRODUCCIÓN**

La fotosíntesis es uno de los fenómenos fisiológicos más importantes en el crecimiento de las plantas (Kramer y Kozlowski, 1979; Taiz y Zeiger, 2006). La exposición de las plantas a diversas condiciones ambientales como la luz, la humedad y el nivel de nutrientes en el suelo puede modificar su actividad fotosintética (Field y Mooney, 1983; Lusk y del Pozo, 2002, Martínez Pastur et al., 2007) para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Existen algunos antecedentes en los cuales se ha observado un cambio en el ritmo de fotosíntesis en arbustos siempreverdes (Katahata et al., 2007; Muller et al., 2011; Shiflett et al., 2013) en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales. En *Berberis*, se ha estudiado previamente la adaptabilidad fisiológica de las hojas de las plantas frente a distintas intensidades de irradiación lumínica y disponibilidad de agua (Peri et al., 2011). En este sentido, también el conocimiento de los cambios en el ritmo fotosintético en respuesta a la intensidad de irradiación lumínica y a la fertilización resultaría de interés para correlacionar aquellos cambios con diversas variables morfosiológicas y bioquímicas, y en última instancia con el crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas de *B. microphylla*.

## **Hipótesis**

La actividad fotosintética y la tasa de respiración oscura de las hojas de las plantas de *B. microphylla* son afectadas por la intensidad de luz, la temperatura, el nivel de fertilización y las estaciones de crecimiento.

## **Objetivo**

Evaluar la variación en la actividad fotosintética y la tasa de respiración oscura de las hojas de las plantas de *B. microphylla* cultivadas bajo diferentes intensidades de luz y niveles de fertilización a lo largo de las estaciones de crecimiento 2008/09 y 2009/10.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Los factores principales que se consideraron fueron: la intensidad de luz (baja, media y alta), el nivel de fertilización (0, 1 y 2), el mes (noviembre, enero y marzo) y la estación de crecimiento (2008/09 y 2009/10). A mediados de cada mes se eligieron al azar 5 plantas por tratamiento para realizar las mediciones en aquellas nuevas hojas crecidas en la estación de crecimiento en la porción medial de los ramos formados en la estación de crecimiento anterior, y expuestas a la luz (sin el efecto del sombreado por otras hojas). Las hojas se colocaron en la cámara foliar de un analizador de gases (Modelo S151—Qubit Systems, Kingston, Ontario, Canadá) ubicado en un laboratorio con condiciones controladas (12–15,2 °C), en completa oscuridad y después de 8-12 horas de acostumbramiento de las plantas a las nuevas condiciones ambientales. El flujo respiratorio neto de CO<sub>2</sub> se registró usando el analizador que posee una cámara foliar de 9 cm<sup>2</sup> y un medidor de flujo térmico electrónico. El instrumento usa un sistema abierto que determina el flujo de CO<sub>2</sub> basado en medidas diferenciales de concentración de CO<sub>2</sub>. La temperatura en la cámara foliar fue de 18,7 ± 2,9 °C DS, mientras que la humedad relativa del aire fue de 42,3 ± 5,7% y la concentración de CO<sub>2</sub> de 252,1 ± 35,5 ppm. El aire fue ingresado desde el exterior y varió de acuerdo a las condiciones climáticas durante la estación de crecimiento. Para realizar las curvas de respuesta fotosintética a la luz, se ensayaron 10 niveles de irradiación fotónica (320-730 nm): 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 500, 750 y 1000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. En ensayos previos se incluyeron niveles superiores de irradiación fotónica hasta llegar a los 2000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, no encontrándose variaciones en los valores de las variables entre los 1000 y los 2000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Antes de realizar las mediciones, las hojas se expusieron durante 3 a 5 minutos a la condición de la cámara para que operasen los cambios de intensidad de luz en la nueva condición de equilibrio. Las mediciones de concentración de CO<sub>2</sub> se hicieron 500 veces por minuto y los datos se computaron cuando las concentraciones se estabilizaron al menos 150 veces con una variación de 1 ppm. Para cada curva, se obtuvo la tasa de respiración oscura (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), la eficiencia fotosintética (μmol CO<sub>2</sub> μmol DFFF<sup>-1</sup>, siendo DFFF la densidad de flujo de fotones fotosintéticos), la tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), el punto de compensación de la luz (μmol DFFF<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y el punto de saturación de la luz (μmol DFFF<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza de 4 vías, donde las medias se separaron a través del test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Cuando la intensidad de luz fue considerada como efecto principal, se encontraron diferencias significativas en las variables tasa de respiración oscura, tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz, punto de compensación de la luz y punto de saturación de la luz (**Tabla II.4.1**), con los valores mayores en intensidad de luz alta. La tasa de respiración oscura aumentó con la intensidad de luz desde  $-0,6$  a  $-1,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para intensidad de luz baja y alta respectivamente, mientras que la tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz aumentó desde  $1,9$  a  $2,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para intensidad de luz baja y alta respectivamente. A su vez, el punto de compensación de la luz aumentó con la irradiación de luz desde  $31,8$  a  $44,1 \mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , mientras que el punto de saturación de la luz aumentó desde  $274,1$  a  $390,9 \mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

El nivel de fertilización afectó significativamente al punto de saturación de la luz (**Tabla II.4.1**) siendo máximo con el nivel de fertilización 1 ( $365,6 \mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

El mes a lo largo de la estación de crecimiento afectó significativamente la tasa de respiración oscura, la eficiencia fotosintética, el punto de compensación de la luz y el punto de saturación de la luz (**Tabla II.4.1**). La tasa de respiración oscura fue máxima en noviembre y enero ( $-0,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), para luego descender en marzo ( $-0,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). La eficiencia fotosintética fue baja en noviembre ( $0,02 \mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol DFFF}^{-1}$ ) para ser máxima en enero ( $0,03 \mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol DFFF}^{-1}$ ) y permanecer constante hasta el fin de la estación de crecimiento. El punto de compensación de la luz fue más alto en noviembre ( $46,3 \mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), para luego descender en febrero y marzo ( $35,2$  y  $28,7 \mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). El punto de saturación de la luz descendió a lo largo de la estación de crecimiento ( $382,9$  a  $298,1 \mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Por último, en la estación de crecimiento 2009/10 las hojas presentaron mayores valores para la tasa de fotosíntesis neta y el punto de saturación de la luz, mientras que en 2008/09 lo presentaron para la tasa de respiración oscura y el punto de compensación de la luz. La tasa de respiración oscura fue superior en la estación de crecimiento 2008/09 con respecto a 2009/10 ( $-1,0$  y  $-0,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente), al igual que el punto de compensación de la luz ( $45,0$  y  $28,5 \mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente). La tasa de fotosíntesis neta fue mayor en la estación de crecimiento 2009/10 con respecto a la 2008/09 ( $2,4$  y  $1,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente), al igual que el punto de saturación de la luz ( $348,1$  y  $319,6 \mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente).

**Actividad Fotosintética**

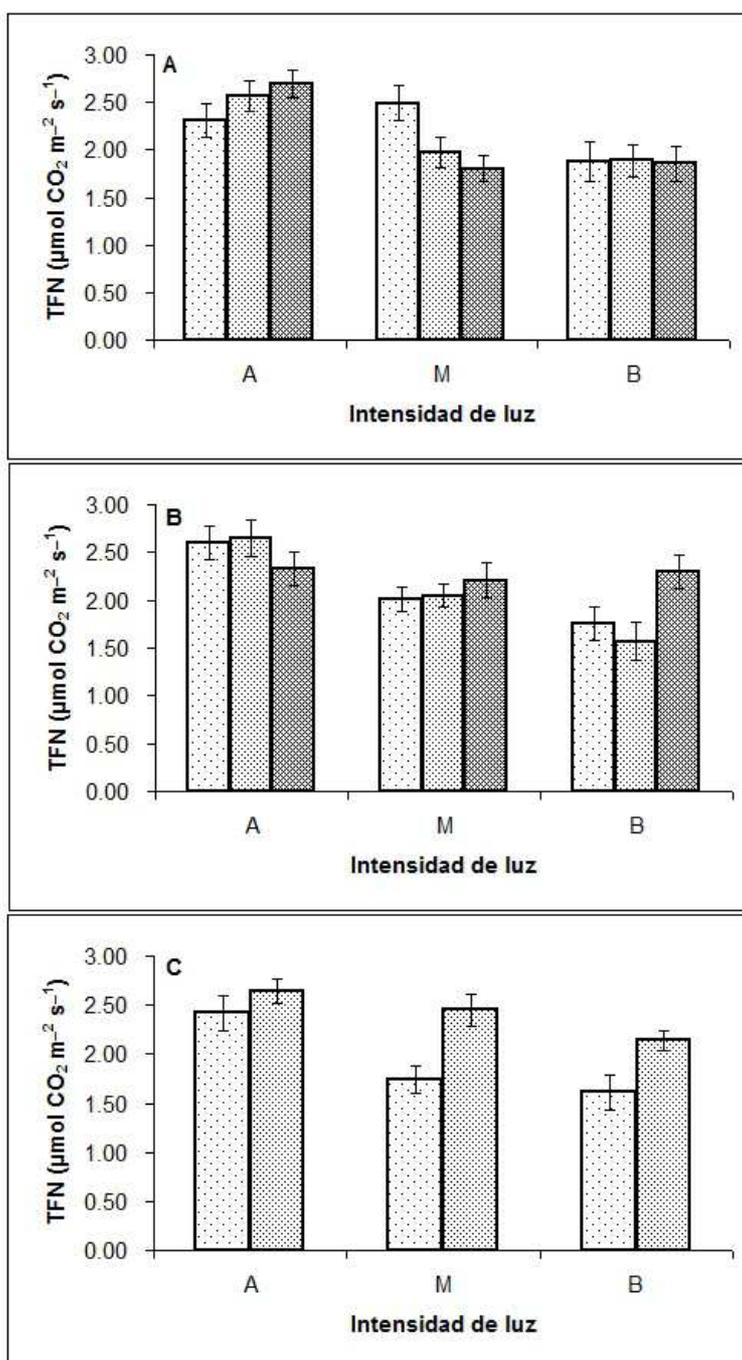
**Tabla II.4.1.** Flujo respiratorio neto de CO<sub>2</sub> en las hojas de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización, el mes y la estación de crecimiento como factores principales, y la tasa de respiración oscura ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (TRO), la eficiencia fotosintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol DFFF}^{-1}$ ) (EF), la tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (TFN), el punto de compensación de la luz ( $\mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (PCL) y el punto de saturación de la luz ( $\mu\text{mol DFFF}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (PSL) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>TRO</b>	<b>EF</b>	<b>TFN</b>	<b>PCL</b>	<b>PSL</b>
<i>A = intensidad de luz</i>					
Baja	-0,65a	0,025	1,87b	31,77b	274,07c
Media	-0,73a	0,024	2,09b	34,37b	336,67b
Alta	-1,03b	0,027	2,52a	44,13a	390,88a
<i>p</i>	<0,001	0,224	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>					
0	-0,81	0,026	2,22	36,47	335,69ab
1	-0,78	0,025	2,14	37,01	365,65a
2	-0,82	0,025	2,12	36,78	300,28b
<i>p</i>	0,827	0,824	0,650	0,980	<0,001
<i>C = mes</i>					
Noviembre	-0,95b	0,022b	2,12	46,30a	382,87a
Enero	-0,86b	0,027a	2,09	35,23b	320,60b
Marzo	-0,61a	0,026ab	2,28	28,73b	298,15b
<i>p</i>	<0,001	0,009	0,270	<0,001	<0,000
<i>D = estación de crecimiento</i>					
2008/09	-0,96b	0,025	1,92b	44,99a	319,63b
2009/10	-0,65a	0,025	2,40a	28,52b	348,12a
<i>p</i>	<0,001	0,914	<0,001	<0,001	0,031
<i>Interacciones A x B x C x D (p)</i>	0,351	0,021	0,263	0,399	0,402

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Se encontraron algunas interacciones significativas para los parámetros fotosintéticos medidos entre los factores principales (**Tabla II.4.1**, **Fig. II.4.1** y **II.4.2**). En intensidad de luz alta, la tasa de fotosíntesis neta aumentó con el nivel de fertilización, en intensidad de luz media disminuyó con el nivel de fertilización, y en intensidad de luz baja permaneció constante con el nivel de fertilización (**Fig. II.4.1A**). En intensidad de luz alta, la tasa de fotosíntesis neta varió a lo largo de la estación de crecimiento, siendo mayor en noviembre y enero con respecto a marzo, mientras que en media y baja intensidad de luz la tasa de fotosíntesis neta fue mayor en marzo (**Fig. II.4.1B**). Si bien la tasa de fotosíntesis neta fue mayor en la segunda estación de crecimiento para las tres intensidades de luz, estas diferencias fueron superiores en media y baja con respecto a alta intensidad de luz (**Fig. II.4.1C**). Otra interacción entre los factores estudiados se observó al comparar las curvas de respuesta fotosintética a la luz, por ejemplo durante el mes de enero (**Fig. II.4.2**). Los tratamientos con

intensidad de luz baja tuvieron una mayor tasa de fotosíntesis neta en irradiancia baja ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con relación a los tratamientos con intensidad de luz alta (**Fig. II.4.2A**). Por otra parte, en los tratamientos con fertilización, la tasa de fotosíntesis neta fue mayor en irradiancia baja ( $50\text{-}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mientras que en los tratamientos sin fertilización esta variable fue mayor en irradiancia alta ( $300\text{-}1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (**Fig. II.4.2B**).

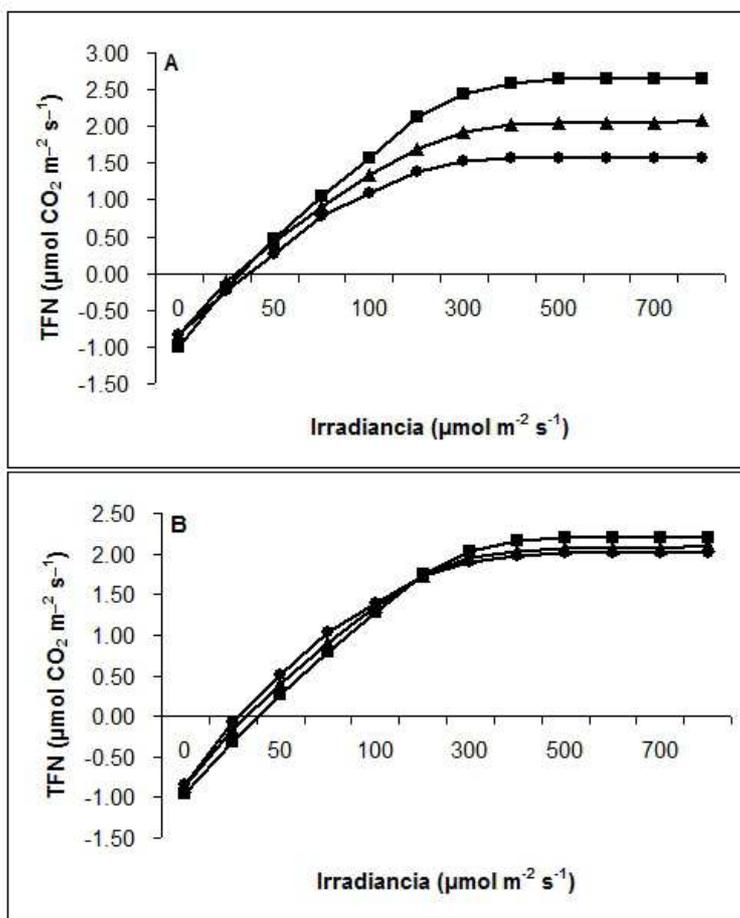


**Figura II.4.1.** Tasa de fotosíntesis neta (TFN) en hojas de *B. microphylla* saturadas de luz, mostrando la relación entre la intensidad de luz alta (A), medio (M) y baja (B) con

**Actividad Fotosintética**

---

el nivel de fertilización 0 (··), 1(···) y 2 (····) en **A**, con el mes (noviembre (··), enero (···) ) y marzo (····) en **B** y con la estación de crecimiento (2008/09 (··) y 2009/10 (···)) en **C**. Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura II.4.2.** Curvas de respuesta a la luz fotosintética elaboradas a partir de la tasa de fotosíntesis neta (TFN) en hojas de *B. microphylla* en el mes de enero, mostrando en **A** la intensidad de luz baja ( $\circ$ ), media ( $\blacktriangle$ ) y alta ( $\blacksquare$ ) y en **B** el nivel de fertilización 0 ( $\blacksquare$ ), 1 ( $\blacktriangle$ ) y 2 ( $\circ$ ). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.

## DISCUSIÓN

### Cambios en el flujo respiratorio neto de CO<sub>2</sub> con la intensidad de luz

La tasa de respiración oscura pudo correlacionarse con la intensidad de luz y con la temperatura del aire y del suelo y ello podría explicarse por la demanda de la energía metabólica que se incrementa en las plantas que crecen en ambientes iluminados. Esto sucede también en hojas aclimatadas en ambientes de sombra que muestran una respiración oscura más baja (Taiz y Zeiger, 2006). En *B. microphylla*, la tasa de respiración oscura fue 1,6 veces mayor en hojas bajo intensidad de luz alta con respecto a hojas sometidas a intensidad lumínica baja, mientras que en *Nothofagus pumillo* fue de 2 veces (Martínez Pastur et al., 2007) y en *Fagus* fue de 3 veces (Lichtenthaler et al., 1981). Las especies arbóreas heliófilas tienen características que favorecen el crecimiento en ambientes iluminados, las cuales incluyen una mayor tasa de crecimiento relativo y mayor respiración bajo diversas condiciones ambientales (Larcher, 2003; Kneeshaw et al., 2006; Niinemets, 2006).

Si bien la eficiencia fotosintética no estuvo relacionada significativamente con la intensidad de luz y la temperatura del aire y del suelo, sí lo estuvo la tasa de fotosíntesis neta al aumentar 1,3 veces con la intensidad lumínica desde baja a alta intensidad de luz, como se encontró en estudios previos para esta especie (Peri et al., 2011). En *B. thunbergii* se observó también un incremento en la tasa fotosintética desde 1,8-2,1 a 13,4  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a 40 y 608 DFFF<sup>-1</sup>  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente (Xu et al., 2007). Similares resultados se observaron además para *Nothofagus pumilio* (Martínez Pastur et al., 2007) y otras especies leñosas (Tognetti et al., 1998; Larcher, 2003). Los máximos valores de eficiencia fotosintética en alta intensidad de luz podrían relacionarse con el mayor contenido de nutrientes especialmente de carbono y con una mayor relación carbono/nitrógeno en las plantas en alta intensidad de luz (CAPÍTULO 3, PARTE II), y también es consistente con la mayor eficiencia en el uso de los nutrientes a través de la producción de mayor biomasa encontrada en las plantas en estas condiciones de luz, tal como se describe en el CAPÍTULO 5, PARTE II. Las plantas adaptadas a irradiancias elevadas invierten el N asimilado en la síntesis de Rubisco, mientras que las que crecen en la sombra lo hacen en pigmentos fotosintéticos como se mostró anteriormente (Taiz y Zeiger, 2006). Una actividad fotosintética y una tasa de respiración oscura baja están asociadas con un contenido de proteínas bajo en las hojas sombreadas (Chapin et al., 2011). Sin embargo, en *B. microphylla* si bien no se ha cuantificado el contenido de proteínas, se ha encontrado que las hojas crecidas bajo una intensidad de luz baja contenían el mayor nivel de nitrógeno por peso. Es probable que si el contenido de nitrógeno se hubiese expresado por área foliar, y siendo la relación peso y área foliar menor en intensidad

de luz baja, el contenido así expresado (sobre unidad de superficie) hubiese alcanzado valores menores en dicha condición lumínica.

Si bien las plantas de *B. microphylla* pueden crecer en ambientes con baja intensidad de luz - principal factor limitante para alcanzar mayores tasas de crecimiento - este estudio demuestra que aún los ambientes altamente iluminados siguen favoreciendo la tasa fotosintética neta con respecto a los ambientes menos iluminados, contrariamente a lo que ocurre en otras especies del bosque, como *Nothofagus pumillo*, donde un 26% de la luz natural incidente fue suficiente para obtener los mayores valores de tasa fotosintética (Martínez Pastur et al., 2007). Las plantas tolerantes al sol (no tolerantes a la sombra) tienen típicamente una mayor capacidad fotosintética cuando son expuestas a altas intensidades de luz que las plantas no tolerantes al sol (tolerantes a la sombra) (Griffin et al., 2004). Por otra parte, las plantas crecidas en baja intensidad de luz podrían haber sufrido fotoinhibición cuando fueron sometidas a altas irradiancias.

Ambos, el punto de compensación de la luz y el de saturación de la luz estuvieron relacionados con la intensidad lumínica, aumentando con la misma. En *B. microphylla*, se encontró un incremento de 1,4 veces para el punto de compensación de la luz y el de saturación de la luz en hojas bajo condiciones de intensidad de luz alta con respecto a intensidad de luz baja, mientras que para *Nothofagus pumillo* fue de 2,4 y 1,7 veces, respectivamente (Martínez Pastur et al., 2007). Para *Fagus* se encontraron valores similares (Lichtenthaler et al., 1981). Mientras que el punto de compensación de la luz se pudo relacionar con la tasa de respiración oscura, el punto de saturación de la luz se podría relacionar con la intensidad de luz debido a que las estructuras fotosintéticas formadas bajo alta intensidad de luz son más eficientes en el uso de la luz.

### **Cambios en el flujo respiratorio neto de CO<sub>2</sub> con el nivel de fertilización**

Si bien para la tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz no se encontraron diferencias entre los distintos niveles de fertilización, sí se observó la presencia de interacciones con la intensidad de luz. En condiciones de intensidad de luz alta la tasa de fotosíntesis neta aumentó con los niveles de fertilización desde 2,3 a 2,7  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , en media intensidad de luz la tasa de fotosíntesis neta disminuyó con el nivel de fertilización desde 2,5 a 1,8 y  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , y en baja intensidad de luz se mantuvo constante alrededor de 1,9  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . La relación directa encontrada entre el nivel de fertilización y la tasa de fotosíntesis neta en *B. microphylla*, también se había observado en diferentes cultivares de *Vitis vinifera* (Tisdale et al., 1985; Conradie y Saayman, 1989). Los máximos valores de la tasa de

fotosíntesis neta podrían relacionarse con un mayor empleo de nitrógeno en diferentes proteínas relacionadas con la fotosíntesis tales como la RuBisCO y las de la antena colectora de luz (Field y Mooney, 1986), hecho que es consistente con una mayor concentración de nitrógeno en las hojas provenientes de los tratamientos con fertilización (CAPÍTULO 3, PARTE II).

### **Cambios en el flujo respiratorio neto de CO<sub>2</sub> a lo largo de la estación de crecimiento**

La tasa de respiración oscura pudo correlacionarse con la variación de las temperaturas y con la relación peso/superficie de las hojas a lo largo de la estación de crecimiento, siendo esta última variable máxima al comienzo y mediados de la estación de crecimiento (CAPÍTULO 3, PARTE II), para luego disminuir al final de la misma, cuando las temperaturas comienzan a disminuir y las hojas son más viejas. Estos resultados coinciden con lo informado por Kramer y Kozlowski (1979), quienes encontraron que en las hojas jóvenes la respiración es más alta que en las hojas viejas, dado que estas últimas contienen menos elementos fisiológicamente activos que las hojas más jóvenes. En plántulas de *Nothofagus pumilio*, la tasa de respiración oscura también alcanzó su máximo valor en noviembre ( $-1,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y luego decreció a lo largo del verano (Martínez Pastur et al., 2007), mientras que en *Litchi chinensis*, un árbol siempreverde, esta tasa disminuyó con la expansión de las hojas ( $6$  y  $2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Hieke et al., 2002).

La eficiencia fotosintética estuvo relacionada con la variación de las temperaturas y con la relación peso/superficie de las hojas a lo largo de la estación de crecimiento. Por un lado fue máxima a mediados de la estación de crecimiento, cuando se dieron las mayores temperaturas y por el otro, cuando las hojas presentaron la mejor relación peso/superficie. Existen estudios en especies leñosas como *Litchi chinensis* que informaron que cuando las hojas estaban en proceso de despliegue y no poseían aún su tamaño final, no tenían sus cloroplastos totalmente activos, mientras que cuando las hojas alcanzaban un buen crecimiento podían lograr su máximo desempeño fotosintético (Hieke et al., 2002; Larcher, 2003).

Si bien en este estudio con *B. microphylla* la tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz no pudo relacionarse ni con la variación de las temperaturas ni con la relación peso/superficie de las hojas a lo largo de la estación de crecimiento, es de destacar para esta variable la existencia de interacciones entre los factores considerados. Así, mientras que en alta intensidad de luz, la mayor tasa de fotosíntesis neta se obtuvo en el mes de enero, en los ambientes con media y baja intensidad de luz los mayores valores de la tasa de fotosíntesis neta se obtuvieron en marzo. Esto

también podría relacionarse con la relación peso/superficie de las hojas. Esta relación en noviembre fue mayor en las hojas crecidas bajo alta intensidad de luz con respecto a media y baja intensidad de luz, a la vez que dicha relación aumentó con la estación de crecimiento (considerando ambas) en las hojas de alta intensidad de luz, mientras que en las hojas de media y baja intensidad de luz esta relación permaneció constante, lo que estaría de acuerdo con las variaciones de la tasa de fotosíntesis neta. Las variaciones encontradas en la tasa de fotosíntesis neta en esta experiencia también fueron observadas en estudios previos en plantas de esta especie y de *B. heterophylla* (Peri et al., 2011), en donde el máximo valor para la tasa de fotosíntesis neta se encontró cuando la hoja estaba totalmente expandida, declinando luego con el aumento de la edad de la hoja. Los máximos valores para la tasa de fotosíntesis neta en hojas totalmente expandidas podrían asociarse a incrementos en el número total de cloroplastos y en el número cloroplastos bien desarrollados (Leech y Baker, 1983). Un descenso posterior en la tasa de fotosíntesis neta se podría deber a una disminución en el contenido de clorofila, la concentración de las enzimas envueltas en la actividad fotosintética, y a la modificación en la composición de las membranas de los cloroplastos (Lin y Ehleringer, 1982).

El punto de compensación de la luz al igual que el punto de saturación de la luz estuvo relacionado con la variación de las temperaturas, disminuyendo a lo largo de la estación de crecimiento. Los mayores valores para el punto de compensación y de saturación de la luz al inicio de la estación de crecimiento pudieron deberse a un desarrollo incompleto de las estructuras fotosintéticas; luego el punto de compensación y de saturación de la luz fue disminuyendo a medida que las hojas aumentaban su edad. Las hojas no suelen comenzar a contribuir a la economía del carbono hasta tanto no alcanzan la mitad de su expansión, lo que ocurre más temprano en los árboles deciduos de clima templado con respecto a aquellos siempreverdes pero de zonas tropicales (Hieke et al., 2002). Por otro lado, con relación al punto de saturación de la luz, se puso de manifiesto nuevamente el efecto de la interacción con el factor estación de crecimiento: mientras que en 2008/09 el descenso del punto de saturación de la luz fue muy claro, en la siguiente temporada dicha tendencia no se visualizó.

### **Cambios en el flujo respiratorio neto de CO<sub>2</sub> con las estaciones de crecimiento**

La mayoría de los parámetros fotosintéticos variaron con las estaciones de crecimiento, hecho que podría correlacionarse por un lado con las condiciones ambientales y por el otro con la condición fisiológica de las plantas. Con respecto a las condiciones ambientales, tanto las temperaturas medias del aire como del suelo fueron

### **Actividad Fotosintética**

---

superiores en la estación de crecimiento 2008/09 con respecto a 2009/10, hecho que no se corresponde con las mayor actividad fotosintética observada en 2009/10. Cabe destacar que la mayoría de los parámetros fotosintéticos que variaron entre ambas estaciones de crecimiento lo hicieron para los tratamientos de media y baja intensidad de luz, a saber la tasa de fotosíntesis neta aumentó para media intensidad de luz desde 1,7 a 2,5  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , mientras que para baja intensidad de luz lo hizo desde 1,6 a 2,1  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , para 2008/09 y 2009/2010, respectivamente.

## **CONCLUSIONES**

Diversos parámetros que refieren a la actividad fotosintética de las hojas de las plantas de *B. microphylla* mostraron cambios con la intensidad de luz y el nivel de fertilización a lo largo de las estaciones de crecimiento 2008/09 y 2009/10.

Las hojas de las plantas cultivadas bajo intensidad de luz alta y con mayor temperatura del aire y del suelo presentaron los mayores valores de tasa de respiración oscura, tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz, punto de compensación de la luz y punto de saturación de la luz. Las hojas de las plantas cultivadas con el nivel de fertilización 1 presentaron los máximos valores del punto de saturación de la luz. Las hojas de las plantas presentaron la mayor tasa de respiración oscura, el punto de compensación de la luz y el punto de saturación de la luz en el mes de noviembre, mientras que la eficiencia fotosintética fue máxima en enero. Las hojas de las plantas presentaron la mayor la tasa de respiración oscura y punto de compensación de la luz en 2008/2009, mientras que la tasa de fotosíntesis neta y punto de saturación de la luz fueron mayores en 2009/10.

Las hojas de las plantas cultivadas bajo 100% de intensidad de luz alta y con 3,4 y 6,7 g de fertilizante por planta presentaron las mayores tasas de fotosíntesis neta (2,3 a 2,7  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Los cambios observados en los parámetros fotosintéticos de las plantas de *B. microphylla* se pudieron relacionar con las condiciones ambientales de los tratamientos y con los niveles de fertilización, y de manera consistente con la fenología de las plantas, la relación peso/superficie foliar, el contenido de carbono foliar y la relación de clorofila A/B en las hojas, indicando que las plantas presentan una capacidad de aclimatación fisiológica a dichas condiciones de crecimiento.

En las plantas arbustivas, la distribución de la luz afecta la ganancia de carbono de la planta entera afectando la disponibilidad de la DFFF para las hojas individuales dentro de la copa. Sin embargo, para una acabada comprensión del significado ecológico de la fotosíntesis como función de la DFFF, aún se requiere disponer de un conocimiento integrado de la anatomía foliar, la morfología y la arquitectura (ángulos de ramas y hojas) en los arbustos adultos de *B. microphylla*, ya que afectan la capacidad de intercepción de la luz y por consiguiente el nivel de fotosíntesis de la copa entera. La plasticidad fenotípica es una modificación en la adaptación que ajusta las plantas a las condiciones medias de la radiación durante la morfogénesis e incluye respuestas a corto y largo plazo.

## **CAPITULO 5**

### **PRODUCCION DE FRUTOS**

## INTRODUCCIÓN

La producción y distribución de la biomasa, el desarrollo del follaje y los reemplazos en la producción de los tejidos (i.e. balance entre la formación de nuevos tejidos y caída de hojas) en las plantas son determinantes para la intercepción de la luz y el balance de carbono (Walters y Reich, 1999, Lusk y Piper, 2007). El balance de carbono juega un rol importante en la tolerancia de las plantas a la falta de luz (Lusk, 2004), donde la adaptación a las diferentes condiciones ambientales es determinante. La variación en la disponibilidad de luz puede afectar la compartimentación de la biomasa producida (Aussenac, 2000), como se ha observado en diferentes especies leñosas como en *Fagus sylvatica* (Ammer, 2003, Reynolds y Frochot, 2003) y en *Nothofagus pumilio* (Lencinas et al., 2007), y por consiguiente el crecimiento de las mismas (Tognetti et al., 1998). De la misma manera, y como una consecuencia del balance de carbono, la variación en la disponibilidad de luz puede afectar la diferenciación floral y por ende el número y tipo de las formaciones fructíferas (Gil Albert Velarde, 2006). En particular, la reducción de la intensidad de luz y la modificación de su calidad mediante el empleo de mallas media sombra mejora el rendimiento y calidad de los frutos en algunas especies, como se ha encontrado en *Vaccinium* sp. (Lobos et al., 2013), aunque bajo ciertas condiciones se ha observado un efecto negativo (Retamales et al., 2008), probablemente debido a efectos en la inducción floral (Yáñez et al., 2009). En frambueso, la fructificación en las partes de la copa expuestas a más de 25% de luz incidente puede ser tan alta como 90% mientras que en las partes sombrías, sólo del orden de 30%-50%. La exposición directa de la fruta al sol hacia el final de la cosecha produce daño, el que está más asociado con la radiación ultravioleta que con la temperatura sobre 40°C (López, 2012).

Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes en el suelo también puede afectar la compartimentación de la biomasa producida (Huang et al., 2013), así como el número y tipo de las formaciones fructíferas (Gil Albert Velarde, 2006), influenciando el equilibrio fisiológico de las plantas, i.e estado de una planta adulta en el que se evidencia una armonía entre vigor y producción de frutos (Vozmediano, 1982).

La demanda de nutrientes de las especies de frutas pequeñas o frutas finas es muy variable; *Vitis vinífera* tiene un bajo requerimiento de nutrientes (Vance et al., 2013), al igual que *Vaccinium corymbosum* (Molina Jara, 2010), mientras que *Rubus idaeus* tiene requerimientos más importantes (López, 2012). Los efectos de la aplicación de fertilizantes sobre diversos parámetros de rendimiento y sobre la calidad de los frutos han sido muy contradictorios según las especies y niveles de los elementos aportados, como se ha observado en *Fragaria x ananassa* (World y Opstad, 2007) y en *Vitis vinífera* (Abd El-Razek et al., 2011). El nitrógeno es de extrema

importancia en las plantas debido a que es un componente de las proteínas y de los ácidos nucleicos. Un excesivo aporte de nitrógeno favorece el crecimiento de tallos y hojas en detrimento del rendimiento de frutos (Bidwell, 1974), aunque no necesariamente puede afectar el crecimiento de los frutos, siendo su aporte entonces una herramienta para el control del rendimiento (Abd El-Razek et al., 2011). Una reducción ligera en el aporte de nitrógeno aunque no en forma crítica, en relación al aporte de fósforo y potasio, usualmente resulta en una producción de semillas y frutos más efectiva en las plantas cultivadas (Bidwell, 1974). El fósforo, al igual que el nitrógeno, es un componente de los ácidos nucleicos y fosfolípidos entre otras sustancias, cumpliendo además un rol “estructural”. Por otra parte, cumple un rol importante en el metabolismo energético dada la alta energía derivada de la hidrólisis de pirofosfatos y diversos compuestos orgánicos del fósforo, la cual es usada para llevar a cabo reacciones químicas (Bidwell, 1974). Por lo expuesto, el contenido de fósforo en las plantas es determinante en el metabolismo y crecimiento de sus órganos. El potasio, a diferencia del nitrógeno y del fósforo, parece no tener un rol “estructural”, pero sí resulta muy importante como osmolito en el control de la fisiología de la apertura y cierre estomático, al soportar un fenómeno de cambio en la turgencia de las células estomáticas, de importancia en la absorción eficiente de CO<sub>2</sub> atmosférico y control de la pérdida de agua foliar por transpiración, por ello manteniendo un turgor foliar óptimo para el metabolismo celular (Taiz y Zeiger, 2006). Otro rol del potasio es el “catalítico”, i.e. como partícipe necesario en diversas reacciones químicas, como las inherentes a la respiración y al metabolismo de los hidratos de carbono. El contenido de potasio en las plantas suele determinar el hábito de crecimiento de las mismas (deficiencias de potasio producen tallos con crecimientos arrosados) y tallos más cortos y débiles, con menor resistencia a patógenos (Bidwell, 1974). El nitrógeno y el potasio tienen además un rol determinante en la producción de yemas (Abd El-Razek et al., 2011).

En estudios previos realizados en *B. microphylla*, se observó que cerca del 70% de los frutos se forman en estructuras fructíferas crecidas en la estación de crecimiento anterior, llamadas “producciones” o “ramos” (Arena et al., 2003). Además, se ha observado que las plantas de *B. microphylla* propagadas vegetativamente por rizomas comienzan a producir frutos al segundo año, o sea cuando las producciones ya tienen un año de edad. Sin embargo, no existen antecedentes sobre la variación de la producción de frutos ni sobre el número de formaciones productivas según su edad y ubicación en la planta, frente a cambios en la intensidad de luz y en el nivel de fertilización, por lo que su estudio es de gran interés para la estrategia de manejo de estos arbustos.

**Hipótesis**

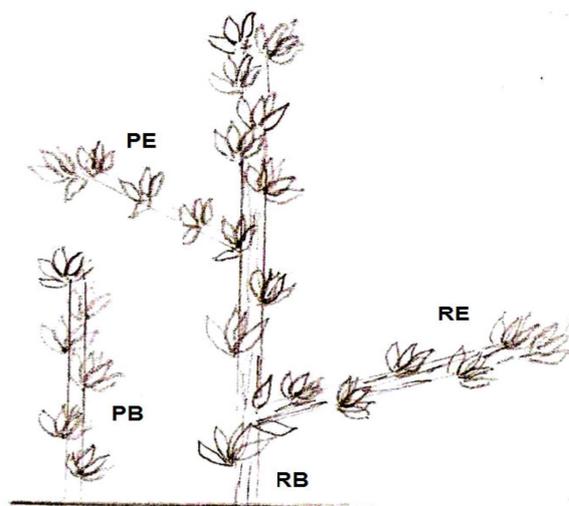
La producción de frutos y el número de formaciones productivas según su edad y ubicación en plantas de *B. microphylla* son afectados por la intensidad de luz y la temperatura, el nivel de fertilización y las estaciones de crecimiento.

**Objetivos**

Evaluar la producción de frutos y el número de formaciones productivas según su edad y ubicación en plantas de *B. microphylla* bajo diferentes intensidades de luz y niveles de fertilización durante las estaciones 2008/09 y 2009/10.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los factores principales que se consideraron fueron: la intensidad de luz (baja, media y alta), el nivel de fertilización (0, 1 y 2) y la estación de crecimiento (2008/09 y 2009/10). Durante la primera quincena de febrero de 2009 y 2010 (98 DPF para el tratamiento A2), se eligieron al azar 20 plantas por tratamiento para realizar las mediciones. El número y tipo de formaciones fructíferas (aquellas portadoras de frutos) se analizaron a través de diversos parámetros productivos indicados en la **Fig. II.5.1**, a saber: número de producciones con frutos por planta (brotes lignificados con dos estaciones de crecimiento), número de ramas con frutos por planta (brotes lignificados con más de dos estaciones de crecimiento), número total de producciones y ramas con frutos por planta, número de producciones y ramas estructurales (aquellas formadas en la copa de los arbustos) con frutos, número de producciones y ramas basales (aquellas formadas en la parte basal de la copa de los arbustos) con frutos, número de frutos por planta, peso fresco de los frutos por planta, número de frutos por producción o rama y peso fresco de los frutos por producción o rama.



**Figura II.5.1.** Esquema de la planta de *B. microphylla*. RB: rama basal; RE: rama estructural; PB: producción basal; PE: producción estructural.

Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza por 3 vías, donde las medias fueron separadas a través del test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

## **RESULTADOS**

El número total de producciones y ramas con frutos por planta, número de producciones con frutos por planta, número de ramas con frutos por planta, número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta y número de producciones y ramas basales con frutos por planta variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.5.1**), presentándose los valores máximos en intensidad de luz alta. Bajo condiciones de intensidad de luz baja y alta, el número total de producciones y ramas con frutos por planta fue de 0,0 y 6,1, respectivamente, mientras que el número de producciones con frutos por planta fue de 0,0 y 5,2, respectivamente, y el número de ramas con frutos por planta fue de 0,0 y 0,8, respectivamente. A su vez, el número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta fue de 0,0 y 5,1, para intensidad de luz baja y alta, respectivamente, mientras que el número de producciones y ramas basales con frutos por planta fue de 0,0 y 1,0, respectivamente.

Los valores en el número total de producciones y ramas con frutos por planta, número de ramas con frutos por planta y número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta variaron significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.5.1**), siendo máximos sus valores con el nivel de fertilización 2. Considerando los niveles de fertilización 0 y 2, el número total de producciones y ramas con frutos por planta fue de 2,4 y 4,5, respectivamente, mientras que el número de ramas con frutos por planta fue de 0,1 y 1,0, respectivamente, y al considerar la ubicación de las ramas, el número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta fue de 2,0 y 3,7, respectivamente.

Los valores en el número total de producciones y ramas con frutos por planta, número de producciones con frutos por planta, número de ramas con frutos por planta y número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta también variaron significativamente entre las estaciones de crecimiento (**Tabla II.5.1**), que resultaron ser máximos en la estación de crecimiento 2009/10. El número total de producciones y ramas con frutos por planta fue de 2,4 y 4,7, el número de producciones con frutos por planta fue de 2,3 y 3,6, y el número de ramas con frutos por planta fue de 0,1 y 1,0, al comparar la estación de crecimiento 2008/09 con 2009/10. Además, el número de producciones y ramas estructurales con frutos fue de 1,9 y 4,0 para 2008/09 y 2009/10 respectivamente.

No se encontraron interacciones significativas entre los tres factores principales en los parámetros descritos en la **Tabla II.5.1**.

Los parámetros relacionados al número de frutos y al peso fresco de los mismos (número de frutos por planta, peso fresco de frutos por planta y número de frutos por producción o rama) variaron significativamente con la intensidad de luz

(**Tabla II.5.2**), presentando los valores máximos en intensidad de luz alta. En intensidad de luz baja y alta, los valores de estas variables fueron: para el número de frutos por planta 0,0 y 15,7, mientras que en intensidad de luz media y alta los valores fueron: para el peso fresco de frutos por planta 3,2 y 5,2 g y para el número de frutos por producción o rama 2,1 y 2,4, respectivamente.

En relación al nivel de fertilización, las variables número de frutos por planta, peso fresco de frutos por planta y el peso de frutos por producción o rama también variaron significativamente (**Tabla II.5.2**), presentando los valores máximos en el nivel de fertilización 1. Considerando los niveles de fertilización 0 y 1, los valores registrados fueron: para el número de frutos por planta 5,7 y 10,3, mientras que para el peso fresco de frutos por planta 2,9 y 5,4 g, y para el peso de frutos por producción o rama 0,6 y 0,7 g, respectivamente. No hubo respuesta para el peso de frutos por planta y por producción o rama con el nivel de fertilización 2, disminuyendo de 0,7 a 0,5 g de peso de frutos por rama para el nivel de fertilización 1 y 2, respectivamente.

Los valores en el número de frutos por planta, peso fresco de frutos por planta, número de frutos por producción o rama y peso de frutos por producción o rama también variaron significativamente entre las estaciones de crecimiento (**Tabla II.5.2**), que resultaron ser máximos en la estación de crecimiento 2009/10. Los valores para las estaciones 2008/09 y 2009/2010 fueron: el número de frutos por planta 5,4 y 12,1, el peso fresco de frutos por planta 3,1 y 5,3 g, el número de frutos por producción o rama 1,9 y 2,6 y el peso de frutos por producción o rama 0,5 y 0,7 g, respectivamente.

No se encontraron interacciones significativas entre los tres factores principales en los parámetros descritos en la **Tabla II.5.2**.

**Producción de Frutos**

**Tabla II.5.1.** Crecimiento de las formaciones fructíferas de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales y número total de producciones y ramas con frutos por planta (NT), número de producciones con frutos por planta (NP), número de ramas con frutos por planta (NR), número de producciones y ramas estructurales con frutos (NE) y número de producciones y ramas basales con frutos (NB) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>NT</b>	<b>NP</b>	<b>NR</b>	<b>NE</b>	<b>NB</b>
<i>A = intensidad de luz</i>					
Baja	0,00c	0,00c	0,00b	0,00c	0,00b
Media	4,52b	3,71b	0,81a	3,66b	0,86a
Alta	6,07a	5,25 <sup>a</sup>	0,82a	5,08a	0,98a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>					
0	2,38b	2,24	0,14b	1,96b	0,42
1	3,74ab	3,25	0,49b	3,08ab	0,66
2	4,46a	3,47	0,99a	3,70a	0,76
<i>p</i>	0,003	0,050	<0,001	0,007	0,006
<i>C = estación de crecimiento</i>					
2008/09	2,39b	2,34b	0,06b	1,86b	0,53
2009/10	4,66a	3,64a	1,02a	3,96a	0,70
<i>p</i>	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	0,137
<i>Interacciones A x B x C (p)</i>	0,392	0,104	0,447	0,524	0,589

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

**Producción de Frutos**

**Tabla II.5.2.** Producción de frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales y número de frutos por planta (NF), peso fresco de frutos por planta (g) (PFF), número de frutos por producción o rama (NFPR) y peso de frutos por producción o rama (g) (PFFPR) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>NF</b>	<b>PFF</b>	<b>NFPR</b>	<b>PFFPR</b>
<i>A = intensidad de luz</i>				
Baja	0,00c	---	---	---
Media	10,56b	3,20b	2,07b	0,57
Alta	15,69a	5,19a	2,42a	0,65
<i>p</i>	<0,001	0,004	0,033	0,087
<i>B = nivel de fertilización</i>				
0	5,72b	2,93b	2,21	0,56b
1	10,34a	5,44a	2,48	0,73a
2	10,20a	4,22ab	2,06	0,53b
<i>p</i>	0,015	0,017	0,082	<0,001
<i>C = estación de crecimiento</i>				
2008/09	5,41b	3,08b	1,87b	0,54b
2009/10	12,10a	5,32a	2,62a	0,68a
<i>p</i>	<0,001	0,001	<0,001	0,002
<i>Interacciones A x B x C (p)</i>	0,092	0,201	0,529	0,461

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

## DISCUSIÓN

### Cambios en la producción de frutos con la intensidad de luz

El número de formaciones fructíferas por planta (producciones, ramas, estructurales y basales) pudieron relacionarse con la intensidad de luz, hecho que podría explicarse al considerar que la intensidad de luz es una variable ambiental importante en la naturaleza, dado su rol regulador de la fotosíntesis (Kramer y Kozlowski, 1979; Taiz y Zeiger, 2006) y por ende en la producción de fotoasimilados disponibles para el crecimiento y desarrollo como la producción de yemas florales y frutos (Corelli-Grappadelli, 2003). En *B. microphylla* se pudo comprobar que la tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz aumentó con la intensidad lumínica (CAPÍTULO 4, PARTE II), hecho que podría haber favorecido que el número total de producciones y ramas con frutos por planta, el número de producciones con frutos por planta, el número de ramas con frutos por planta, el número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta y el número de producciones y ramas basales con frutos por planta fueran 6,1, 5,2, 0,8, 5,1 y 1,0 veces mayor respectivamente en las plantas bajo intensidad de luz alta con respecto a intensidad de luz baja, pudiendo ello deberse a una mayor inducción y posterior diferenciación floral en intensidad de luz alta, tal como ocurriera en *Malus domestica* al estudiar la diferenciación floral bajo mallas media sombra luego de dos estaciones de crecimiento (Smit, 2007). Estos resultados ponen de manifiesto que la intensidad de luz baja es muy limitante para la formación de frutos. En las plantas, la distribución de la biomasa a diferentes órganos depende de factores bióticos (como la densidad de hojas de las plantas) y abióticos (como los ambientales, entre ellos disponibilidad de nutrientes en el suelo, agua y luz) (Aussenac, 2000; Huang et al., 2013). De acuerdo a la teoría de distribución óptima de la biomasa (Bloom et al., 1985), las plantas asignarían recursos a aquellos órganos que requieren los mayores recursos, y a menudo limitan el crecimiento. La teoría de distribución óptima de la biomasa ha sido aplicada en diversos estudios (McConnaughay y Coleman, 1999). Por ejemplo, las plantas asignaron más biomasa a las hojas en condiciones de baja intensidad de luz (Shiple y Meziane, 2002), y más biomasa a las raíces en suelos con baja disponibilidad de nutrientes o agua, mejorando así su capacidad de exploración del suelo por estos recursos (González et al., 2008, Mooney et al., 2007). En *B. microphylla*, el patrón de distribución de las formaciones fructíferas fue modificado en función de la intensidad de luz, observándose un mayor número de éstas a mayor intensidad de luz.

El número de frutos por planta, el peso fresco de los frutos por planta y el número de frutos por producción o rama también pudieron relacionarse con la intensidad de luz y ello podría explicarse de la misma manera que para las variables

descriptas en los párrafos anteriores. El número de frutos por planta fue 15,7 veces mayor en las plantas bajo condiciones de intensidad de luz alta con respecto a intensidad de luz baja, mientras que el peso fresco de los frutos por planta y el número de frutos por producción o rama fueron 1,6 y 1,2 veces mayor, respectivamente, en las plantas bajo condiciones de intensidad de luz alta con respecto a intensidad de luz media. Estos resultados coinciden parcialmente con los encontrados para *Vaccinium corymbosum* cv. Elliot (Lobos et al., 2013), en donde el rendimiento de las plantas que estaban bajo una media sombra negra se incrementó con la intensidad de la luz siendo máximo con un 75% de luz, para luego disminuir levemente con 100% de luz.

A su vez el comportamiento de estas variables se podría correlacionar con el mayor contenido de nutrientes como el carbono foliar y una mayor relación carbono/nitrógeno en las plantas cultivadas en alta intensidad de luz (CAPÍTULO 3, PARTE II).

### **Cambios en la producción de frutos con los niveles de fertilización**

El número total de producciones y ramas con frutos por planta, el número de ramas con frutos por planta y el número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta también pudieron relacionarse con el nivel de fertilización. Los niveles adecuados de nitrógeno *también* favorecieron el crecimiento vegetativo, la floración y la producción de frutos de *Vitis* (Abd El-Razek et al., 2011). Por su parte, el fósforo tiene un rol determinante en la etapa de la maduración de las semillas y frutas, y el potasio incide directamente sobre el rendimiento y la calidad de los frutos (Sozzi, 2007). Por otra parte, un excesivo aporte de nitrógeno afecta negativamente el rendimiento reduciendo la apertura de yemas y su fertilidad (Abd El-Razek et al., 2011).

En *B. microphylla* se pudo comprobar que la tasa de fotosíntesis neta en hojas saturadas de luz aumentaba 1,1 veces entre el nivel de fertilización 0 y 1 en condiciones de alta intensidad de luz (CAPÍTULO 4, PARTE II), hecho que pudo haber provocado que al menos en parte los parámetros productivos número total de producciones y ramas con frutos por planta, el número de ramas con frutos por planta y el número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta fueran 1,9, 7,1 y 1,9 veces mayor, respectivamente, en las plantas con un nivel de fertilización 2 con respecto a las plantas que no se fertilizaron. Cabe destacar el incremento en el número de ramas con frutos por planta con el nivel de fertilización 2 lo que debería ser tomado en cuenta a la hora de la planificación de un plan de poda en los arbustos.

En cuanto al número de frutos por planta, el peso fresco de los frutos por planta y el peso de frutos por producción o rama, estos parámetros también pudieron

correlacionarse con el nivel de fertilización y podría explicarse según lo descrito en el párrafo anterior, justificando que el número de frutos por planta, el peso fresco de los frutos por planta y el peso de frutos por producción o rama fueran 1,8, 1,9 y 1,3 veces mayor, respectivamente, en las plantas con un nivel de fertilización 1 con respecto a las plantas que no se fertilizaron. El efecto positivo de niveles crecientes de fertilización también se observó en *Aronia melanocarpa* (Jeppsson, 2000), *Vitis vinifera* (Abd El-Razek et al., 2011) y *Solanum melongena* (Nafiu et al., 2011).

A su vez el comportamiento de estas variables se podría relacionar con el mayor contenido foliar de nitrógeno, fósforo y potasio en las plantas que fueron fertilizadas (CAPÍTULO 3, PARTE II). Cabe destacar que un mayor aporte de fertilizantes en las plantas de *B. microphylla* ha provocado un mayor incremento en la producción de frutos en relación al incremento en la capacidad fotosintética medida por unidad de área foliar, lo que se podría asociar a lo descrito por Chapin et al. (2002) en relación al rol “estructural” del nitrógeno y del fósforo además del rol “funcional” que tienen en las plantas. Por otro lado, puede observarse que la producción de frutos fue máxima en el nivel de fertilización 1 tanto en intensidad de luz alta como en intensidad de luz media, pudiéndose relacionar estos resultados con lo descrito por la ley de incrementos decrecientes del rendimiento (Mitscherlich, 1906); a su vez, se puede notar que existen escasas diferencias en la producción de frutos entre los niveles de fertilización 1 y 2 en intensidad de luz alta, pero dichas diferencias se hacen mayores bajo la intensidad de luz media.

Las plantas cultivadas bajo 100 % de intensidad de luz y con 3,4 y 6,7 g de fertilizante por planta presentaron los mayores valores para el número de formaciones fructíferas (6,6 y 7,8, respectivamente), a la vez que los máximos valores de peso fresco de frutos por planta (6,5 y 5,7 g, respectivamente)

### **Cambios en la producción de frutos con las estaciones de crecimiento**

Los parámetros productivos número total de producciones y ramas con frutos por planta, número de producciones con frutos por planta, número de ramas con frutos por planta, y número de producciones y ramas estructurales con frutos por planta pudieron relacionarse con la estación de crecimiento. En parte la explicación está dada por la tasa de fotosíntesis neta que aumentó en 2009/10 con respecto a 2008/09 y en parte a que en ambas estaciones de crecimiento las plantas del ensayo aún no habían llegaron a su momento de equilibrio fisiológico, aumentando el número de brotes por planta con la estación de crecimiento y por lo tanto siendo la producción de frutos creciente durante los dos años de experimento (datos no mostrados). Por otro lado y volviendo a la teoría de distribución óptima de la biomasa, esta sugiere que la

distribución de la biomasa es independiente del tamaño de las plantas (Bloom et al., 1985). Sin embargo, Pino et al. (2002) y Ogawa (2003) encontraron que la mayoría de los patrones de distribución de biomasa son dependientes del tamaño, indicando que además de los factores bióticos y abióticos debe considerarse el tamaño de las plantas, coincidiendo con lo encontrado para *B. microphylla*, en donde la proporción de biomasa de frutos fue significativamente mayor en las plantas más grandes (2009/10).

En cuanto al resto de parámetros productivos considerados como número de frutos por planta, peso fresco de frutos por planta, número de frutos por producción o rama y peso de frutos por producción o rama, éstos también pudieron relacionarse con la estación de crecimiento, en forma similar a los anteriormente descritos. Cabe destacar el incremento en el número y en el peso fresco de frutos por planta en condiciones de media intensidad de luz en 2009/10, a la vez que con el nivel de fertilización 1, los que podrían ser responsables en gran parte de estos resultados.

## **CONCLUSIONES**

El número de formaciones fructíferas según su edad y ubicación en las plantas, así como la producción de frutos de las plantas de *B. microphylla* mostraron cambios con la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento. Las plantas cultivadas bajo intensidad de luz alta, con mayor temperatura del aire y del suelo y con los niveles de fertilización 1 y 2 presentaron el mayor número de formaciones fructíferas y producción de frutos. A su vez, estos parámetros fueron máximos en la estación de crecimiento 2009/10 con relación a 2008/2009.

Los cambios observados en las plantas de *B. microphylla* se pudieron relacionar con las condiciones ambientales de los tratamientos y con los niveles de fertilización, y de manera consistente con la fenología de las plantas, la relación peso/superficie foliar, el contenido de carbono foliar, la relación de clorofila A/B en las hojas y la tasa de fotosíntesis neta, indicando que las plantas presentan una capacidad de aclimatación morfológica a dichas condiciones de crecimiento.

## **CAPÍTULO 6**

### **CRECIMIENTO DE LOS FRUTOS**

## **INTRODUCCION**

La fisiología de la fructificación trae consigo cambios metabólicos a nivel de planta entera que últimamente se manifiestan en el crecimiento de los frutos hasta su madurez, y culminación de su ciclo biológico. Las tasas de crecimiento de los frutos varían extremadamente entre especies, según las prácticas culturales, entre los diferentes frutos en la misma copa y son dependientes de las condiciones ambientales, pudiendo además mostrar diferentes patrones de crecimiento.

Como se ha mencionado en el CAPÍTULO 4, PARTE II, ambas, la reducción de la intensidad de luz y la modificación de su calidad mediante el empleo de mallas media sombra, tienen la capacidad de afectar positivamente el rendimiento y la calidad de los frutos en *Vaccinium corymbosum* cv Elliot (Lobos et al., 2013). Sin embargo, en determinadas condiciones esas consecuencias no han sido tan claras (Retamales et al., 2008), probablemente por afectar la inducción floral (Yáñez et al., 2009). Además, la reducción de la intensidad de luz ha favorecido la producción de frutos de mayor tamaño con respecto a lo ocurrido en plena luz en *Vaccinium corymbosum* cv Elliot (Lobos et al., 2013) y en algunas variedades de *Malus domestica* (Smit, 2007).

Por otro lado, también se ha estudiado el efecto de la aplicación de fertilizantes sobre diversos parámetros de rendimiento y calidad de los frutos, con resultados muy contradictorios según las especies y niveles de los elementos aportados, como ha sido informado en los casos de la fructificación en *Fragaria x ananassa* (World y Opstad, 2007) y en *Vitis vinifera* (Abd El-Razek et al., 2011).

## **Hipótesis**

El crecimiento de los frutos de las plantas de *B. microphylla* es afectado por la intensidad de luz, la temperatura, el nivel de fertilización y las estaciones de crecimiento.

## **Objetivos**

Evaluar el crecimiento de los frutos producidos en plantas de *B. microphylla* bajo diferentes intensidades de luz y niveles de fertilización, durante las estaciones 2008/09 y 2009/10.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los factores principales que se consideraron fueron: la intensidad de luz (media y alta), el nivel de fertilización (0, 1 y 2) y la estación de crecimiento (2008/09 y 2009/10). A partir de la segunda quincena de noviembre y hasta la segunda quincena de febrero, se eligieron al azar 5 plantas por tratamiento y se cosecharon sus frutos para analizar el crecimiento durante las estaciones 2008/09 y 2009/10. Los parámetros que se registraron y evaluaron en los frutos fueron: peso fresco de los frutos, peso seco de los frutos (en estufa a 40 °C y durante 7-10 días, hasta alcanzar peso constante), peso seco como porcentaje del peso fresco de los frutos, diámetro ecuatorial y polar de los frutos (usando un calibre digital Mitutoyo Modelo 500-196, 150mm x 6" – 0.01 mm x 0.0005"), firmeza de los frutos (usando un penetrómetro digital Wagner Instruments Modelo FDI 2 [0,001 a 1 kgf], con puntas de 1 mm diámetro), peso fresco de las semillas por fruto, peso seco de las semillas por fruto, peso seco de las semillas por fruto como porcentaje del peso fresco, número de semillas por fruto y la relación entre el peso seco de las semillas por fruto y el peso seco de los frutos.

Con los datos obtenidos se hizo un análisis de la varianza de dos vías y las medias fueron separadas por el Test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

---

## **RESULTADOS**

### **Crecimiento de los frutos**

Las variables peso fresco de los frutos, el peso seco de los frutos, el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco, diámetro ecuatorial de los frutos, diámetro polar de los frutos y firmeza variaron significativamente durante el período de fructificación (**Tabla II.6.1**). El peso fresco de los frutos aumentó desde 26,1 mg durante la segunda quincena de noviembre hasta obtener la máxima biomasa de 324,8 mg durante la segunda quincena de febrero, mientras que el peso seco de los frutos aumentó desde 8,2 mg y hasta la máxima biomasa de 91,1 mg en el mismo período de tiempo, y el porcentaje del peso seco alcanzó un valor máximo de 28,4% durante la segunda quincena de febrero. Los diámetros ecuatorial y polar de los frutos también aumentaron desde la segunda quincena de noviembre hasta alcanzar los valores máximos de 8,5 mm y 8,8 mm respectivamente, durante la segunda quincena de febrero. En cuanto a la firmeza de los frutos, ésta fue máxima (0,33 kgf) en la segunda quincena de diciembre, disminuyendo hacia el fin del período de fructificación, con un valor de 0,17 kgf durante la segunda quincena de febrero.

Las variables de peso y diámetro (peso fresco de los frutos, el peso seco de los frutos, el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco, diámetro ecuatorial de los frutos y diámetro polar de los frutos) también variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.6.1**), alcanzando los valores máximos en alta intensidad de luz. El peso fresco de los frutos varió entre 158,7 y 216,6 mg para media y alta intensidad de luz respectivamente, y el peso seco de los frutos lo hizo entre 37,5 y 57,7 mg para media y alta intensidad de luz, respectivamente, mientras que el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco osciló entre 25,0 y 27,3% para media y alta intensidad de luz, respectivamente. El diámetro ecuatorial varió entre 5,9 y 6,8 mm para media y alta intensidad de luz, respectivamente, mientras que el diámetro polar lo hizo entre 7,2 y 7,3 mm para media y alta intensidad de luz, respectivamente.

Las variables mencionadas en el párrafo anterior también fueron afectadas significativamente por el nivel de fertilización (**Tabla II.6.1**). Los parámetros de peso fueron máximos con el nivel de fertilización 1 (205,0 mg, 53,6 mg y 27,1% peso fresco de los frutos, el peso seco de los frutos y el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco respectivamente). En cuanto al diámetro de los frutos, el diámetro ecuatorial también fue máximo para el nivel de fertilización 1 (6,5 mm), mientras que el diámetro polar fue para el nivel de fertilización 2 (7,6 mm), aunque sin presentar diferencias significativas con el nivel 1.

Los parámetros peso fresco de los frutos, peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco, diámetro ecuatorial de los frutos, diámetro polar de los frutos y firmeza variaron significativamente entre las estaciones de crecimiento (**Tabla II.6.1**). El peso fresco de los frutos fue de 196,7 y 178,6 mg para 2008/09 y 2009/10, respectivamente, mientras que el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco fue de 23,4 y 29,9% para 2008/09 y 2009/10, respectivamente. El diámetro ecuatorial fue de 6,6 y 6,1 mm para 2008/09 y 2009/10, respectivamente, mientras que el diámetro polar fue prácticamente similar: 7,5 y 7,4 mm para 2008/09 y 2009/10, respectivamente. La firmeza de los frutos fue de 0,26 y 0,28 kgf para 2008/09 y 2009/10, respectivamente.

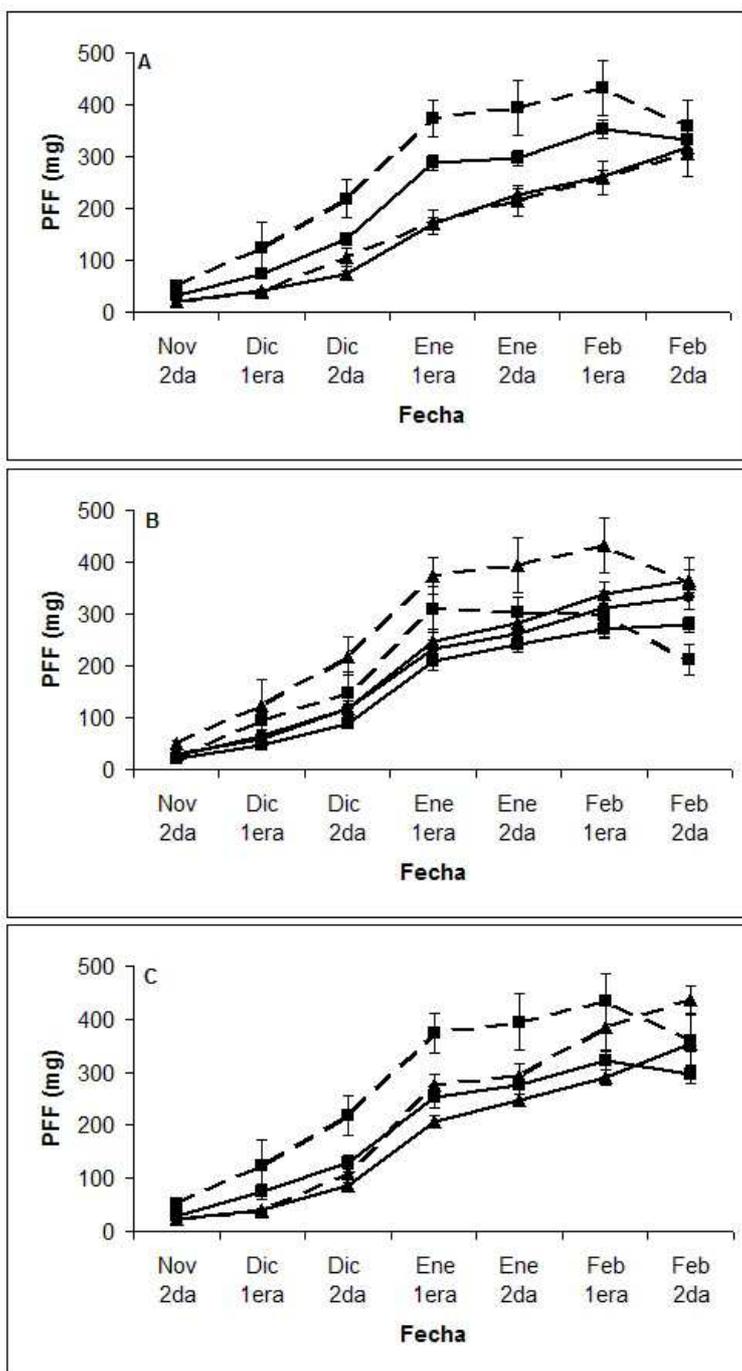
No se encontraron interacciones significativas en los parámetros descritos en la **Tabla II.6.1** entre los cuatro factores principales. Sin embargo, en alta intensidad de luz los frutos mostraron una fase de crecimiento rápido seguida por una fase de crecimiento lento en términos de materia fresca a lo largo de la fructificación, mientras que en media intensidad de luz no se observó este comportamiento. El tratamiento de alta intensidad de luz con el nivel de fertilización 1 mostró un comportamiento análogo al factor alta intensidad de luz, del mismo modo que lo hizo el tratamiento de media intensidad de luz con el nivel de fertilización 1, mostrando un comportamiento análogo al factor media intensidad de luz. (**Fig. II.6.1A**). En términos de materia seca, los frutos mostraron una fase de crecimiento lenta más atenuada (**Fig. II.6.2A**). Al comparar los niveles de fertilización, se pudo observar que el peso fresco de los frutos de las plantas fertilizadas presentaron un crecimiento final luego de una fase de reposo, crecimiento final apenas perceptible en los frutos de las plantas sin fertilización (**Fig. II.6.1B**), mientras que si se considera el peso seco de los frutos la tendencia es menos marcada (**Fig. II.6.2B**). De la misma manera, al comparar el crecimiento de los frutos durante la última parte del período de fructificación entre ambas estaciones de crecimiento, se observó que mientras en 2008/09 se presentó una fase de crecimiento lento seguida de un tenue crecimiento final, en 2009/10 no se observó dicho comportamiento y los frutos continuaron creciendo hasta el final del período de fructificación (**Fig. II.6.1C-2C**). En la **Fig. II.6.3** puede observarse la evolución del crecimiento de los frutos de *B. microphylla* obtenidos de las plantas cultivadas bajo intensidad de luz baja y alta y con los niveles de fertilización 0, 1 y 2.

**Crecimiento de los frutos**

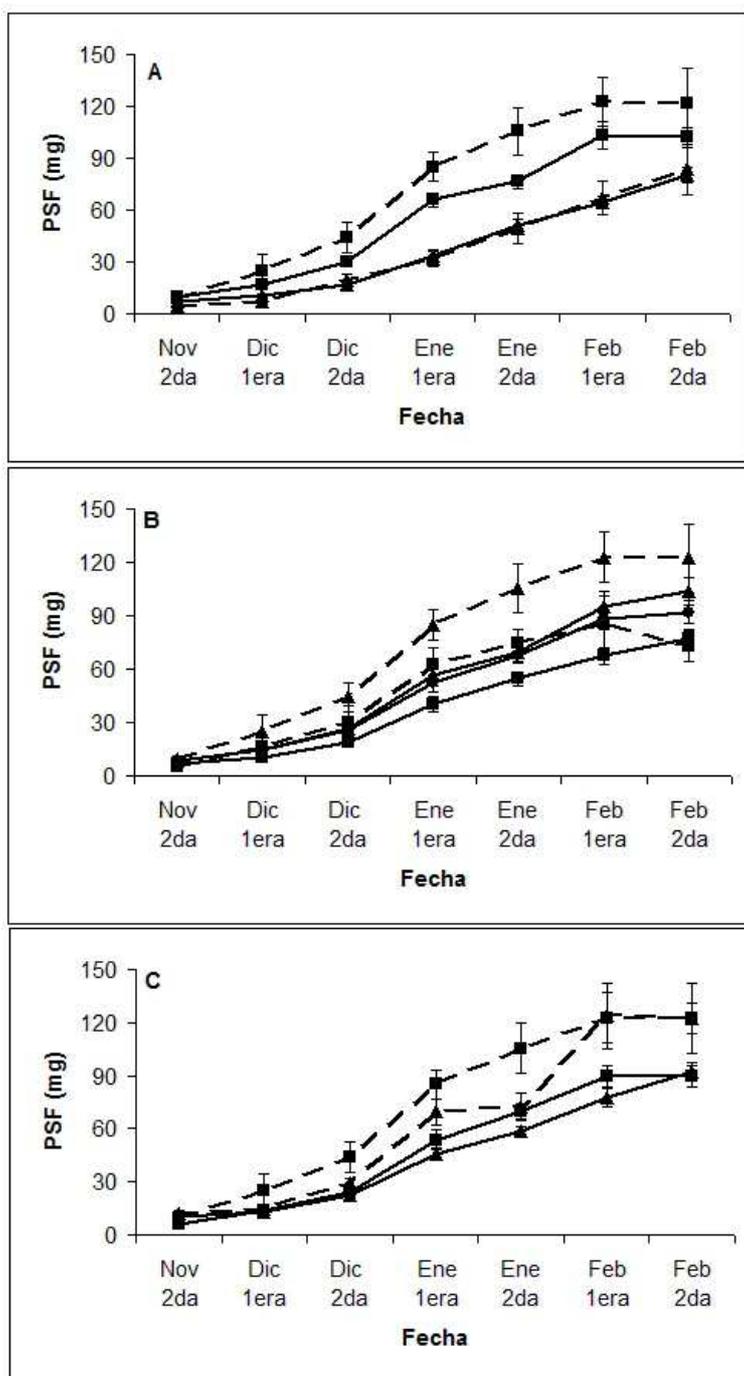
**Tabla II.6.1.** Crecimiento de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización, la fecha y la estación de crecimiento como factores principales y el peso fresco de los frutos (mg) (PFF), el peso seco de los frutos (mg) (PSF), el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco (%) (PSF%), el diámetro ecuatorial de los frutos (mm) (DE), el diámetro polar de los frutos (mm) (DP) y la firmeza (F) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>PFF</b>	<b>PSF</b>	<b>PSF%</b>	<b>DE</b>	<b>DP</b>	<b>F</b>
<i>A = intensidad de luz</i>						
Media	158,73b	37,55b	25,04b	5,93b	7,17b	0,27
Alta	216,58a	57,68a	27,35a	6,79a	7,34a	0,27
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,280
<i>B = nivel de fertilización</i>						
0	165,45b	39,44b	25,08b	6,10b	7,31b	0,27
1	204,96a	53,62a	27,10a	6,53a	7,45a	0,26
2	192,49a	49,78a	26,40a	6,46a	7,60a	0,27
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,1845
<i>C = fecha</i>						
Nov 2 <sup>da</sup>	26,11d	8,18e	33,19a	3,11e	5,23e	0,29bc
Dic 1 <sup>era</sup>	27,09d	13,42de	26,91b	3,96d	6,03d	0,3abc
Dic 2 <sup>da</sup>	107,39c	23,43d	23,47cd	5,34c	6,99c	0,33a
Ene 1 <sup>era</sup>	229,85b	49,58c	20,88e	7,47b	8,30b	0,31ab
Ene 2 <sup>da</sup>	261,58b	63,87b	24,07c	7,87b	8,39b	0,28c
Feb 1 <sup>era</sup>	306,59a	83,76a	26,44b	8,32a	8,44b	0,20d
Feb 2 <sup>da</sup>	324,83a	91,10a	28,40b	8,48a	8,79a	0,17e
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>D = estación de crecimiento</i>						
2008/09	196,68a	49,51	23,44b	6,64a	7,54a	0,26b
2009/10	178,58b	45,72	29,94a	6,08b	7,37b	0,28a
<i>p</i>	0,015	0,090	<0,001	<0,001	0,006	0,005
<i>Interacciones Ax BxCxD</i>	0,992	0,960	0,525	0,912	0,835	0,154
<i>(p)</i>						

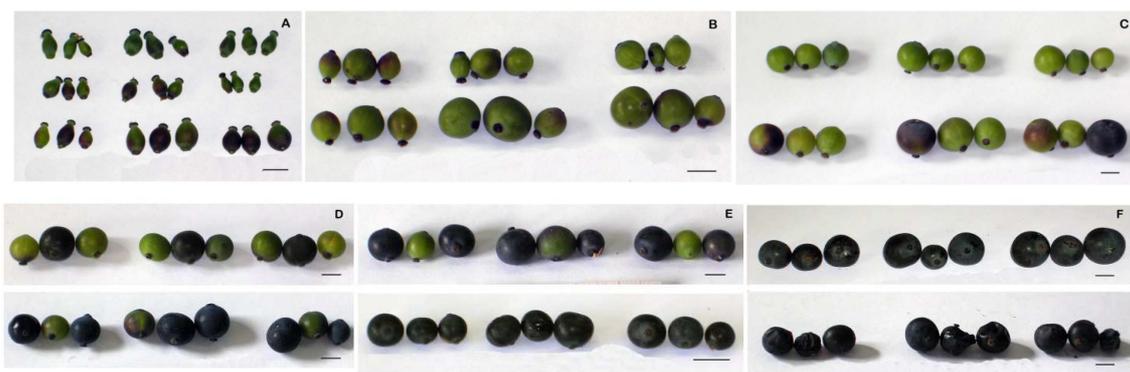
$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .



**Figura II.6.1.** Peso fresco de los frutos (PFF) de *B. microphylla* en media (▲) y alta (■) intensidad de luz, en los tratamientos M1 (▲) y A1 (■) a lo largo de la estación de crecimiento 2008/09 en **A**, con nivel de fertilización 0 (■), 1 (▲) y 2 (■), los tratamientos A0 (■) y A1 (▲) a lo largo de la estación de crecimiento 2008/09 en **B**, en 2008/09 (■) y 2009/10 (▲), en los tratamientos A1 en 2008/09 (■) y A1 en 2009/10 (▲) a lo largo de la estación de crecimiento en **C**. Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura II.6.2.** Peso seco de los frutos (PSF) de *B. microphylla* en media ( $\blacktriangle$ ) y alta ( $\blacksquare$ ) intensidad de luz, en los tratamientos M1 ( $\triangle$ ) y A1 ( $\square$ ) a lo largo de la estación de crecimiento 2008/09 en **A**, con nivel de fertilización 0 ( $\blacksquare$ ), 1 ( $\blacktriangle$ ) y 2 ( $\blacklozenge$ ), en los tratamientos A0 ( $\square$ ) y A1 ( $\triangle$ ) a lo largo de la estación de crecimiento 2008/09 en **B**, en 2008/09 ( $\blacksquare$ ) y 2009/10 ( $\blacktriangle$ ), en los tratamientos A1 en 2008/09 ( $\square$ ) y A1 en 2009/10 ( $\triangle$ ) a lo largo de la estación de crecimiento en **C**. Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura II.6.3.** Evolución del crecimiento de los frutos de *B. microphylla* durante la estación de crecimiento 2008/09 (quincenas). **A**, nov<sup>2da</sup>, **B**, dic<sup>2da</sup>, **C**, ene<sup>1era</sup>, **D**, ene<sup>2da</sup>, **E**, feb<sup>1era</sup> y **F**, feb<sup>2da</sup>. En **A**, intensidad de luz alta (abajo), intensidad de luz media (medio) e intensidad de luz baja (arriba). En **B**, **C**, **D**, **E**, y **F**, intensidad de luz alta (abajo) e intensidad de luz media (arriba). En **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, y **F**, nivel de fertilización 0 (3 frutos de la izquierda), 1 (3 frutos del medio) y 2 (3 frutos de la derecha). Barra = 10 mm.

### Crecimiento de las semillas

Los parámetros relacionados a las semillas (peso fresco de las semillas por fruto, el peso seco de las semillas por fruto, el peso seco de las semillas como porcentaje del peso fresco, el número de semillas por fruto y la relación entre peso seco de las semillas por fruto/peso seco de los frutos) variaron significativamente durante el período de fructificación (**Tabla II.6.2**). El peso fresco, el peso seco y el peso seco como porcentaje del peso fresco de las semillas fueron máximos al final del período de fructificación, alcanzando valores de 76,9 mg, 38,9 mg y 50,6%, respectivamente. El máximo número de semillas observado fue de 5 durante la primera quincena de enero. La relación entre peso seco de las semillas por fruto/peso seco de los frutos fue máxima durante la segunda quincena de enero (0,46) para descender a 0,39 al final de la fructificación.

Los parámetros mencionados en el párrafo anterior también fueron afectados significativamente por la intensidad de luz (**Tabla II.6.2**). Los valores máximos se alcanzaron en alta intensidad de luz: para el peso fresco de las semillas por fruto fue de 50,5 y 78,3 mg, para el peso seco de las semillas por fruto de 21,4 y 35,4 mg, mientras que para el peso seco de las semillas como porcentaje del peso fresco fue de 42,5 y 44,5%, respectivamente para media y alta intensidad de luz. El número de semillas por fruto fue de 3,2 y 5,3 para media y alta intensidad de luz respectivamente, mientras que la relación entre peso seco de las semillas por fruto/peso seco de los frutos fue de 0,36 y 0,44 para media y alta intensidad de luz, respectivamente.

### **Crecimiento de los frutos**

---

El nivel de fertilización también afectó significativamente el peso y número de las semillas (**Tabla II.6.2**). El peso fresco de las semillas por fruto fue máximo con el mayor nivel de fertilización (72,1 mg), mientras que el peso seco de las semillas por fruto fue máximo con el nivel de fertilización 1 (32,1 mg). El mayor número de semillas se obtuvo con ambos niveles de fertilización (4,6-4,7), mientras que la relación entre peso seco de las semillas por fruto / peso seco de los frutos fue similar para ambos niveles (0,41).

La estación de crecimiento también afectó significativamente los parámetros peso seco de las semillas por fruto, peso seco de las semillas como porcentaje del peso fresco, número de semillas por fruto y la relación entre peso seco de las semillas por fruto / peso seco de los frutos (**Tabla II.6.2**). Los valores máximos se obtuvieron en la estación 2009/2010: el peso seco de las semillas por fruto fue de 26,6 y 30,2 mg, el peso seco de las semillas como porcentaje del peso fresco de 41,2 y 45,8 %, el número de semillas por fruto de 3,6 y 5,0, mientras que la relación entre peso seco de las semillas por fruto / peso seco de los frutos fue de 0,3 y 0,5, para las estaciones de crecimiento 2008/09 y 2009/10, respectivamente.

Sólo se encontraron interacciones significativas para el peso seco de las semillas como porcentaje del peso fresco entre los cuatro factores principales.

**Crecimiento de los frutos**

**Tabla II.6.2.** Crecimiento de las semillas de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios del ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización, la fecha y la estación de crecimiento como factores principales, y el peso fresco de las semillas por fruto (mg) (PFS), el peso seco de las semillas por fruto (mg) (PSS), el peso seco de las semillas por fruto como porcentaje del peso fresco (%) (PSS%), el número de semillas por fruto (NS) y la relación entre peso seco de las semillas por fruto/peso seco de los frutos (PSS/PSF) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>PFS</b>	<b>PSS</b>	<b>PSS%</b>	<b>NS</b>	<b>PSS/PSF</b>
<i>A = intensidad de luz</i>					
Media	50,48b	21,45b	42,54b	3,25b	0,36b
Alta	78,28a	35,37a	44,47a	5,27a	0,44a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,016	<0,001	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>					
0	49,52b	21,80b	43,12	3,56b	0,37b
1	71,52a	32,08a	43,90	4,57a	0,41a
2	72,10a	31,35a	43,48	4,66a	0,41a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,885	<0,001	0,004
<i>C = fecha</i>					
Dic 2 <sup>da</sup>	26,79b	9,70d	40,15b	2,86b	0,27c
Ene 1 <sup>era</sup>	67,74a	24,49c	36,03c	5,02a	0,44ab
Ene 2 <sup>da</sup>	75,17a	31,49bc	41,67b	4,72a	0,46a
Feb 1 <sup>era</sup>	75,31a	37,44ab	49,04a	4,89a	0,43b
Feb 2 <sup>da</sup>	76,88a	38,95a	50,62a	3,82b	0,39b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>C = estación de crecimiento</i>					
2008/09	60,65	26,60b	41,22b	3,56b	0,33b
2009/10	68,11	30,22a	45,78a	4,96a	0,46a
<i>p</i>	0,058	0,049	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B x C x D (p)</i>	0,940	0,847	0,005	0,678	0,893

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

## **DISCUSIÓN**

### **Crecimiento de los frutos y las semillas a lo largo de la estación de crecimiento**

Si bien el crecimiento de los frutos de *B. microphylla* en una población natural exhibió una doble curva sigmoidea particularmente cuando se expresó en términos de peso fresco y a lo largo de las distintas estaciones de crecimiento (CAPÍTULO 1, PARTE I), en este ensayo realizado con el cultivo experimental se encontró que el crecimiento de los frutos tuvo un comportamiento variable según su parámetro de referencia (por ejemplo peso fresco o peso seco), la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento. Es así que en condiciones de intensidad de luz alta, el crecimiento de los frutos exhibió una doble curva sigmoidea tanto en términos del peso fresco de frutos como del peso seco del fruto, mientras que en condiciones de intensidad de luz media, la fase de crecimiento lento resultó ser menos notoria. Este comportamiento es el producto de la tasa de crecimiento absoluta diferencial de los frutos a lo largo de la fructificación. Mientras que en intensidad de luz alta la tasa de crecimiento absoluta de los frutos durante la 1<sup>era</sup> y 2<sup>da</sup> quincenas de enero fue de 10,6 y 0,6 g/día respectivamente, en intensidad de luz media dicha tasa de crecimiento absoluta de los frutos fue de 6,9 y 4,0 g/día respectivamente. Tendencias comparables se observaron para los tratamientos de intensidad de luz alta y media y el nivel 1 de fertilización. Las variaciones en el crecimiento de los frutos pueden ser debidas por un lado al crecimiento de las semillas, dado que durante la fase de crecimiento lento de los frutos, en la 1<sup>era</sup> y 2<sup>da</sup> quincenas de enero, las semillas están terminando de ganar peso fresco, ocurriendo el mayor aumento entre la 2<sup>da</sup> quincena de diciembre y la 1<sup>era</sup> de enero. A ello debe sumarse el rol determinante de las influencias de los factores ambientales y/o condiciones de cultivo (Kramer y Kozlowski, 1979; Predieri y Dris, 2005).

### **Crecimiento de los frutos y las semillas con la intensidad de luz**

El peso fresco y seco y el diámetro de los frutos pudieron relacionarse con la intensidad de luz. Las variables peso fresco de los frutos, el peso seco de los frutos, el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco, el diámetro ecuatorial de los frutos y el diámetro polar de los frutos aumentaron 1,4, 1,5, 1,1, 1,1 y 1,02 veces, respectivamente, cuando la intensidad de luz aumentó de media a alta. Similares tendencias se observaron para los parámetros evaluados en las semillas. Estos resultados pueden explicarse considerando que la cantidad de fotosintatos elaborados y posteriormente “exportados” en condiciones de alta intensidad de luz fue mayor, dada la relación conocida entre la tasa de fotosíntesis de las plantas y la intensidad de luz (Tognetti et al., 1998, Larcher, 2003, Martinez Pastur et al., 2007, Xu et al., 2007).

En *B. microphylla* se pudo encontrar una relación entre la tasa de fotosíntesis neta de las hojas y la intensidad de luz que explicaría el aumento de estas variables (CAPÍTULO 4, PARTE II). Otra explicación podría estar dada por la relación directa entre la luz y la expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de giberelinas, en particular el ácido giberélico, que se conoce puede inducir un mayor tamaño y peso de los frutos (DeBolt, 2008). En *Malus domestica*, se ha encontrado que las tasas de crecimiento tempranas disminuían hasta 4 veces comparada con la tasa normal ante una disminución de la intensidad de luz del 60% o más, porque en la asignación de fotoasimilados los ápices de los brotes tienen prioridad frente a los frutos (Bepete y Lakso, 1998). Sin embargo, en los frutos de *Malus domestica* (Smit, 2007) y de *Vaccinium corymbosum* (Lobos et al., 2013), se observó una disminución del peso fresco de los frutos ante un aumento de la intensidad de luz, aunque el porcentaje del peso seco con respecto al peso fresco aumentó con la intensidad de luz, al igual que en frutos de *B. microphylla*. Similares resultados se encontraron en *Malus domestica* (Dussi et al., 2005). Para los frutos en los que se observó un aumento del peso fresco ante una disminución de la intensidad de luz, dicha relación se ha explicado argumentando que en tales condiciones ambientales se daba un menor crecimiento de los brotes y pocos frutos por planta, hecho que favorecería el llenado de los frutos (Lobos et al., 2013). Por otra parte, los diferentes comportamientos en el crecimiento de los frutos a lo largo de la estación de crecimiento podrían relacionarse con las diferencias en la ocurrencia de las fases fenológicas según las condiciones experimentales (CAPÍTULO 2, PARTE II), observándose que en alta intensidad de luz se produjo un adelantamiento de las fases fenológicas reproductivas, lo que seguramente influyó en la cinética del crecimiento de los frutos.

### **Crecimiento de los frutos y las semillas bajo diferentes niveles de fertilización**

En cuanto al peso fresco y seco y el diámetro de los frutos, estas variables también pudieron correlacionarse con el nivel de fertilización. Es así que el peso fresco y seco de los frutos, el peso seco de los frutos como porcentaje del peso fresco, diámetro ecuatorial y polar de los frutos aumentaron 1,2, 1,4, 1,1, 1,1 y 1,02 veces entre el nivel de fertilización 0 y 1. Similares tendencias se observaron para los parámetros evaluados en las semillas. Estos resultados podrían explicarse en parte por las diferencias en la ocurrencia de las fases fenológicas (CAPÍTULO 2, PARTE II), por el diferente contenido foliar de nutrientes como el carbono y la relación C/N, (CAPÍTULO 3, PARTE II) y porque la tasa de fotosíntesis neta aumentó con los niveles de fertilización en alta intensidad de luz, redundando en una mayor síntesis de fotoasimilados (CAPÍTULO 4, PARTE II) y formación de producciones fructíferas

### **Crecimiento de los frutos**

---

(CAPÍTULO 5, PARTE II). Las hojas son depósitos muy temporarios de C, el cual es exportado como sacarosa u otros hidratos de carbono rápidamente a otros depósitos, permaneciendo en las hojas sólo los hidratos de carbono estructurales. Aumentos en el peso fresco de los frutos con niveles crecientes de fertilización también se observaron en *Vitis vinifera* (Abd El-Razek et al., 2011).

Los frutos de las plantas cultivadas bajo 100% de intensidad de luz y 3,4 y 6,7 g de fertilizante por planta presentaron los mayores valores de peso fresco de frutos (433 y 384 mg respectivamente).

### **Crecimiento de los frutos y las semillas en diferentes estaciones de crecimiento**

Las variables relacionadas a peso fresco y diámetro de los frutos pudieron relacionarse con la estación de crecimiento, observándose los valores máximos en la estación de crecimiento 2008/09, hecho que podría explicarse por un lado por las condiciones ambientales diferenciales existentes entre ambas estaciones de crecimiento (CAPÍTULO 1, PARTE II); sin embargo, no podría descartarse la relación inversa con el rendimiento de frutos en las plantas, el cual fue superior en 2009/10 con respecto a 2008/09 (CAPÍTULO 5, PARTE II). Por otro lado, la relación entre el peso seco de las semillas y el peso seco de los frutos fue mayor en 2009/10, hecho que también se podría relacionar con las condiciones ambientales diferenciales existentes entre ambas estaciones de crecimiento.

## **CONCLUSIONES**

El crecimiento de los frutos y semillas de *B. microphylla* mostraron cambios a lo largo de su ontogenia, con la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento. Los frutos presentaron tasas de crecimiento diferenciales a lo largo de su ontogenia. Los frutos de las plantas cultivadas bajo intensidad de luz alta y con mayor temperatura del aire y del suelo presentaron curvas de crecimiento doble sigmoideas con las mayores tasas de crecimiento, alcanzando los mayores valores de peso y tamaño. Los frutos de las plantas cultivadas bajo los niveles de fertilización 1 y 2 presentaron curvas de crecimiento doble sigmoideas con las mayores tasas de crecimiento, alcanzando los mayores valores de peso y tamaño. Los frutos presentaron mayor peso y tamaño en la estación de crecimiento 2008/09, mientras que el mayor peso seco de las semillas y su relación con el peso seco de los frutos lo alcanzaron en 2009/10.

Los cambios observados en el crecimiento de los frutos y semillas de las plantas de *B. microphylla* se pudieron relacionar con las condiciones ambientales de los tratamientos y con los niveles de fertilización, y de manera consistente con la fenología de las plantas, la relación peso/superficie foliar, el contenido de carbono foliar, la relación de clorofila A/B en las hojas, la tasa de fotosíntesis neta y la producción de frutos, indicando que las plantas presentan una capacidad de aclimatación morfológica a dichas condiciones de crecimiento.

## **CAPITULO 7**

### **COMPOSICIÓN DE LOS FRUTOS**

## INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la composición química de los frutos, y de manera particular el conocimiento cuali y cuantitativo de sus hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y de los factores que sobre éstos influyen, resulta relevante no sólo por el valor funcional de los frutos sino porque tales contenidos permiten determinar el momento óptimo de cosecha (Vicente et al., 2009; Etienne et al., 2013).

El contenido de los azúcares simples de las frutas es influenciado por la señal de azúcar, nutrientes, reguladores del crecimiento vegetal y factores físicos que afectan el transporte de azúcar, el metabolismo, la acumulación y la relación entre ellos (Zhi et al., 2004). A su vez, los ácidos orgánicos juegan un rol importante con respecto al establecimiento de la relación de contenido de azúcares/ácidos orgánicos, ya que es determinante del sabor de los frutos y vegetales (Vicente et al., 2009). La literatura muestra que los factores agro-ambientales que tienen mayor impacto en la acidez de la fruta son la relación fuente: destino en la planta, la fertilización mineral, el suministro de agua, la temperatura (Etienne et al., 2013), los hidratos de carbono (Zhi et al., 2004) y la ontogenia como se ha demostrado.

Los factores genéticos y epigenéticos tales como las etapas de maduración del fruto, las condiciones ambientales durante el crecimiento de las mismas y las prácticas culturales empleadas, todos juntos influyen en la síntesis de los compuestos fenólicos (Kähkönen et al., 2001; Ferreyra et al., 2007) y en la constitución de su capacidad antioxidante (Roussos et al., 2009), resultando en algunos casos aún más relevante el rol de la ontogenia cuando las bayas se utilizan inmaduras, como por ejemplo en los arándanos (*Vaccinium* spp.) para la industria de jugos (Çelik et al., 2008).

Es muy importante considerar el microclima en la zona de los arbustos al momento de establecer las prácticas de manejo en la parte aérea de los mismos. La exposición al sol de las hojas determina la eficiencia fotosintética como se ha visto en CAPITULO 4, PARTE II, mientras que la exposición al sol de los frutos puede impactar en su calidad de forma diferencial, como por ejemplo en los contenidos de acidez total titulable, sólidos solubles, color y contenido de antocianinas, aroma y sabor (Vance et al., 2013).

La reducción de la intensidad de luz y la modificación de su calidad mediante el empleo de mallas media sombra tienen la capacidad de retrasar la maduración de los frutos en algunos cultivos (Rylski y Spigelman, 1986a; b; Marini et al., 1991), y por consiguiente pueden afectar la calidad de los frutos como se ha encontrado en *Vaccinium* sp. (Lobos et al., 2013). En las distintas especies vegetales, la biosíntesis de las antocianinas es influenciada por una serie de factores ambientales como ser la exposición a la luz solar, la radiación UV, la temperatura y la disponibilidad de agua,

### Composición de los frutos

produciendo cambios cuali y cuantitativos en este grupo de compuestos fenólicos. Es así que algunos frutos necesitan de luz para la síntesis de antocianinas, mientras que otros, como los frutos de *Vitis vinifera*, pueden acumular antocianinas con o sin luz (He et al., 2010). Al igual que la luz solar, la temperatura es otro factor que afecta la síntesis de antocianinas. Temperaturas cercanas a los 25 °C favorecen la síntesis de antocianinas en *Vitis*, mientras que temperaturas cercanas a 35 °C afectan su acumulación y favorecen su degradación. Sin embargo, temperaturas nocturnas elevadas inhiben la acumulación de las antocianinas (He et al., 2010), por lo que entonces se pone de manifiesto el rol de la amplitud térmica diaria en la acumulación de estos compuestos.

Por otro lado, también se ha mencionado el efecto de la aplicación de fertilizantes sobre diversos parámetros de calidad de frutos, siendo muy contradictorio según las especies y dosis de los elementos nutritivos aportados. El aporte de fertilizantes no afectó la capacidad antioxidante de los frutos de *Fragaria x ananassa* (World y Opstad, 2007) y *Vitis vinifera* (Abd El-Razek et al., 2011), pero por el contrario sí lo hizo en *Fragaria x ananassa* según los resultados de Wang y Lin (2003), mientras que en los frutos de *Vitis vinifera* influyó sobre el contenido de antocianinas (He et al., 2010).

### Hipótesis

La composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, así como la actividad antioxidante de los frutos de *B. microphylla* son afectados por la intensidad de luz, la temperatura, el nivel de fertilización y las estaciones de crecimiento.

### Objetivos

Evaluar la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, así como la actividad antioxidante de los frutos de *B. microphylla* en diferentes intensidades de luz y niveles de fertilización durante las estaciones de crecimiento 2008/09 y 2009/10.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Los factores principales que se consideraron para los hidratos de carbono, los ácidos orgánicos y los compuestos fenólicos fueron: la intensidad de luz (media y alta), el nivel de fertilización (0, 1 y 2) y la estación de crecimiento (2008/09 y 2009/10), mientras que para la actividad antioxidante fueron: la intensidad de luz (media y alta) y el nivel de fertilización (0, 1 y 2). Durante la primera quincena de febrero, se cosecharon todos los frutos de las plantas de cada tratamiento ( $n = 30$ ). Parte de los frutos fueron inmediatamente utilizados para la determinación de los sólidos solubles, acidez total titulable y pH, mientras que otra parte fueron congelados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura, para posteriormente determinar los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

**Sólidos solubles, acidez total titulable, ratio y pH**

La metodología empleada para la determinación de los sólidos solubles, la acidez total titulable, la relación entre sólidos solubles/acidez total titulable y el pH fue descrita en el CAPÍTULO 1, PARTE I.

**Contenido de hidratos de carbono**

La extracción y la determinación cuantitativa de los hidratos de carbono se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología especificada por la AOAC (2000). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Para la determinación de la fibra dietaria total se utilizó la metodología AOAC 985.29 adoptada por un *kit* comercial de Megazyme®. El método implicó una serie de tres digestiones enzimáticas en baño termostático con agitación:  $\alpha$ -amilasa termoestable (15 min,  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 6), proteasa (30 min,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 7,5) y amiloglucosidasa (20 min,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 4,5). Como medio de incubación se utilizó un buffer fosfato (pH 6,0). El pH se ajustó en la 2<sup>da</sup> y 3<sup>ra</sup> incubación utilizando soluciones de OHNa 0,275 N y de ClH 0,325 N respectivamente. Finalizada la última digestión, se agregó etanol 95° (4 veces el volumen del digesto) con el fin de precipitar la fibra soluble. Se dejó decantar al menos durante 1 hora a temperatura ambiente. El residuo se retuvo en un filtro Duran-Schott® n° 3 con Celite® lavado con ácido, previamente tarado, filtrando al vacío. A continuación, el residuo se lavó sucesivamente con etanol 78°, etanol 95° y acetona. Los residuos se secaron hasta peso constante en estufa a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se pesaron. Para realizar la corrección de los residuos por proteína y cenizas, en uno de los duplicados se determinó el contenido de proteína y en el otro el de cenizas. Para obtener el % de fibra dietaria total se corrigió el peso del residuo seco restando el peso de proteína y cenizas contenido en él. El contenido porcentual de hidratos de carbono se estableció con la

## **Composición de los frutos**

ecuación: % hidratos de carbono =  $100 - (\%H + \%C + \%P + \% \text{ fibra dietaria total})$ , en donde H es el porcentaje de humedad, C es el porcentaje de cenizas, y P es el porcentaje de proteínas. Los resultados se expresaron en g/100 g peso fresco de los frutos y mg/g peso seco de los frutos.

### **Contenido de ácidos orgánicos**

La metodología empleada para la extracción y determinación de ácidos orgánicos se describió en el CAPÍTULO 1, PARTE I.

### **Contenido de antocianinas**

La metodología empleada para la extracción y determinación de antocianinas se describió en el CAPÍTULO 2, PARTE I.

### **Contenido de compuestos fenólicos**

La metodología empleada para la extracción y determinación de los compuestos fenólicos fue la descrita por Makkar et al. (1993). Alícuotas (15  $\mu$ l) de los extractos fueron transferidas a tubos de ensayos y el volumen llevado a 500  $\mu$ l con agua desionizada. Se adicionaron a continuación 250  $\mu$ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 ml de solución acuosa de carbonato de sodio al 20%. Luego de 40 minutos la absorbancia fue medida a 725 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido tánico. El contenido de fenoles totales fue expresado como mg ácido tánico/100g peso fresco de frutos y g ácido tánico/g peso seco de frutos.

### **Preparación de los extractos de los frutos y rendimiento de la extracción**

La metodología empleada para la preparación de los extractos se describió en el CAPÍTULO 2, PARTE I.

### **Contenido de flavonoides, perfil de compuestos fenólicos por HPLC, efecto secuestrador de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil y poder reductor**

La metodología empleada para la extracción y determinación de los flavonoides, perfil de compuestos fenólicos por HPLC, efecto secuestrador de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil y poder reductor se describió en el CAPÍTULO 2, PARTE I.

Los datos fueron analizados por ANOVA de dos y tres vías, y las medias fueron luego separadas usando el test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ . Los coeficientes de correlación lineal y análisis de regresión fueron hechos entre algunos pares de variables.

## RESULTADOS

### Sólidos solubles, acidez total titulable, ratio y pH

Los sólidos solubles, la acidez total titulable, la relación sólidos solubles/acidez total titulable y pH variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.1**), siendo máximos los valores de estas variables en alta intensidad de luz, a excepción de la acidez total titulable. Los sólidos solubles variaron entre 13,5 y 16,6 °Brix para media y alta intensidad de luz respectivamente, mientras que la acidez total titulable lo hizo entre 3,1 y 2,5% para media y alta intensidad de luz respectivamente, resultando la relación sólidos solubles/acidez total titulable entre 4,4 y 7,3 para media y alta intensidad de luz respectivamente. El pH osciló entre 2,78 y 2,82 para media y alta intensidad de luz respectivamente.

Los sólidos solubles, la acidez total titulable, la relación sólidos solubles/acidez total titulable y el pH variaron significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.1**). Los sólidos solubles fueron máximos con el mayor nivel de fertilización (15,9 °Brix), mientras que la acidez total titulable lo fue sin fertilización (3,2%), lo que llevó a una máxima relación sólidos solubles/acidez total titulable de 7,6 con el nivel de fertilización 2, al igual que el pH (2,8).

Los sólidos solubles, la acidez total titulable, la relación sólidos solubles/acidez total titulable y el pH variaron significativamente entre las estaciones de crecimiento (**Tabla II.7.1**). Los sólidos solubles variaron entre 17,6 y 12,5 °Brix para 2008/09 y 2009/10 respectivamente, mientras que la acidez total titulable lo hizo entre 2,6 y 3,1 para 2008/09 y 2009/10 respectivamente, resultando la relación sólidos solubles/acidez total titulable entre 7,6 y 4,2 respectivamente. El pH varió entre 2,84 y 2,76 para 2008/09 y 2009/10 respectivamente.

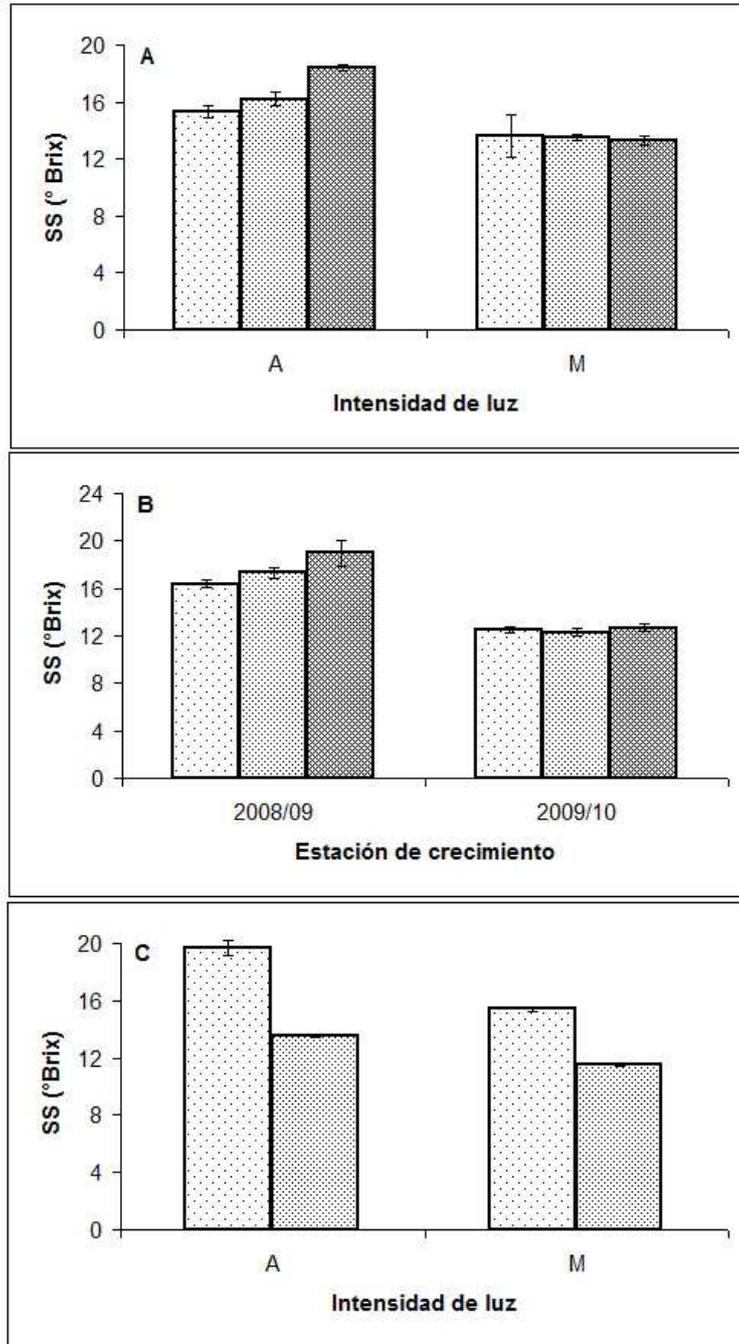
Se encontraron interacciones significativas entre los factores estudiados y para las variables mencionadas (**Tabla II.7.1**), excepto para la relación sólidos solubles/acidez total titulable, principalmente debido a incrementos diferenciales en los valores entre los factores principales y diferencias entre combinaciones (**Fig. II.7.1-2**). Así los sólidos solubles sólo mostraron diferencias significativas entre los niveles de fertilización en los frutos de intensidad de luz alta (**Fig. II.7.1A**), mientras que en cuanto a nivel de fertilización los sólidos solubles sólo variaron en 2008/09 (**Fig. II.7.1B**). Por otro lado, las diferencias en los sólidos solubles entre las intensidades de luz fueron mayores en 2008/09 con respecto a 2009/10 (**Fig. II.7.1C**). Las diferencias en la acidez total titulable entre las estaciones de crecimiento fueron mayores en intensidad de luz alta con respecto a intensidad de luz media (**Fig. II.7.2C**).

**Composición de los frutos**

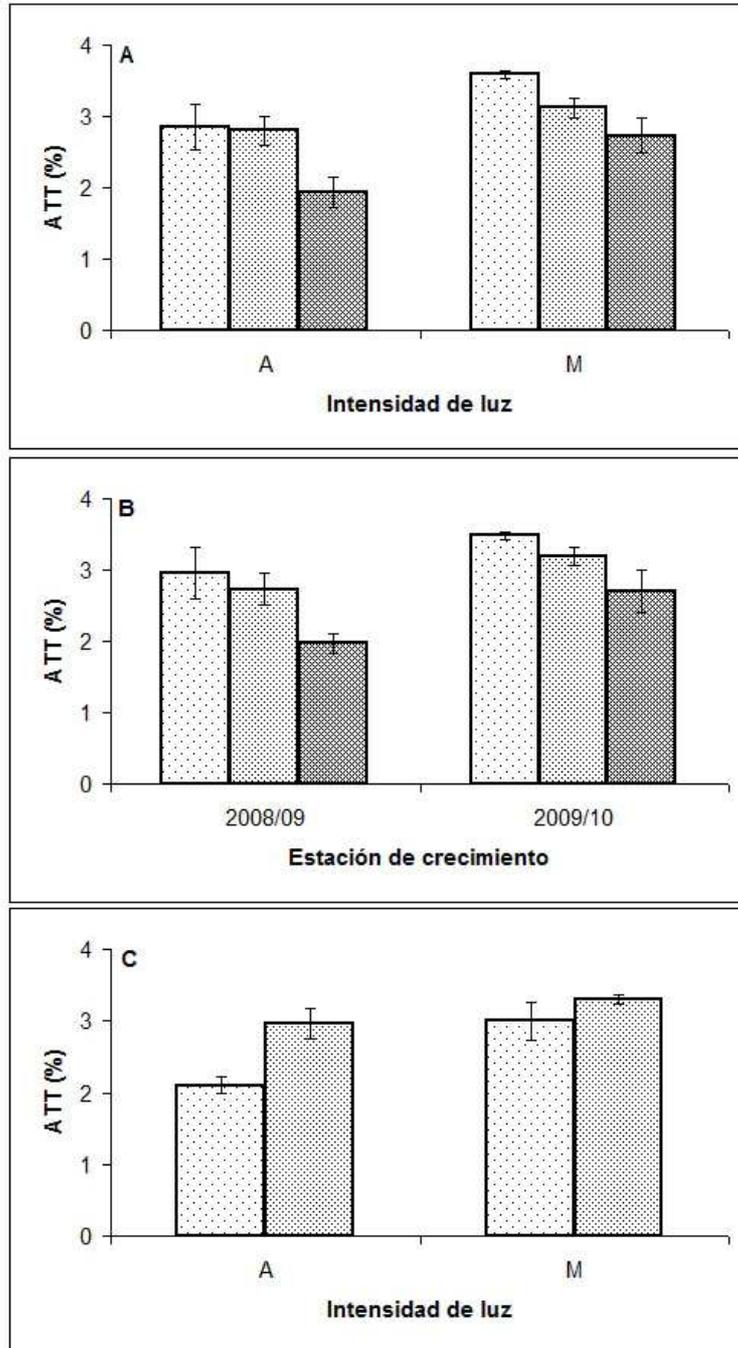
**Tabla II.7.1.** Composición de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales y los sólidos solubles ( $^{\circ}$  Brix) (SS), acidez total titulable (%) (ATT), relación sólidos solubles/acidez total titulable (SS/ATT) y pH inicial (pH) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>SS</b>	<b>ATT</b>	<b>SS/ATT</b>	<b>pH</b>
<i>A = intensidad de luz</i>				
Media	13,47b	3,14a	4,42b	2,78b
Alta	16,61a	2,53b	7,35a	2,82a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,007
<i>B = nivel de fertilización</i>				
0	14,43c	3,22a	4,76b	2,77b
1	14,83b	2,96a	5,30b	2,79b
2	15,86a	2,33b	7,59a	2,83a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
<i>C = estación de crecimiento</i>				
2008/09	17,57a	2,55b	7,55a	2,84a
2009/10	12,51b	3,13a	4,22b	2,76b
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones A x B x C (p)</i>	<0,001	0,036	0,744	0,004

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .



**Figura II.7.1.** Sólidos solubles de los frutos (SS) de *B. microphylla* mostrando en **A** la interacción entre la intensidad de luz alta (A) y media (M) y el nivel de fertilización 0 (⋯), 1 (⋯) y 2 (⋯), en **B** entre la estación de crecimiento y el nivel de fertilización 0 (⋯), 1 (⋯) y 2 (⋯) y en **C** entre la intensidad de luz y la estación de crecimiento 2008/09 (⋯) y 2009/10 (⋯). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura II.7.2.** Acidez total titulable (ATT) de los frutos de *B. microphylla* mostrando en **A** la interacción entre la intensidad de luz alta (A) y media (M) y el nivel de fertilización 0 (·), 1 (·) y 2 (·), en **B** entre la estación de crecimiento y el nivel de fertilización 0 (·), 1 (·) y 2 (·) y en **C** entre la intensidad de luz y la estación de crecimiento 2008/09 (·) y 2009/10(·). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.

**Hidratos de carbono**

Los azúcares simples y la fibra dietaria insoluble expresados en términos de peso fresco variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.2**). Los azúcares simples variaron entre 6,4 y 13,2 g/100 g peso fresco de frutos para intensidad de luz media y alta respectivamente, mientras que la fibra dietaria insoluble lo hizo entre 9,7 y 9,1 g/100 g peso fresco de frutos intensidad de luz para media y alta respectivamente.

La fibra dietaria total y la fibra dietaria soluble expresadas en términos de peso fresco variaron significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.2**), siendo máximas con el nivel de fertilización 0 (13,3 y 4,3 g/100 g peso fresco de frutos, respectivamente).

Los azúcares simples, la fibra dietaria total y la fibra dietaria insoluble expresados en términos de peso fresco variaron significativamente con la estación de crecimiento (**Tabla II.7.2**), alcanzando valores máximos en 2008/09 (11,5 13,5 y 9,9 g/100 g peso fresco de frutos).

Para los azúcares simples y la fibra dietaria total expresados en términos de peso fresco se encontraron interacciones significativas entre los factores estudiados (**Tabla II.7.2**). En alta intensidad de luz, los azúcares simples aumentaron con el nivel de fertilización, mientras que en media intensidad de luz disminuyeron con el nivel de fertilización (**Fig. II.7.3A**). En alta intensidad de luz, la fibra dietaria total disminuyó con el nivel de fertilización, y en media intensidad de luz aumentó con el nivel de fertilización (**Fig. II.7.3B**).

Los azúcares simples, la fibra dietaria total y la fibra dietaria insoluble expresados en términos de peso seco variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.3**). Los azúcares simples variaron entre 261,6 y 428,26 mg/g peso seco de frutos para intensidad de luz media y alta respectivamente, la fibra dietaria total lo hizo entre 531,6 y 423,0 mg/g peso seco de frutos para intensidad de luz media y alta respectivamente y la fibra dietaria insoluble varió 399,0 y 301,7 mg/g peso seco de frutos entre intensidad de luz media y alta respectivamente.

Los azúcares simples, la fibra dietaria total y la fibra dietaria soluble expresados en términos de peso seco variaron significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.3**), siendo máximos con el nivel de fertilización 0 (374,8, 516,1 y 166,7 mg/g peso seco de frutos, respectivamente).

Los azúcares simples expresados en términos de peso seco variaron significativamente con la estación de crecimiento (**Tabla II.7.3**), alcanzando valores máximos en 2008/09 (380,6 mg/g peso seco de frutos).

### Composición de los frutos

Para los azúcares simples, la fibra dietaria total y la fibra dietaria insoluble expresados en términos de peso seco se encontraron interacciones significativas entre los factores estudiados (**Tabla II.7.3**). En alta intensidad de luz, los azúcares simples aumentaron con el nivel de fertilización, mientras que en media intensidad de luz disminuyeron con el nivel de fertilización. En alta intensidad de luz, la fibra dietaria total y la fibra dietaria insoluble disminuyeron con el nivel de fertilización, mientras que en media intensidad de luz aumentaron con el nivel de fertilización.

**Tabla II.7.2.** Contenido de hidratos de carbono de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales, y los azúcares simples (AS), la fibra dietaria total (FDT), la fibra dietaria insoluble (FDI) y la fibra dietaria soluble (FDS) (g/100 g peso fresco de frutos) como variables dependientes.

Efectos Principales	AS	FDT	FDI	FDS
<i>A= intensidad de Luz</i>				
Media	6,41b	13,00	9,73a	3,28
Alta	13,18a	12,63	9,11b	3,51
<i>p</i>	<0,001	0,082	0,033	0,493
<i>B= nivel de fertilización</i>				
0	9,65	13,33a	9,06	4,27a
1	9,82	12,70ab	9,75	2,95b
2	9,41	12,42b	9,45	2,97b
<i>p</i>	0,717	0,004	0,139	0,003
<i>C= estación de crecimiento</i>				
2008/09	11,48 <sup>a</sup>	13,53a	9,94 <sup>a</sup>	5,59
2009/10	8,10b	12,11b	8,90b	3,21
<i>p</i>	0,015	<0,001	<0,001	0,268
<i>Interacciones F(p)</i>				
<i>A x B x C</i>	0,020	0,013	0,152	0,943

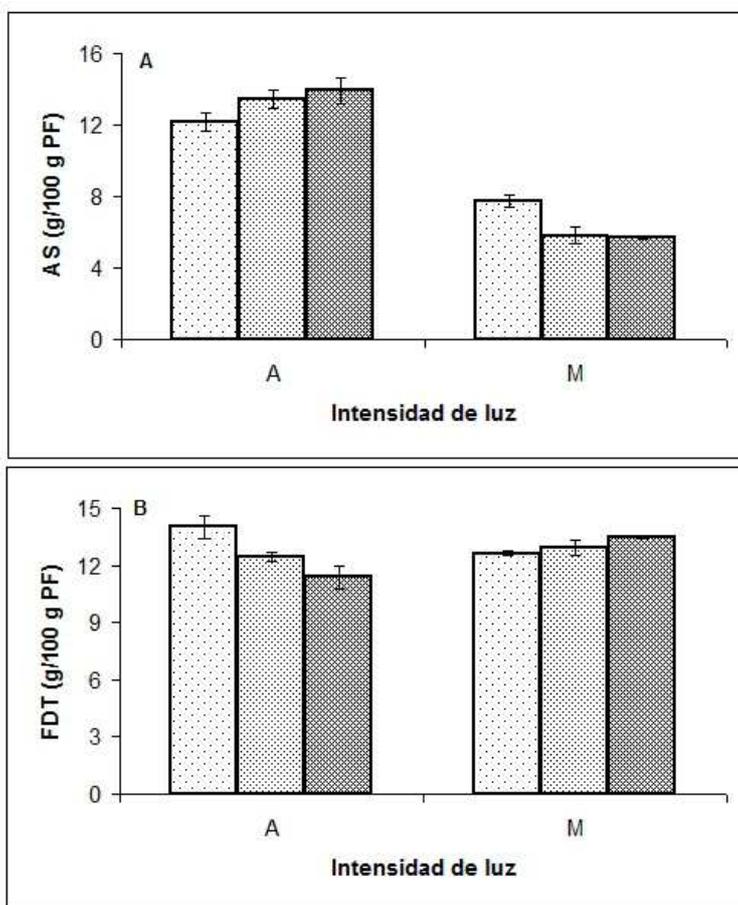
$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

## Composición de los frutos

**Tabla II.7.3.** Contenido de hidratos de carbono de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales, y los azúcares simples (AS), la fibra dietaria total (FDT), la fibra dietaria insoluble (FDI) y la fibra dietaria soluble (FDS) (mg/g peso seco de frutos) como variables dependientes.

Efectos Principales	AS	FDT	FDI	FDS
<i>A= intensidad de Luz</i>				
Media	261,63b	531,63a	399,00a	132,63
Alta	428,17a	423,00b	301,75b	121,15
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,376
<i>B= nivel de fertilización</i>				
0	374,78a	516,06a	349,30	166,75a
1	324,37a	452,83b	348,92	103,91b
2	335,95a	462,90b	352,90	110,00b
<i>p</i>	0,048	<0,001	0,955	<0,001
<i>C= estación de crecimiento</i>				
2008/09	380,60 <sup>a</sup>	478,77	351,40	127,37
2009/10	309,19b	475,75	349,35	126,40
<i>p</i>	0,037	0,735	0,862	0,940
<i>Interacciones A x B x C (p)</i>	0,030	0,004	0,025	0,950

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .



**Figura II.7.3.A** Azúcares simples (AS) y **B** fibra dietaria total (FDT) (g/100 g peso fresco de frutos) de los frutos de *B. microphylla* mostrando la interacción entre la

## Composición de los frutos

intensidad de luz alta (A) y media (M) y el nivel de fertilización 0 (··), 1 (···) y 2 (····). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.

### Contenido de ácidos orgánicos

El ácido málico, los ácidos orgánicos totales y la relación entre los ácidos málico/cítrico expresados en términos de peso fresco variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.4**), siendo máximos los valores de estas variables en media intensidad de luz. El ácido málico varió entre 7,6 y 4,8 g/100 g peso fresco de frutos para media y alta intensidad de luz respectivamente, mientras que los ácidos totales lo hicieron entre 10,1 y 7,3 g/100 g peso fresco de frutos para media y alta intensidad de luz respectivamente, variando la relación entre los ácidos málico/cítrico entre 5,7 y 3,6 para media y alta intensidad de luz respectivamente.

La relación entre los ácidos málico/cítrico expresado en términos de peso fresco varió significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.4**), siendo máximo con el nivel de fertilización 0 (5,8).

Los ácidos fumárico y málico y la relación entre los ácidos málico/cítrico expresados en términos de peso fresco variaron significativamente entre las estaciones de crecimiento (**Tabla II.7.4**). El ácido fumárico varió entre 0,006 y 0,017 g/100 g peso fresco de frutos para 2008/09 y 2009/10 respectivamente, mientras que el ácido málico lo hizo entre 5,4 y 7,0 g/100 g peso fresco de frutos para 2008/09 y 2009/10 respectivamente, dando un valor para la relación entre los ácidos málico/cítrico de 4,0 y 5,3 para 2008/09 y 2009/10 respectivamente.

No se encontraron interacciones significativas entre los 3 factores estudiados y para las variables mencionadas en la **Tabla II.7.4**, aunque sí se encontraron interacciones significativas entre intensidad de luz y estación de crecimiento para el ácido málico, observándose que en alta intensidad de luz se encontraron grandes diferencias entre ambas estaciones de crecimiento, mientras que en media intensidad de luz dichas diferencias fueron mínimas (**Fig. II.7.4**).

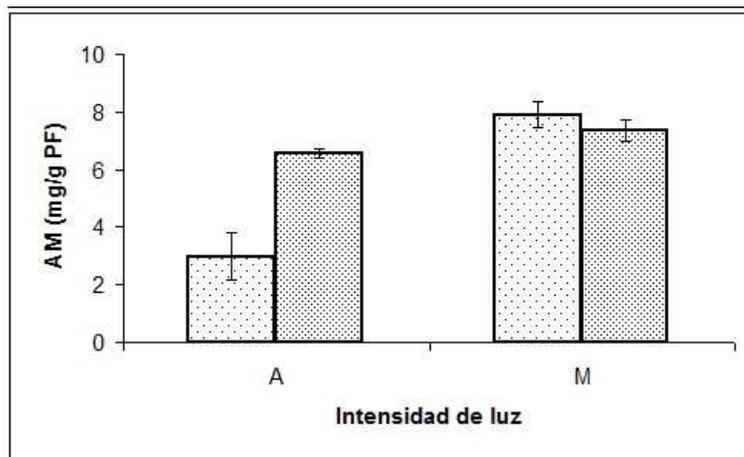
Los ácidos cítrico, málico, orgánicos totales y la relación entre los ácidos málico/cítrico expresados en términos de peso seco variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.5**), siendo máximos los valores de estas variables en media intensidad de luz. El ácido cítrico varió entre 5,6 y 4,7 mg/g peso seco de frutos para media y alta intensidad de luz respectivamente, mientras que el málico lo hizo entre 31,6 y 17,3 mg/g peso seco de frutos para media y alta intensidad de luz respectivamente. A su vez, los ácidos orgánicos totales variaron entre 42,0 y 26,1 mg/g peso seco de frutos y la relación entre los ácidos málico/cítrico lo hizo entre 5,7 y 3,6 para media y alta intensidad de luz respectivamente.

### Composición de los frutos

El ácido málico y la relación entre los ácidos málico/cítrico variaron significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.5**), siendo máximos con el nivel de fertilización 0 (28,5 mg/g peso seco de frutos y 5,8 respectivamente).

Los ácidos fumárico, málico y la relación entre los ácidos málico/cítrico variaron significativamente entre las estaciones de crecimiento (**Tabla II.7.5**). El ácido fumárico varió entre 0,02 y 0,07 mg/g peso seco de frutos para 2008/09 y 2009/10 respectivamente, mientras que lo hizo entre 21,5 y 27,3 mg/g peso seco de frutos para 2008/09 y 2009/10 respectivamente, dando un valor para la relación entre los ácidos málico/cítrico de 4,0 y 5,3 para 2008/09 y 2009/10 respectivamente.

No se encontraron interacciones significativas entre los tres factores estudiados y para las variables mencionadas en la **Tabla II.7.5**. Sin embargo se observó para el ácido málico que en alta intensidad de luz se encontraron grandes diferencias entre ambas estaciones de crecimiento, mientras que en media intensidad de luz dichas diferencias fueron mínimas.



**Figura II.7.4.** Contenido de ácido málico (AM) (mg/g peso fresco de frutos) de los frutos de *B. microphylla* considerando la interacción entre la intensidad de luz y la estación de crecimiento 2008/09 (·) y 2009/10 (·). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.

## Composición de los frutos

**Tabla II.7.4.** Contenido de ácidos orgánicos de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales, y los ácidos cítrico (AC), fumárico (AF), málico (AM), oxálico (AO), tartárico (AT), total (AOT) y la relación ácido málico/ácido cítrico (AM/AC) (mg/g peso fresco de frutos) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>AC</b>	<b>AF</b>	<b>AM</b>	<b>AO</b>	<b>AT</b>	<b>AOT</b>	<b>M/C</b>
<i>A= intensidad de Luz</i>							
Media	1,35	0,012	7,63a	1,10	0,031	10,14a	5,67a
Alta	1,36	0,010	4,77b	1,12	0,032	7,28b	3,63b
<i>p</i>	0,948	0,350	0,002	0,982	0,983	0,005	<0,001
<i>B= nivel de fertilización</i>							
0	1,19	0,012	6,94	1,16	0,046	9,35	5,80a
1	1,40	0,010	6,54	1,14	0,027	9,12	4,66b
2	1,47	0,011	5,12	1,04	0,023	7,67	3,54c
<i>p</i>	0,061	0,793	0,076	0,548	0,574	0,166	0,003
<i>C = estación de crecimiento</i>							
2008/09	1,38	0,006b	5,44b	1,12	0,015	7,96	4,00b
2009/10	1,33	0,017a	6,96a	1,11	0,048	9,46	5,33a
<i>p</i>	0,536	0,003	0,031	0,857	0,128	0,067	0,005
<i>Interacciones A x B X C (p)</i>	0,888	0,882	0,426	0,841	0,388	0,496	0,321

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

### Composición de los frutos

**Tabla II.7.5.** Contenido de ácidos orgánicos de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales, y los ácidos cítrico (AC), fumárico (AF), málico (AM), oxálico (AO), tartárico (AT), total (AOT) y la relación ácido málico/ácido cítrico (AM/AC) (mg/g peso seco de frutos) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>AC</b>	<b>AF</b>	<b>AM</b>	<b>AO</b>	<b>AT</b>	<b>AOT</b>	<b>AM/AC</b>
<i>A= intensidad de Luz</i>							
Media	5,59a	0,052	31,57a	4,61	0,13	41,97a	5,67a
Alta	4,72b	0,037	17,27b	3,94	0,11	26,10b	3,63b
<i>P</i>	0,025	0,141	<0,001	0,080	0,802	0,001	<0,001
<i>B= nivel de fertilización</i>							
0	4,86	0,051	28,53a	4,71	0,18	38,36	5,80a
1	5,20	0,039	24,53ab	4,21	0,10	34,10	4,66b
2	5,42	0,0431	20,19b	3,90	0,09	29,66	3,54c
<i>p</i>	0,357	0,541	0,050	0,183	0,407	0,094	0,003
<i>C = estación de crecimiento</i>							
2008/09	5,17	0,023b	21,53b	4,23	0,06	31,02	4,00b
2009/10	5,15	0,067a	27,31a	4,32	0,19	37,05	5,33a
<i>p</i>	0,956	0,002	0,037	0,803	0,073	0,063	0,005
<i>Interacciones A x B X C (p)</i>	0,291	0,695	0,451	0,572	0,329	0,422	0,321

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

**Contenido de antocianinas, flavonoides y fenoles totales**

Los contenidos de antocianinas y fenoles variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.6**), siendo máximos los valores de estas variables en intensidad de luz alta. El contenido de antocianinas varió entre 103,8 y 299,7 mg/100 g peso fresco de frutos para intensidad de luz media y alta respectivamente, mientras que lo hizo entre 3,3 y 9,5 mg/g peso seco de frutos para intensidad de luz media y alta respectivamente. El contenido de fenoles varió entre 693,8 y 906,6 mg de equivalentes de ácido tánico/100 g peso fresco de frutos para intensidad de luz media y alta respectivamente, mientras que lo hizo entre 27,5 y 30,7 mg de equivalentes de ácido gálico/g peso seco de frutos para intensidad de luz media y alta respectivamente. Los contenidos de flavonoides no variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.6**).

Los contenidos de flavonoides y fenoles variaron significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.6**). El contenido de flavonoides fue máximo en aquellos frutos cuyas plantas no fueron fertilizadas (200,2 mg (+)- equivalentes de catequina/100 g peso fresco de frutos y 7,6 mg (+) - equivalentes de catequina/g peso seco de frutos), mientras que el contenido de fenoles fue máximo con el nivel de fertilización 2 (856,1 mg de equivalentes de ácido tánico /g peso fresco de frutos y 31,2 mg (+)- equivalentes de catequina /g peso seco de frutos). Los contenidos de flavonoides no variaron significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.6**).

Los contenidos de antocianinas, flavonoides y fenoles variaron significativamente con la estación de crecimiento (**Tabla II.7.6**), siendo los contenidos de antocianinas (350,0 mg/100 g peso fresco de frutos y 10,8 mg/g peso seco de frutos) y fenoles (890,0 mg equivalentes de ácido tánico/100 g peso fresco de frutos y 30,3 mg equivalentes de ácido tánico/g de peso seco de frutos) máximos en 2008/2009 , mientras que el contenido de flavonoides fue mayor en 2009/10 (157, 8 mg (+) - equivalentes de catequina/100 g peso fresco de frutos y 6,25 mg equivalentes de ácido tánico/g peso seco de frutos).

Se encontraron interacciones significativas para el contenido de antocianinas entre los factores estudiados en la **Tabla II.7.6**, principalmente debido a incrementos diferenciales en los valores entre los factores principales y diferencias entre combinaciones (**Fig. II.7.5-6**). El contenido de antocianinas aumentó con el nivel de fertilización en los frutos de plantas en alta intensidad de luz, mientras que en aquellos de media intensidad de luz la tendencia fue inversa en la estación de crecimiento 2008/09, mientras que en 2009/10 el contenido de antocianinas en los frutos bajo intensidad de luz media aumentó con el nivel de fertilización aunque sin diferencias tan marcadas entre sí. Los contenidos de antocianinas y fenoles en los frutos de la

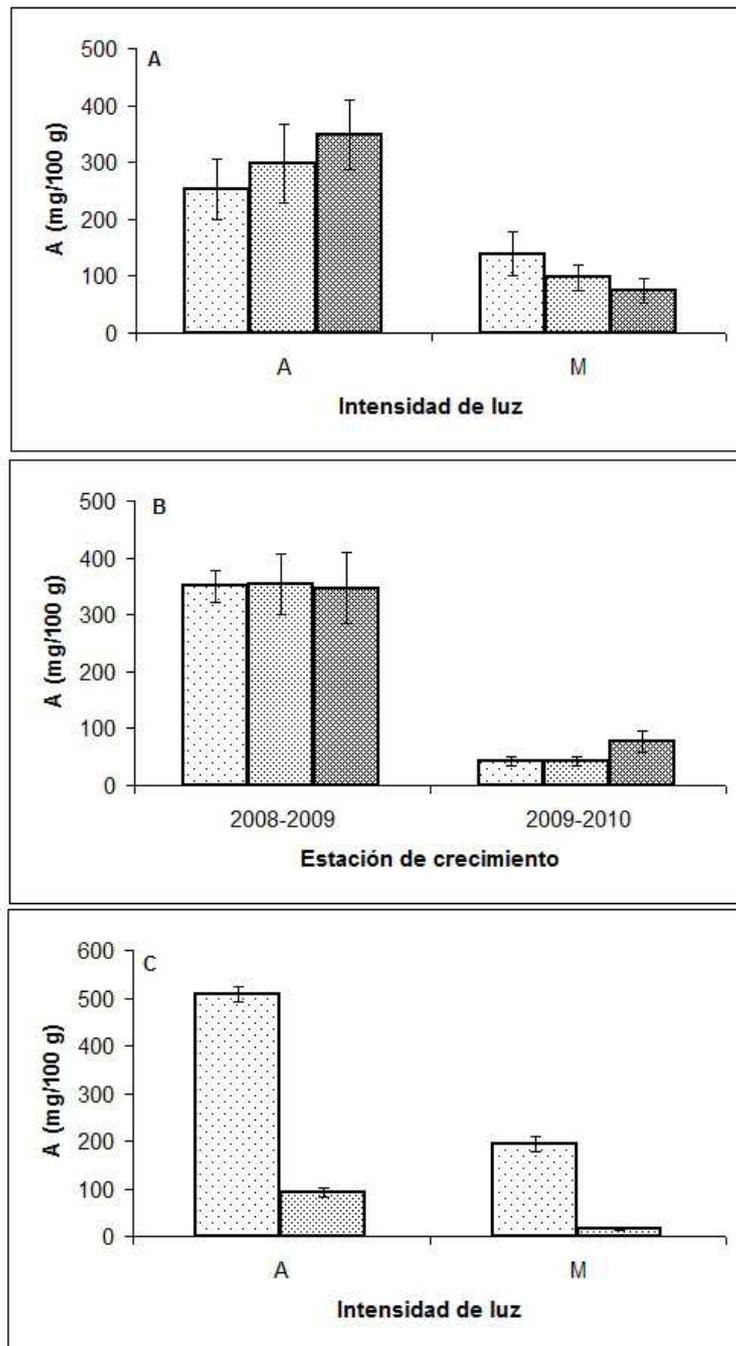
**Composición de los frutos**

estación de crecimiento 2008/09 fueron correlacionados positiva y significativamente con el rendimiento de los extractos metanólicos ( $r = 0,891$ ;  $p = <0,001$ ) y ( $r = 0,948$ ;  $p = <0,001$ ), respectivamente y con los azúcares simples ( $r = 0,813$ ;  $p = <0,001$ ).

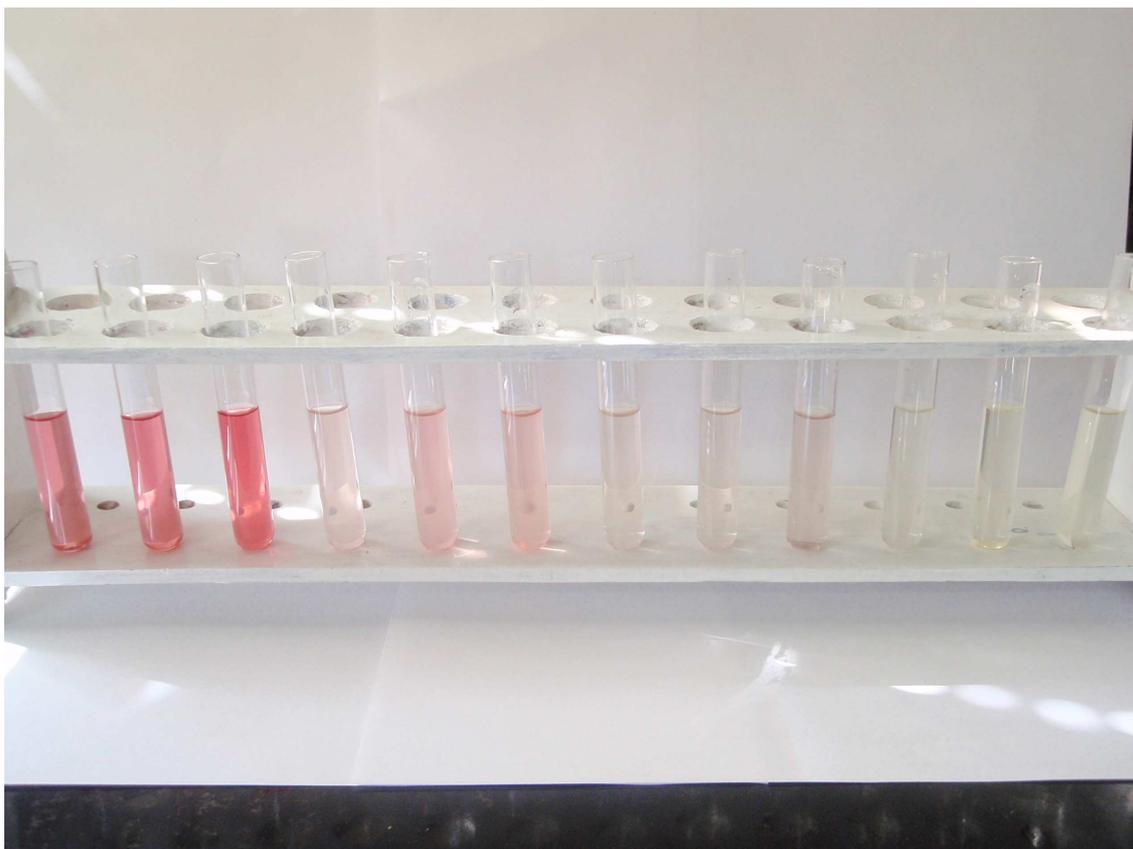
**Tabla II.7.6.** Contenido de compuestos fenólicos de los frutos de *B. microphylla*. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la estación de crecimiento como factores principales, y el contenido de antocianinas (A), contenido de flavonoides (mg equivalentes de (+)-catenquina) (FL) y contenido de fenoles (mg equivalentes de ácido gálico) (FE) expresados como mg/100 g peso fresco de frutos (PPF) y como m/g peso seco de frutos (PSF) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>A PPF</b>	<b>A PSF</b>	<b>FL PPF</b>	<b>FL PSF</b>	<b>FE PPF</b>	<b>FE PSF</b>
<i>A = intensidad de luz</i>						
Media	103,85b	3,29b	156,55	6,11	693,82b	27,48b
Alta	299,72a	9,50a	142,31	5,03	906,62a	30,70a
<i>P</i>	<0,001	<0,001	0,090	0,090	<0,001	<0,001
<i>B = nivel fertilización</i>						
0	195,67	6,28	200,17a	7,59a	714,19c	25,70c
1	197,94	6,19	138,1ab	4,98ab	830,34b	30,32b
2	211,75	6,72	110,05b	4,14b	856,14a	31,24a
<i>P</i>	0,221	0,194	0,010	0,010	<0,001	<0,001
<i>C = estación de crecimiento</i>						
2008/09	349,96a	10,81a	140,51b	4,89b	890,00a	30,33a
2009/10	53,61b	1,92b	157,83 <sup>a</sup>	6,25a	710,45b	27,84b
<i>P</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Interacciones AxBxC(p)</i>	<0,001	<0,001	0,105	0,155	<0,001	<0,001

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .



**Figura II.7.5.** Contenido de antocianinas (A) (mg/100 g peso fresco de frutos) de los frutos de *B. microphylla* mostrando la interacción en **A** entre la intensidad de luz alta (A) y media (M) y el nivel de fertilización 0 (· · ·), 1 (· · · ·) y 2 (· · · · ·), en **B** entre la estación de crecimiento y el nivel de fertilización 0 (· · ·), 1 (· · · ·) y 2 (· · · · ·) y en **C** entre la intensidad de luz y la estación de crecimiento 2008/09 (· · ·) y 2009/10 (· · · ·). Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura II.7.6.** Cuantificación de antocianinas de los frutos cosechados en la estación de crecimiento 2009/10 de *B. microphylla*, considerando los tratamientos entre la intensidad de luz y el nivel de fertilización (Alta 0, Alta 1, Alta 2, Media 0, Media 1 y Media 2 en pH 1 de izquierda a derecha, seguidos por Alta 0, Alta 1, Alta 2, Media 0, Media 1 y Media 2 en pH 4,5 de izquierda a derecha).

### Perfil de compuestos fenólicos

Los contenidos de catequina, rutina y quercitina no variaron significativamente ni con la intensidad de luz ni con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.7**), tampoco en términos de peso fresco y peso seco. Lo mismo sucedió con los ácidos clorogénico, telúrico y gálico tal como se muestra en la **Tabla II.7.8**. Al agrupar a estos compuestos en el grupo de los flavonoides, ácidos fenólicos, y la sumatoria de ambos (**Tabla II.7.9**), se encontró que los ácidos fenólicos variaron significativamente con la intensidad de luz, siendo su contenido de 157,7 mg/100g peso fresco de frutos en alta intensidad de luz, mientras que en media fue de 132,7 mg/100 g peso fresco de frutos.

**Composición de los frutos**

**Tabla II.7.7.** Contenido de flavonoides de los frutos de *B. microphylla* durante la estación de crecimiento 2008/09. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz y el nivel de fertilización como factores principales, y el contenido de catequina (CA), rutina (RU) y quercitina (QU) (mg/100 g peso fresco de frutos, PFF, mg/g peso seco de frutos, PSF) como variables dependientes.

Efectos principales	CA	CAT	RUT	RUT	QUE	QUE
	PFF	PSF	PFF	PSF	PFF	PSF
<i>A = intensidad de luz</i>						
Media	112,93	4,62	17,48	0,72	2,57	0,10
Alta	94,07	3,28	24,23	0,80	1,93	0,06
<i>P</i>	0,380	0,107	0,202	0,619	0,462	0,236
<i>B = nivel de fertilización</i>						
0	124,97	4,89	12,90	0,50	2,62	0,10
1	100,15	3,78	20,57	0,75	1,47	0,06
2	85,37	3,18	29,10	1,03	2,65	0,09
<i>P</i>	0,288	0,179	0,081	0,085	0,447	0,445
<i>Interacciones A x B (p)</i>	0,279	0,194	0,727	0,574	0,602	0,712

$p \leq 0,05$ .

**Composición de los frutos**

**Tabla II.7.8.** Contenido de ácidos fenólicos de los frutos de *B. microphylla* durante la estación de crecimiento 2008/09. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz y el nivel de fertilización como factores principales, y el contenido de ácido clorogénico (ACL), felúrico (AFE), y gálico (AGA) (mg/100g peso fresco de frutos, PFF, mg/g peso seco de frutos, PSF) como variables dependientes.

Efectos principales	CLO	CLO	FEL	FEL	GAL	GAL
	PFF	PSF	PFF	PSF	PFF	PSF
<i>A = intensidad de luz</i>						
Media	113,88	4,26	0,92	0,03	18,01	0,74
Alta	130,26	4,87	1,40	0,05	26,00	0,88
<i>P</i>	0,104	0,104	0,202	0,202	0,071	0,353
<i>B = nivel de fertilización</i>						
0	116,53	4,36	0,82	0,03	19,72	0,78
1	125,18	4,68	1,32	0,05	25,41	0,92
2	124,51	4,66	1,32	0,05	20,89	0,72
<i>P</i>	0,675	0,675	0,396	0,396	0,453	0,509
<i>Interacciones A x B (p)</i>	0,513	0,513	0,098	0,098	0,257	0,352

$p \leq 0,05$ .

### Composición de los frutos

**Tabla II.7.9.** Contenido de compuestos fenólicos de los frutos de *B. microphylla* durante la estación de crecimiento 2008/09. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz y el nivel de fertilización como factores principales, y el contenido de la suma de flavonoides (FLT), ácidos fenólicos (AFEN) y fenoles totales (FET) (mg/g peso fresco de frutos, PFF, mg/g peso seco de frutos, PS) como variables dependientes.

Efectos principales	FLT	FLT	AFEN	AFEN	FET	FET
	PFF	PSF	PFF	PSF	PFF	PSF
<i>A = intensidad de luz</i>						
Media	95,17	3,82	132,7b	5,03	225,89	8,85
Alta	95,88	3,33	157,7a	5,80	253,56	9,13
<i>P</i>	0,923	0,649	0,039	0,077	0,408	0,819
<i>B = nivel de fertilización</i>						
0	26,22	4,92	137,08	5,17	263,30	10,09
1	69,67	2,56	151,80	5,65	221,47	8,21
2	87,67	3,23	146,72	5,43	234,40	8,66
<i>P</i>	0,290	0,231	0,483	0,580	0,564	0,455
<i>Interacciones A x B (p)</i>	0,689	0,542	0,278	0,352	0,915	0,778

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

#### Actividad antioxidante

El efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.10**), siendo máximos los valores de estas variables en alta intensidad de luz. El efecto secuestrador de los radicales DPPH varió entre 56,0 y 66,8 % para media y alta intensidad de luz respectivamente, mientras que el poder reductor lo hizo entre 39,5 y 46,2% para media y alta intensidad de luz respectivamente.

El efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor variaron significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.10**). El efecto secuestrador de los radicales DPPH varió entre 58,2 y 63,2% entre el nivel 0 y 1 de fertilización, mientras que el poder reductor lo hizo entre 39,9 y 44,9% entre el nivel 0 y 1 de fertilización.

El máximo efecto secuestrador de los radicales DPPH se encontró a una concentración de 0,75 ml, mientras que para el poder reductor fue a 5,0 ml. Se encontraron interacciones significativas para el efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor entre los factores estudiados en la **Tabla II.7.10**, principalmente debido a incrementos diferenciales en los valores entre los factores principales y diferencias entre combinaciones (**Fig. II.7.7 y II.7.8**).

### Composición de los frutos

El efecto secuestrador de los radicales DPPH varió significativamente con la estación de crecimiento (**Tabla II.7.10**); sin embargo, el poder reductor presentó escasas diferencias entre ambas estaciones de crecimiento. El efecto secuestrador de los radicales DPPH varió entre 66,50 y 55,50% para la estación de crecimiento 2008/09 y 2009/10 respectivamente, mientras que el poder reductor lo hizo entre 40,45 y 44,73% para la estación de crecimiento 2008/09 y 2009/10 respectivamente.

La concentración de los extractos metanólicos a los que los radicales DPPH fueron secuestrados en un 50% y el poder reductor estuvo en 50% en los frutos variaron significativamente con la intensidad de luz (**Tabla II.7.11**), siendo máximos los valores de estas variables en media intensidad de luz. La concentración de los extractos metanólicos a los que los radicales DPPH fueron secuestrados en un 50% varió entre 0,3 y 0,2 mg/ml para media y alta intensidad de luz respectivamente, mientras que la concentración de los extractos metanólicos a los que el poder reductor fue del 50% varió entre 1,8 y 1,4 mg/ml para media y alta intensidad de luz respectivamente.

La concentración de los extractos metanólicos a los que los radicales DPPH fueron secuestrados en un 50% y el poder reductor estuvo en 50% en los frutos no varió significativamente con el nivel de fertilización (**Tabla II.7.11**). No se encontraron interacciones significativas para la concentración de los extractos metanólicos a los que los radicales DPPH fueron secuestrados en un 50% y el poder reductor estuvo en 50% en los frutos entre los factores estudiados en la **Tabla II.7.11**.

Aunque el efecto secuestrador de DPPH en los extractos de *B. microphylla* fue más efectivo a menor concentración (0,75 mg/ml) de lo que fue para el poder reductor (5,00 mg/ml), se produjo una fuerte relación entre ambos métodos en relación con la actividad antioxidante, que se muestra por la correlación lineal significativa encontrada entre ambos parámetros ( $r = 0,716$ ;  $p < 0,001$ ). Además, cabe destacar que el efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor de los extractos de los frutos de *B. microphylla* mostraron sus valores máximos en las concentraciones apenas mayores que las de los antioxidantes estándar.

**Composición de los frutos**

**Tabla II.7.10.** Actividad antioxidante de los frutos de *B. microphylla* durante la estación de crecimiento 2008/09. Valores medios de ANOVA considerando la intensidad de luz, el nivel de fertilización y la concentración de los extractos metanólicos (mg/ml) como factores principales, y los valores de efecto secuestrador de los radicales DPPH (%) (DPPH) y poder reductor (%) (PR) como variables dependientes.

<b>Efectos principales</b>	<b>DPPH</b>	<b>PR</b>
<i>A = intensidad de luz</i>		
Media	55,99b	39,45b
Alta	66,82a	46,17a
<i>P</i>	<0,001	<0,001
<i>B = nivel de fertilización</i>		
0	58,22b	39,89b
1	63,22a	44,91a
2	62,77a	43,63a
<i>P</i>	0,011	<0,001
<i>C = concentración (mg/ml)</i>		
0	0,00e	0,68h
0,10	26,89d	7,89g
0,25	64,56c	17,88f
0,50	85,81b	29,66e
0,75	94,59a	43,40d
1,00	96,55a	57,14c
2,5		86,40b
5,0		99,44a
<i>P</i>	<0,001	<0,001
<i>D= estación de crecimiento</i>		
2008/09	67,50a	40,45
2009/10	55,50b	44,73
<i>p</i>	<0,001	0,055
<i>Interacciones A x B x C (p)</i>	0,602	<0,001

$p \leq 0,05$ . Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

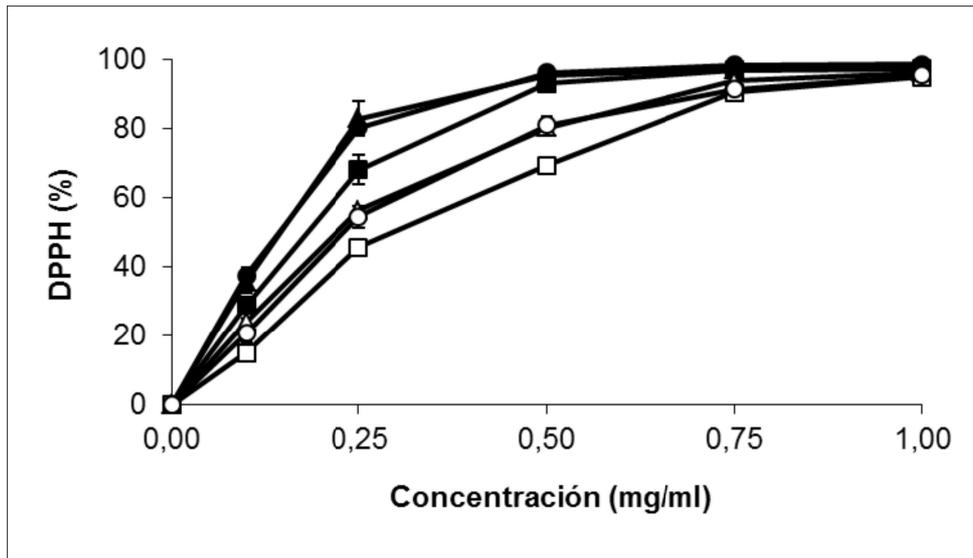
**Composición de los frutos**

**Tabla II.7.11.** Concentración efectiva ( $CE_{50}$ ) de los extractos metanólicos (mg/ml) a la que los radicales 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) fueron secuestrados en un 50% y el poder reductor (PR) estuvo en 50% en los frutos de *B. microphylla*, considerando la intensidad de luz y el nivel de fertilización como efectos principales durante la estación de crecimiento 2008/09.

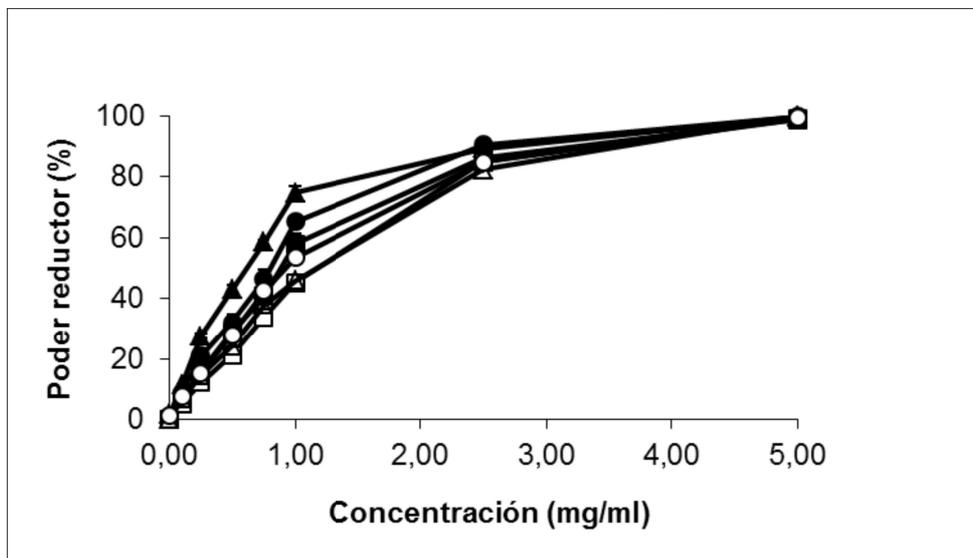
<b>Efectos principales</b>	<b><math>CE_{50}</math>DPPH</b>	<b><math>CE_{50}</math>PR</b>
<i>A = intensidad de luz</i>		
Media	0,31a	1,78a
Alta	0,20b	1,44b
<i>p</i>	<0,001	0,003
<i>B = nivel de fertilización</i>		
0	0,29	1,74
1	0,24	1,51
2	0,24	1,59
<i>p</i>	0,109	0,082
<i>Interacciones A x B (p)</i>	0,879	0,078

Valor  $CE_{50}$ : Este valor fue obtenido por interpolación a partir del análisis de regresión lineal entre la concentración de la muestra (mg/ml) y DPPH y PR, entre 0 y la concentración a la cual estas variables alcanzaron sus máximos valores. *p* = probabilidad a *p* = 0,05, Valores seguidos por letras diferentes en cada columna y para cada factor son significativamente diferentes de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

## Composición de los frutos



**Figura II.7.7.** Efecto secuestrador sobre los radicales DPPH (%) de los frutos de *B. microphylla* en los tratamientos LO (■), L1 (▲), L2 (◆), M0 (□), M1 (△) y M2 (◇) y a diferentes concentraciones de los extractos metanólicos (0,00 a 1,00 mg/ml) para la estación de crecimiento 2008/09. Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.



**Figura II.7.8.** Poder reductor (PR) (%) de los frutos de *B. microphylla* en los tratamientos LO (■), L1 (▲), L2 (◆), M (□), M1 (△) y M2 (◇) y a diferentes concentraciones de los extractos metanólicos (0,00 a 5,00 mg/ml) para la estación de crecimiento 2008/09. Las barras representan  $\pm$  error estándar de la media.

## DISCUSIÓN

### Cambios en la composición de los frutos con la intensidad de luz

Los sólidos solubles pudieron relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentaron 1,2 veces entre media y alta intensidad y podría explicarse por un lado debido a que los frutos formados en intensidad de luz media tuvieron un menor contenido de materia seca y mayor contenido de agua, por lo que los sólidos solubles podrían directamente ser menores por simple dilución de los mismos. Sin embargo no se puede descartar que además los sólidos solubles sean efectivamente mayores en intensidad de luz alta debido a que los fotosintatos elaborados bajo estas condiciones de luz sean superiores, dada la relación conocida entre la fotosíntesis de las plantas y la intensidad de luz (Tognetti et al., 1998; Larcher, 2003). En *B. microphylla* se ha encontrado una relación entre la tasa de fotosíntesis neta y la intensidad de luz que explicaría el aumento de los sólidos solubles (CAPÍTULO IV, PARTE II). Una disminución en los sólidos solubles con una menor intensidad de luz también se ha observado en frutos de *Prunus* sp. (Marini et al., 1991) y *Vitis vinifera* (Chorti et al., 2010). Los valores de los sólidos solubles encontrados en los frutos en el tratamiento Alta 0 son comparables con los obtenidos en años anteriores en la población natural de *B. microphylla* (CAPÍTULO 1, PARTE II), aunque algo menores que los citados para esta especie (33° Brix) en el sur de Chile (Arribillaga García, 2001). La acidez total titulable pudo relacionarse con la intensidad de luz, ya que aumentó 1,2 veces entre intensidad de luz alta y media. Esto podría explicarse debido a la relación encontrada entre la tasa de respiración oscura y la intensidad de luz (CAPÍTULO IV, PARTE II); la mayor demanda de la energía metabólica en las plantas que crecen en ambientes iluminados, traería aparejado una mayor tasa de respiración oscura y por lo tanto una mayor cantidad de ácidos que entrarían al proceso de respiración, tal como fuera discutido en el CAPÍTULO IV, PARTE II. Los menores contenidos de sólidos solubles y mayor acidez total titulable en los frutos crecidos bajo media intensidad de luz estarían indicando que los frutos estarían con un menor grado de madurez con respecto a aquellos que crecieron bajo alta intensidad de luz.

Los azúcares simples pudieron relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentaron 2,1 y 1,6 veces entre media y alta intensidad de luz en términos de peso fresco y peso seco respectivamente, al igual que lo observado para los sólidos solubles, hecho que también podría explicarse por la relación entre la síntesis de los fotosintatos y la intensidad de luz (Tognetti et al., 1998; Larcher, 2003), tal como se expresara en EL CAPÍTULO IV, PARTE II. Una disminución en los azúcares simples con una menor intensidad de luz se ha observado en frutos de *Vitis vinifera* (Dokoozlian y Kliewer, 1996). Los valores de azúcares simples encontrados en los

### Composición de los frutos

frutos en el tratamiento Alta 0 son comparables con los obtenidos en años anteriores en la población natural de *B. microphylla* (CAPÍTULO 1, PARTE II). La fibra dietaria total pudo relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentó 1,1 y 1,3 veces entre alta y media intensidad de luz en términos de peso fresco y peso seco respectivamente, encontrándose para la fibra dietaria insoluble la misma relación.

El ácido málico pudo relacionarse con la intensidad de luz ya que aumentó 1,6 y 1,8 veces entre alta y media intensidad de luz en términos de peso fresco y peso seco respectivamente. El ácido cítrico también pudo relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentó 1,2 veces entre alta y media intensidad de luz en términos de peso seco. Un aumento en el ácido málico pudo observarse al final de la maduración de los frutos de *Vitis vinifera* crecidos en ambientes sombreados (DeBolt et al., 2008). Es sabido además que en aquellas regiones más frescas, los frutos de *Vitis vinifera* producen frutos con mayores contenidos de ácido málico con respecto a los frutos crecidos en regiones más cálidas. Esta relación negativa entre la temperatura y el nivel de ácido málico es debida al efecto de la temperatura sobre el balance entre la síntesis de ácido málico (por la vía de la beta carboxilación del fosfoenolpiruvato) y su catabolismo durante la respiración y en particular sobre la actividad enzimática. Sin embargo, otras vías como una disminución en la traslocación desde las hojas a los frutos juegan un papel importante. Adicionalmente, la acumulación de potasio en los frutos suele resultar en la formación de sales de ácido málico y tartárico, dando una reducción del contenido de ácidos totales (Conde et al., 2007). En los frutos de *Ribes nigrum* también se ha encontrado una correlación negativa entre la temperatura y el contenido de ácido málico en los frutos (Toldam-Andersen y Hansen, 1997). Sin embargo, tal variación no se ha detectado para el ácido cítrico coincidiendo con lo encontrado para *Ribes nigrum* (Toldam-Andersen y Hansen, 1997). Al ser el ácido málico el más abundante entre los ácidos orgánicos cuantificados, también ha habido diferencias en los ácidos orgánicos totales. Los ácidos orgánicos totales pudieron relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentaron 1,4 y 1,6 veces entre alta y media intensidad de luz en términos de peso fresco y seco respectivamente y la relación ácido málico/cítrico pudo relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentó 1,6 veces entre alta y media intensidad de luz.

Las antocianinas pudieron relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentaron 2,9 veces entre media y alta intensidad en términos de peso fresco y peso seco, hecho que podría explicarse debido a la estrecha correlación entre esta variable y los sólidos solubles ( $r = 0,839$ ,  $p < 0,001$  para el año 2008/09) y el contenido de azúcares en los frutos ( $r = 0,964$ ,  $p < 0,001$  para el año 2008/09), y éstas a su vez con la tasa de fotosíntesis neta y la intensidad de luz que explicaría el aumento de las

### Composición de los frutos

antocianinas (CAPÍTULO 4, 7, PARTE II). Las condiciones precisas que desencadenan el inicio de la síntesis de antocianinas no fueron aún bien establecidas, pero sí es sabido que la acumulación de azúcares provee el sustrato necesario para la síntesis de antocianinas (Jackson, 2008). Una disminución en las antocianinas frente a una disminución de la intensidad de luz pudo observarse en frutos de *Ribes nigrum* (Šavikin et al., 2009) y *Vitis vinifera* (Cortell y Kennedy, 2006). El contenido de antocianinas en el tratamiento Alta 0 de la temporada 2008/09 (435 mg/100 g peso fresco de frutos) es comparable con los obtenidos en años anteriores en una población natural de *B. microphylla* y está de acuerdo con el estado de madurez de los frutos (CAPÍTULO 2, PARTE I). A su vez, los contenidos de antocianinas en el tratamiento Alta 0 de la temporada 2008/09 son similares a aquellos valores citados para *Berberis microphylla* del sur de Chile (Ruiz et al., 2010); sin embargo fueron superiores a aquellos determinados para otros berries como *Ribes nigrum* (350 mg/100 g peso fresco), *Rubus idaeus* (55-60 mg/100 g PF), *Fragaria ananassa* (40 mg/100 g peso fresco) (Lister et al., 2002), y *Vaccinium* sp. (1,2 mg/100 g peso fresco) (Zheng y Wang, 2003).

Los contenidos de fenoles también pudieron relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentaron 1,3-1,2 veces entre media y alta intensidad en términos de peso fresco y peso seco respectivamente, hecho que podría explicarse debido a la estrecha relación entre esta variable y las antocianinas ( $r = 0,776$ ;  $p = <0,001$ ) y con el contenido de azúcares en los frutos ( $r = 0,782$ ;  $p = <0,001$ ) para la estación de crecimiento 2008/09, y éstas a su vez con la tasa de fotosíntesis neta y la intensidad de luz que explicaría el aumento del contenido de fenoles (CAPÍTULO 4, 7, PARTE II).

Los contenidos de flavonoides en el tratamiento Alta 0 están de acuerdo con el estado de madurez de los frutos (CAPITULO 2, PARTE I). A su vez, los contenidos de flavonoides en el tratamiento Alta 0 son similares a aquellos valores citados para *Fragaria* sp. (30,0 y 123,2 mg de equivalentes de quercetina/100 g de peso fresco de frutas (Cheel et al., 2007). En los frutos de *B. microphylla*, el contenido de flavonoides fue negativa y significativamente correlacionado con los sólidos solubles ( $r = -0,354$ ;  $p = 0,034$ ).

Los contenidos de fenoles en el tratamiento Alta 0 están de acuerdo con el estado de madurez de los frutos (CAPITULO 2, PARTE I). Los contenidos fenólicos medidos en frutos maduros de *B. microphylla* en este estudio (26 a 41 mg/g peso seco) fueron comparables a los citados para *B. vulgaris* (Gundogdu, 2013), *Vaccinium myrtillus* (33 a 38 mg/g peso seco) (Kähkönen et al., 2001) y *Ribes nigrum* (1000 mg/100 g peso fresco) (Deighton et al., 2002), y superiores a los de otras bayas de color púrpura-rojizo, como *Ribes rubrum* (14 mg/g peso seco), *Fragaria ananassa* (16

### Composición de los frutos

a 24 mg/g peso seco) (Kähkönen et al., 2001), *Rubus idaeus* (300 mg/100 g peso fresco) (Lister et al., 2002), y otros frutos nativos de América del sur como *Fragaria* sp. (106 a 268 mg/100 g peso fresco) (Cheel et al., 2007).

La influencia de la luz sobre los flavonoides y fenoles determinados por medio de los métodos colorimétricos también se observa sobre el perfil de estos metabolitos secundarios, aunque sin evidenciarse diferencias significativas.

El efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor pudieron relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentaron ambas 1,2 veces entre media y alta intensidad de luz, hecho que podría explicarse debido a la estrecha relación entre estas variables y los contenidos de antocianinas ( $r = 0,697$ ;  $p = <0,001$  y  $r = 0,533$ ;  $p = <0,001$ , respectivamente). También el efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor pudieron correlacionarse positiva y significativamente con el contenido de fenoles ( $r = 0,822$ ;  $p = <0,001$  y  $r = 0,646$ ;  $p = <0,001$ , respectivamente), como se constató en *Diospyros kaki* L. cv. Mopán (Chen et al., 2008), en *B. vulgaris* y *B. croatica* (Koncic et al., 2010). El efecto secuestrador de DPPH observado en *B. microphylla* fue comparable al reportado para los frutos de *B. vulgaris* (Motalleb et al., 2005) y de la corteza de *B. koreana* (Qadir et al., 2009). El efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor de los antioxidantes estándar fue efectivo a concentraciones más bajas (0,10 mg/ml a 0,75 mg/ml, respectivamente) que los extractos metanólicos de los frutos (CAPÍTULO 2, PARTE I). Una correlación positiva y significativa entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante medida a través del ensayo de TEAC fue observada en las frutas *B. microphylla* (Ruiz et al., 2010).

La concentración efectiva a la que los radicales DPPH fueron secuestrados en un 50% y a la que el poder reductor fue del 50% también pudieron relacionarse con la intensidad de luz dado que aumentaron 1,5 y 1,2 veces entre alta y media intensidad de luz respectivamente, relacionándose con lo observado para el efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor.

Las diferencias en los contenidos de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante también podrían explicarse por las diferencias en la ocurrencia de las fases fenológicas (CAPÍTULO 2, PARTE II), por el diferente contenido foliar de nutrientes como el carbono y la relación carbono/nitrógeno (CAPÍTULO 3, PARTE II) y actividad fotosintética (CAPÍTULO 4, PARTE II) frente al gradiente de la intensidad de luz ensayado.

**Cambios la composición de los frutos con el nivel de fertilización**

Los sólidos solubles pudieron relacionarse con el nivel de fertilización dado que aumentaron 1,1 veces entre el nivel de fertilización 0 y 2, hecho que podría explicarse por un lado debido a que los frutos sin fertilización (nivel 0) tuvieron un menor contenido de materia seca y mayor contenido de agua, por lo que los sólidos solubles podrían directamente ser menores por simple dilución de los mismos. A su vez, por otro lado dado que la tasa de fotosíntesis neta aumentó con los niveles de fertilización en alta intensidad de luz, esto podría redundar en una mayor síntesis de fotoasimilados (CAPÍTULO 4, PARTE II). Por otro lado, el potasio es el catión más abundante en los frutos de *Vitis* que contribuye al balance de cargas y puede estar envuelto en el transporte de azúcares (Spayd et al., 1993). El potasio reduce los niveles de ácidos en estos frutos e interactúa con el ácido tartárico para formar bitartarato de potasio el cual tiene una solubilidad limitada (Lang, 1983). Un aporte elevado de potasio incrementa los sólidos solubles y disminuye la acidez total titulable de los frutos de *Vitis* (Martin et al., 2004; Abd El-Razek et al., 2011), al igual que lo encontrado para los frutos de *B. microphylla*. Sin embargo, el aporte de potasio aumentó la acidez total titulable y la de ácido málico en los frutos de *Prunus* sp. (Lobit et al., 2006). El efecto de niveles crecientes de nitrógeno, fósforo y potasio sobre los sólidos solubles ha sido contradictorio y dependiente de la especie. En *Vaccinium angustifolium* (Albert et al., 2011) y *Vitis vinifera* (Martin et al., 2004) niveles crecientes de nitrógeno, fósforo y potasio aumentaron los valores de los sólidos solubles, mientras que en *Aronia melanocarpa* y *Malus domestica* (Jeppsson, 2000) produjeron una disminución de los mismos. La acidez total titulable y el pH también pudieron relacionarse con el nivel de fertilización dado que la acidez total titulable aumentó 1,4 veces entre el nivel de fertilización 2 y 0 y el pH aumentó 1,02 veces entre el nivel de fertilización 0 y 2. Una disminución en la acidez total titulable fue encontrada en frutos de *Aronia melanocarpa* (Jeppsson, 2000), mientras que no hubo ninguna correlación entre ambas variables en los frutos de *Malus domestica* y *Pyrus communis* (Raese, 1997; Raese y Drake, 1997).

La fibra dietaria total y la fibra dietaria soluble pudieron relacionarse con el nivel de fertilización dado que aumentaron 1,1 y 1,4 veces en términos de peso fresco entre el nivel de fertilización 2 y 0, hecho que podría explicarse por el diferente grado de madurez de los frutos.

El contenido de ácido málico pudo relacionarse con el nivel de fertilización dado que aumentó 1,4 veces entre el nivel de fertilización 2 y 0 en términos de peso seco. Además, la relación ácido málico/ácido cítrico pudo relacionarse con el nivel de fertilización dado que aumentó 1,6 veces entre el nivel de fertilización 2 y 0. Estos

## Composición de los frutos

resultados se podrían explicar debido al diferente grado de madurez alcanzado por los frutos, observándose que los frutos formados en aquellas plantas sin fertilización presentan un menor grado de madurez con respecto a aquellos formados con el mayor aporte de fertilizante.

Las diferencias en los contenidos de los hidratos de carbono y ácidos orgánicos también podrían explicarse por las diferencias en la ocurrencia de las fases fenológicas (CAPÍTULO 2, PARTE II).

Si bien las antocianinas no variaron significativamente con el nivel de fertilización, se observaron interacciones significativas, aumentando con el nivel de fertilización en presencia de alta intensidad de luz, hecho que podría estar en estrecha vinculación con la tasa de fotosíntesis neta y la síntesis de fotoasimilados (CAPÍTULO 4, PARTE II). El rol del nitrógeno en la coloración de los frutos es conocido, en donde excesivos niveles de nitrógeno suelen retrasar la maduración de los frutos (Kéller y Hrazdina, 1998.), los que resultan pobremente coloreados (Kliwer, 1977; Spayd et al., 1994). Además, un incremento en el crecimiento vegetativo compite fuertemente con la traslocación de los azúcares y con la acumulación de pigmentos en los frutos (Abd El-Razek et al., 2011). Una nutrición adecuada de potasio ayuda a aumentar tanto el color como el contenido polifenólico de los frutos (Sommers, 1977). Davenport (1996) no ha encontrado ninguna correlación entre el nivel de fertilización y el contenido de antocianinas en *Vaccinium*, al igual que Alleyne y Clark (1997) en *Rubus*. En *Vitis vinifera* (Martin et al., 2004) niveles crecientes de nitrógeno aumentaron los valores del contenido de antocianinas, con relación a los tratamientos sin nitrógeno.

Los flavonoides y los fenoles pudieron relacionarse con el nivel de fertilización dado que aumentaron 1,8 veces entre el nivel de fertilización 2 y 0 en términos de peso fresco y seco, respectivamente para el caso de los flavonoides, mientras que para los fenoles lo hicieron 1,2 veces entre el nivel de fertilización 0 y 2 en términos de peso fresco y seco, respectivamente. Estos resultados son coincidentes con los encontrados en *Fragaria x ananassa* Duch., en donde los contenidos de quercitina, kaemperol y ácido egálico fueron mayores a bajos niveles de fertilización (Anttonen et al., 2006). La influencia del nivel de fertilización sobre los flavonoides y fenoles determinados por medio de los métodos colorimétricos también se observa sobre el perfil de estos metabolitos secundarios, aunque sin mostrar diferencias significativas. Es así que por ejemplo el contenido de catequina mostró una clara tendencia a aumentar sin fertilización, ocurriendo lo contrario para el caso de la rutina.

El efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor pudieron relacionarse con el nivel de fertilización dado que aumentaron 1,1 y 1,3 veces entre los niveles de fertilización 0 y 1, respectivamente, hecho que podría explicarse debido a la

## Composición de los frutos

estrecha relación entre esta variables y los contenidos de fenoles, como se describió más arriba. La concentración efectiva para DPPH y el poder reductor no pudieron relacionarse estadísticamente con el nivel de fertilización pero sí se observó una tendencia relacionada con las variables efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor.

### Cambios en la composición de los frutos con la estación de crecimiento

Los sólidos solubles, la acidez total titulable, la relación de ambos y el pH pudieron relacionarse con la estación de crecimiento, siendo los valores de estas variables máximos en la estación de crecimiento 2008/09, a excepción de la acidez total titulable, hecho que podría explicarse debido a las condiciones ambientales diferenciales entre ambas estaciones de crecimiento (CAPÍTULO 1, PARTE II).

Es sabido que el crecimiento y composición de los frutos varía entre estaciones de crecimiento y condiciones ambientales (Biale, 1950; Boynton y Wilde, 1959; Kramer y Kozlowski, 1979; Predieri y Dris, 2005). Los efectos de las condiciones ambientales y culturales tanto en el contenido de azúcares como de antocianinas han sido descritos (Keller y Hrazdina, 1998; Bisson, 2001). Los mayores contenidos de sólidos solubles y de la relación sólidos solubles y acidez total titulable en 2008/09 podrían relacionarse con las mayores temperaturas de ese período comparadas con 2009/10. Es sabido también que la temperatura es un factor limitante del ritmo de la fotosíntesis en las plantas, por lo que a mayores temperaturas los fotoasimilados son producidos en un ritmo mayor, lo que hace posible un incremento en la translocación desde las hojas a diferentes destinos, incluyendo los frutos (Madore y Lucas, 1995; Zamski y Schaffer, 1996). En especies del género *Ribes*, se encontraron correlaciones entre las variables mencionadas y las condiciones climáticas (Toldam-Andersen y Hansen, 1993).

Los ácidos fumáricos y málico pudieron relacionarse con la estación de crecimiento dado que aumentaron 2,8, y 1,3 veces entre 2008/09 y 2009/10 en términos de peso fresco y seco respectivamente, mientras que los ácidos orgánicos totales aumentaron 1,2 veces entre 2008/09 y 2009/10 en términos de peso fresco, mientras que la relación ácido málico/cítrico lo hizo 1,3 entre las mismas estaciones de crecimiento. Un incremento en las temperaturas durante el crecimiento de los frutos disminuye *tanto* la acidez total titulable como los contenidos de ácido málico y cítrico en frutos de *Vitis vinifera* y *Musa* sp. (Etienne et al., 2013). La acumulación de estos dos ácidos es el resultado de la interacción entre el metabolismo y el almacenamiento vacuolar de los mismos. Sin embargo, la totalidad de los ácidos orgánicos no parece tener la misma sensibilidad a las temperaturas, como parece haber ocurrido con el ácido cítrico, oxálico y tartárico en los frutos de *B. microphylla*.

**Composición de los frutos**

Las diferencias en los contenidos de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante también podrían explicarse por las diferencias en las condiciones ambientales entre las estaciones de crecimiento (CAPÍTULO I, PARTE II) y en las fases fenológicas (CAPÍTULO II, PARTE II). Cabe destacar que el mayor contenido de flavonoides en 2009/10 estaría abonando esta afirmación.

## CONCLUSIONES

La composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los frutos de *B. microphylla* mostraron cambios con la intensidad de luz y el nivel de fertilización, a su vez que los tres primeros también con la estación de crecimiento.

Los frutos de las plantas cultivadas bajo intensidad de luz alta y con mayor temperatura del aire y del suelo, y con los niveles de fertilización 1 y 2 presentaron el mayor contenido de sólidos solubles, azúcares simples, antocianinas y fenoles totales. A su vez, los frutos de las plantas cultivadas bajo dichas condiciones presentaron la menor acidez total titulable, y en particular los menores contenidos de ácido málico y relación ácido málico/ácido cítrico, así como de fibra dietaria total. Los frutos presentaron el mayor contenido de sólidos solubles, azúcares simples, fibra dietaria total, antocianinas y fenoles totales en la estación de crecimiento 2008/09, mientras que la mayor acidez total titulable, y en particular los mayores contenidos de ácido málico y relación ácido málico/ácido cítrico, así como los flavonoides los alcanzaron en 2009/10. El efecto secuestrador de los radicales DPPH fue máximo en los frutos de las plantas cultivadas bajo intensidad de luz alta.

Los cambios observados en la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y en parte en la actividad antioxidante se pudieron relacionar con las condiciones ambientales de los tratamientos y con los niveles de fertilización, y de manera consistente con la fenología de las plantas, la relación peso/superficie foliar, el contenido de carbono foliar, la relación de clorofila A/B en las hojas, la tasa de fotosíntesis neta, el rendimiento y crecimiento de los frutos, indicando que las plantas presentan una capacidad de aclimatación en la composición de los frutos a dichas condiciones de crecimiento.

Las relaciones descritas podrían además explicar los máximos valores del efecto secuestrador de los radicales DPPH y el poder reductor, y la contribución de los flavonoides y el contenido fenólico que son responsables, al menos en parte de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *B. microphylla*.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

Las plantas de *B. microphylla* cultivadas en macetas bajo tres intensidades de luz (24, 57 y 100% de la luz natural) y con tres niveles de fertilización inorgánica (0,0; 3,4 y 6,7 g de fertilizante por planta), mostraron cambios en la fenología, en los contenidos de nutrientes y pigmentos foliares, en la actividad fotosintética, en la producción y crecimiento del fruto, y en la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los frutos. Dicho cambios se pudieron relacionar con las condiciones ambientales de los tratamientos y de las estaciones de crecimiento y con los niveles de fertilización, poniendo en evidencia la presencia de una capacidad de aclimatación a dichas condiciones de crecimiento y desarrollo, también llamada plasticidad fenotípica o adaptación fenotípica. La intensidad de luz del 24% resultó ser limitante para la biología reproductiva de las plantas.

Las plantas cultivadas bajo un 100% de intensidad de luz (alta), con mayor temperatura del aire y del suelo y con 3,4 g de fertilizante por planta (nivel 1) presentaron:

- adelantamiento de algunas fases fenológicas, manifestándose la fase de flor abierta en la primera semana de noviembre (75%) y la de fructificación en la cuarta semana del mismo mes (85%) de la estación de crecimiento 2008/09
- Las hojas presentaron los mayores contenidos foliares de carbono (47,7%), una relación clorofila A/B de 3,1 y una elevada tasa de fotosíntesis neta ( $2,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- Elevado rendimiento de frutos por planta y por producción o rama fructífera (6,4 y 0,70 g peso fresco respectivamente).
- Frutos con el máximo peso fresco (433 mg) y elevados contenidos de sólidos solubles (16,2%), antocianinas (298 mg/100g PFF) y fenoles totales (835 mg/100 g PFF), con una elevada actividad de secuestro de radicales DPPH a 0,75 mg/ml.

El crecimiento de los frutos y la composición cuali-cuantitativa de los hidratos de carbono, los ácidos orgánicos, los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los frutos obtenidos en las plantas en el cultivo experimental, mostraron valores similares a los obtenidos en los frutos de la población natural de las cercanías de Ushuaia, confirmando que los frutos de *B. microphylla* poseen una excelente actividad antioxidante, una propiedad que puede contribuir a la calificación de su valor funcional y de aplicabilidad industrial.

### **Conclusiones generales**

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuirán a la interpretación de los comportamientos observados en el crecimiento y fructificación de las plantas de *B. microphylla* que crecen naturalmente en los diferentes ambientes de la Patagonia, y su relación con un escenario posible de cambio climático, y también para la posterior selección de genotipos y mejoramiento de la especie. Además estos aportes serán de tener en cuenta en la planificación del manejo agronómico de estos arbustos, particularmente con respecto a la intensidad de luz, ya que la misma puede verse afectada por la distancia inicial de plantación y las intensidades de las operaciones de poda, así como con relación al plan de fertilización.

**BIBLIOGRAFIA**

- Abd El-Razek, E, Treutter, D, Saleh, MMS, El-Shammaa, M, Fouad Amara, A, Abdel-Hamid, N. 2011. Effect of nitrogen and potassium fertilization on productivity and fruit quality of 'crimson seedless' grape. *Agric Biol J North Amer* 2(2): 330-340.
- Albert, T, Karp, K, Starast, M, Moor, U, Paal, T. 2011. Effect of fertilization on the lowbush blueberry productivity and fruit composition in peat soil. *J Plant Nutr* 34 (10): 1489-1496.
- Albrecht, C, Pellarin, G, Rojas, MJ, Albesa, I, Eraso, AJ. 2010. Beneficial effect of *Berberis buxifolia* Lam, *Zizyphus mistol* Griseb and *Prosopis alba* extracts on oxidative stress induced by chloramphenicol. *Medicina-Buenos Aires* 70(1): 65-70.
- Alleyne, V, Clark, JR. 1997. Fruit composition of 'Arapho' blackberry following nitrogen fertilization. *HortSci* 32: 282-283.
- Alonso, J, Desmarchelier, C. 2006. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Fitotecnia Ed. 680 p. Buenos Aires, Argentina.
- Ammer, C. 2003. Growth and biomass partitioning of *Fagus sylvatica* L. and *Quercus robur* L. seedlings in response to shading and small changes in the R/FR-ratio of radiation. *Ann For Sci* 60:163-171.
- Anttonen, MJ, Hoppula, KI, Nestby, R, Verheul, MJ, Karjalainen, RO. 2006. Influence of Fertilization, Mulch Color, Early Forcing, Fruit Order, Planting Date, Shading, Growing Environment, and Genotype on the Contents of Selected Phenolics in Strawberry (*Fragaria* ♂ *ananassa* Duch.) Fruits. *J Agric Food Chem* 54: 2614-2620.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed.; Horowitz, W., Ed.; Association of Official Analytical Chemists International: Gaithersburg, MD.
- Aranda, I, Robson, TM, Rodríguez-Calcerrada, J, Valladares, F. 2008. Limited capacity to cope with excessive light in the open and with seasonal drought in the shade in Mediterranean *Ilex aquifolium* populations. *Trees* 22: 375-384.
- Arena, ME, Martínez Pastur, G. 1994. Seed propagation of *Berberis buxifolia* Lam. *Phyton* 56(XII): 59-63.
- Arena, ME, Martínez Pastur, G. 1995. Propagación de frutales menores nativos de los bosques Andino-Patagónicos: El Calafate. *Presencia X* (37): 5-7.
- Arena, ME, Radice, S. 2014. Shoot growth and development of *Berberis buxifolia* Lam. in Tierra del Fuego (Patagonia). *SciHortic* 165: 5-12.

## Bibliografía

- Arena, ME, Vater, G. 2003. Fertilisation and growing condition affect fruit production of *Berberis buxifolia* Lam. in Tierra del Fuego, Argentina. HortSci 38 (5): 276.
- Arena, ME, Vater, G. 2005. Native and introduced species of small fruits in Austral Patagonia, Tierra del Fuego. En: "Fruits: Growth, Nutrition, and Quality". Editor: Dris R. (WFL Publisher, Helsinki, Finlandia). ISBN: 952-99555-0-2. 220 pág.
- Arena, ME, Vater, G, Peri, P. 1998. Propagación por rizomas de *Berberis* de la Patagonia Austral. IX Congreso Latinoamericano de Horticultura. XLIX Congreso Agronómico de Chile. 30 de Noviembre al 3 de Diciembre de 1998. Santiago, Chile.
- Arena, ME, Vater, G, Peri P. 2003. Fruit production of *Berberis buxifolia* Lam in Tierra del Fuego. HortSci 38(2): 200-202.
- Arena, ME, Giordani, E, Radice, S. 2011. Flowering, fruiting and leaf and seed variability in *Berberis buxifolia*, a native Patagonian fruit species. En: Native Species: Identification, Conservation and Restoration. Nova Sciences Publishers, New York. Pág 117-136. ISBN: 978-1-61470-613-7. 176 pág. Editores: L. Marin and D. Kovac.
- Arena, ME, Giordani, E, Radice, S. 2013. Phenological growth and development stages of the native Patagonian fruit species *Berberis buxifolia* Lam. J Food Agric Environ Vol.11 (3&4): 1323-1327.
- Arribillaga García, D. 2001. Domesticación del calafate (*Berberis buxifolia* Lam.) para fines agroindustriales. INIA, Chile. 137 p
- Aussenac, G. 2000. Interactions between forest stands and microclimate: ecophysiological aspects and consequences for silviculture. Ann For Sci 57: 287-301.
- Austin, AT, Sala, OE 2002. Carbon and nitrogen dynamics across a natural precipitation gradient in Patagonia, Argentina. J Veg Sci 13: 351–360.
- Baquadano, FJ, Castillo, FJ. 2006. Comparative ecophysiological effects of drought on seedlings of the Mediterranean water-saver *Pinus halepensis* and water-spenders *Quercus coccifera* and *Quercus ilex*. Trees 20: 689–700.
- Béliveau, R, Gingras, D. 2005. Les aliments contre le cancer. Éditions TRÉCARRÉ. ISBN: 2-89568-255-0.
- Bepete, M, Lakso, AN. 1998. Differential effects of shade on early-season fruit and shoot growth rates in "Empire" apples. Sci Hortic 102 (4): 823-825.
- Biale, JB. 1950. Postharvest physiology and biochemistry of fruits. Ann Review Plant Physiol 1: 183-206.
- Bidwell, RGS. 1974. Plant physiology. Macmillan/McGraw-Hill School Division. 643 pág.

- Bisson, L. 2001. In search of optimal grape maturity. Department of Enology & Viticulture, UC Davis. [www.practicalwinery.com/julaug01p32.htm](http://www.practicalwinery.com/julaug01p32.htm).
- Bloom, AJ, Chapin, FS, Mooney, HA 1985. Resource limitation in plants - an economic analogy. *Annu Rev Ecol Syst* 16: 363-392.
- Boardman, NK. 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Rev Plant Physiol* 28: 355-377.
- Boldingh, H, Smith, GS, Klages, K. 2000. Seasonal concentrations of non-structural carbohydrates of five *Actinidia* species in fruit, leaf and fine root tissue. *Ann Bot* 85: 469-476.
- Bottini, MCJ. 2000. Estudios multidisciplinarios en las especies patagónicas argentinas del género *Berberis* L. (Berberidaceae). Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 223 páginas.
- Bottini, MCJ, Bustos, C, Bran, D. 1993: Arbustos de la Patagonia, Calafates y Michay. *Presencia* 8 (30): 5-9.
- Bottini, MCJ, Greizertein, EJ, Poggio, L. 1999. Poliploidy levels and their relationships with the rainfall in several populations of Patagonian species of *Berberis* L. *Caryologia* 52 1, 2: 75-80.
- Bottini, MCJ, Greizertein, EJ, Aulicino, MB, Poggio, L. 2000. Relationships among genome size, environmental conditions and geographical distribution in natural populations of NW Patagonian species of *Berberis* L. (Berberidaceae). *Ann Bot* 86: 565-573.
- Bottini, MCJ, De Bustos, A, Sanso, AM, Jouve, N, Poggio, L. 2007. Relationships in Patagonian species of *Berberis* (Berberidaceae) based on the characterization of rDNA internal transcribed spacer sequences. *Bot J Lin Soc* 153: 321–328.
- Boulton, RB, Singleton, VL, Bisson, LF, Kunkee, RE, 1996. Principles and Practices of Winemaking, Chapman and Hall, New York, 604 pp.
- Bourgau, F, Gravot, A, Milesi, S, Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci* 161: 839–851.
- Boynton, D, Wilde, MH, 1959. Development of the black raspberry fruit. I. Seasonal increases in gross volume, dimension and dry weight. *Proc Amer Soc Hort Sci* 73: 158-163.
- Bramorski, A, Da Rosa Cherem, A, Mezdari, T, Melo, SS, Deschamps, FC, Gonzaga, LV, Rockenbach, II, Fett, R. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil. *Food Res Int* 4 (7): 2134-2138.
- Brummell, DA, 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct Plant Biol* 33: 103–119.

## Bibliografía

- Brummell, DA, Harpster, MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 47: 311–340.
- Casamiquela, RM. 2001. Proyecto etnobotánico de la Patagonia, primer informe. Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Centro Nacional Patagónico (CENPAT), Puerto Madryn.
- Çelik, H, Özgen, M, Serçe, S, Kaya, C. 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *SciHortic* 117: 345–348.
- Chapin III, FS, Matson, PA, Mooney, HA. 2002. Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer-Verlag, New York. 398 pág.
- Chapin III, FS, Matson, PA, Vitousek, PM. 2011. Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer. New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 544 pág.
- Cheel, J, Theoduloz, C, Rodríguez, JA, Caligari, PDS, Schmeda-Hirschmann, G. 2007. Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. *Food Chem* 102: 36-44.
- Chen, XN, Fan, JF, Yue, X, Wu, XR, Li, LT. 2008. Radical Scavenging activity and phenolic compounds in Persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan). *J Food Sci* 73 (1): 24-28.
- Chorti, E, Guidoni, S, Ferrandino, A, Novello, V. 2010. Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in nebbiolo grapes. *Am J Enol Viticult.* 61: 23-30.
- Cohen, S, Raveh, E, Li, Y, Grava, A, Goldschmidt, EE. 2005. Physiological responses of leaves, tree growth and fruit yield of grapefruit trees under reflective shade screens. *SciHortic* 107: 25-35.
- Conde, C, Silva, P, Fontes, N, Dias, ACP, Tavares, RM, Sousa, MJ, Agasse, A, Delrot, S, Gerós, H. 2007. Biochemical Changes throughout Grape Berry development and Fruit and Wine Quality. *Food* 1 (1): 1-22.
- Conradie, WJ, Saayman, D. 1989: Effects of long-term nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization on Chenin blanc vines. I. Nutrient demand and vine performance. *Am J Enol Vitic* 40: 85-90.
- Coombe, BG, 1976. The development of fleshy fruits. *Ann Rev Plant Physiol* 27: 507-528.
- Coombe, BG, McCarthy, M. 2000. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Aust J Grape Wine Res.* ISSN 1322-7130, Vol. 6, N° 2, pp. 131-135.

## Bibliografía

- Corelli-Grappadelli, L. 2003. Light relations. p. 195-216. In Ferree, DC and IJ Warrington (eds.) Apples: Botany, production and uses. CAB International, Wallington, Oxford, UK.
- Cortell, JM, Kennedy, JA. 2006. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. J Agric Food Chem 54 (22): 8510-20.
- Damesin, C. 2003. Respiration and photosynthesis characteristics of current-year stems of *Fagus sylvatica*: From the seasonal pattern to an annual balance. New Phytologist 158: 465–475.
- Davenport, JR. 1996. The effect of nitrogen fertilizer rates and timing on cranberry yield and fruit quality. J Amer Soc Hort Sci 12(6):1089–1094.
- DeBolt, S, Ristic, R, Iland, PG, Ford, ChM. 2008. Altered light interception reduces grape berry weight and modulates organic acid biosynthesis during development. HortSci 43(3): 957–961.
- Deighton, N, Stewart, D, Davies, HV, Gardner, PT, Duthie, GG, Mullen, W, Crozier, A 2002. Soft fruit as sources of dietary antioxidants. Acta Hort 585: 459-465.
- Dokoozlian, NK, Kliewer, WM. 1996. Influence of Light on Grape Berry Growth and Composition Varies during Fruit Development. J Amer Soc Hort Sci 121(5): 869–874.
- Dufault, RJ, Ward, BK. 2009. Further attempts to enhance forced 'Sweet Charlie' strawberry yield through manipulation of light quality in high tunnels. Int J Fruit Sci 9: 409-418.
- Dussi, MC, Giardina, G, Sosa, D, González Junyent, R, Zecca, A, Reeb, P. 2005. Shade nets effect on canopy light distribution and quality of fruit and spur leaf on apple cv. Fuji. Span. J Agric Res 3: 253-260.
- El-Zoghbi, M. 1994. Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. Food Chem 49: 33-37.
- Etienne, A, Génard, M, Lobit, P, Mbeguié-A- Mbeguié, D, Bugaud, C. 2013. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. J Exp Bot 64 (4): 1451-1469.
- Evans, JR, Poorter, H. 2001. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: The relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. Plant Cell & Env 24: 755–767.
- Evans, CA, Miller, EK, Friedland, AJ. 2001. Effect of nitrogen and light on nutrient concentrations and associated physiological responses in birch and fir seedlings. Plant Soil 236: 197–207.

## Bibliografía

- Fajardo Morales, V. 1987. Estudio químico de las especies chilenas del género *Berberis*. Rev Lat Quím: 18: 46-50.
- Fajardo Morales, V, Podestá, F, Urzúa, A. 1986. Reseña de los alcaloides encontrados en el género *Berberis* de Chile. Rev Lat Quím: 16: 141-156.
- FAO/WHO, 2003. World Health Organization/Food and Agriculture Organization (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series 916. WHO. Geneva: 147-149.
- Fernqvist, I. 1961. Blombiologiska undersökningar hos svarta och röda vinbär samt krusbär. Kungligan Skogs och Lantbruks-Akademiens Tidskrift 100: 357-397.
- Ferreira, RM, Viña, SZ, Mugridge, A, Chaves, AR. 2007. Growth and ripening effects on antioxidant capacity on strawberry cultivar Selva. SciHortic 112: 27-32.
- Field, C, Mooney, HA. 1983. Leaf age and seasonal effects on light, water, and nitrogen use efficiency in a California shrub. Oecologia 56: 348-355.
- Field, C, Mooney, HA. 1986. The photosynthesis - nitrogen relationship in wild plants. In: On the Economy of Plant Form and Function, ed. T. J. Givnish, pp. 25-55. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fleckinger, J. 1955. Phenologie et arboriculture frutiére. Bon Jardinier 1,362-372.
- Forney, CF, Kalt, W, Jordan, MA, Vinqvist-Tymchuk, MR, Fillmore, SAE. 2012. Compositional changes in blueberry and cranberry fruit during ripening. Acta Hort 926: 331-338.
- Fredes, C. 2009. Antioxidantes en berries nativos chilenos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas Vol 8 (6): 469-478. Universidad de Santiago de Chile, Chile.
- Fremlin, KM, Mc Laren, JR, De Sandoli, L, Turkington, R. 2011. The effects of fertilization and herbivory on the phenology of the understory vegetation of the boreal forest in northwestern Canada. Artic Antarctic Alpine Res 43 (3): 389-396.
- Galloway, LF, Burgess, K. 2012. Artificial selection on flowering time: influence on reproductive phenology across natural light environments. J Ecol 100: 852-861.
- Gambineri, F. 2012. Studio e caratterizzazione di popolazioni spontanee di calafate (*Berberis buxifolia* Lam.) in Tierra del Fuego (Argentina). Tesi di Laurea Magistrale. Università degli studi di Ferenze. Facoltà di Agraria. 43 páginas.
- García-Carbonell, S, Yagüe, B, Bleiholder, H, Hack, H, Meier, U, Agustí, M. 2002. Phenological growth stages of the persimmon tree (*Diospyros kaki*). Ann Appl Biol 141: 73-76.
- Gehring, H, Kasemir, H, Mohr, H. 1977. The capacity of chlorophyll-a biosynthesis in the mustard seedling cotyledons as modulated by phytochrome and circadian rhythmicity. Planta: 133: 295-302.

## Bibliografía

- Gil-Albert Velarde, F. 2006. Tratado de arboricultura frutal. Vol 1: Morfología y fisiología del árbol frutal. Mundi Prensa, Madrid, España. 104 p.
- Giusti, MM, Wrolstad, RE 2001. Unit F1.2.1-13: Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: Wrolstad RE (ed) Currents Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons: New York.
- Gonzalez-San José, ML, Barron, LJR, Diez, C, 1990. Evolution of anthocyanins during maturation of Tempranillo grape cultivar (*Vitis vinifera*) using polynomial regression models. J Sci Food Agric 51: 337-344.
- Gonzales, WL, Suárez, LH, Molina-Montenegro, MA, Gianoli, E. 2008. Water availability limits tolerance of apical damage in the Chilean tarweed *Madia sativa*. Acta Oecol 34.
- Gordon, A, Schadow, B, Quijano, CE, Marx, F. 2011. Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Melastomataceae). Food Res Int doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.015.
- Gracia Nava Manuel Alejandro, <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56> 1UAQ Garcia Nava. pdf (último acceso 20 de noviembre de 2011).
- Griffin, JJ, Ranney, TG, Pharr, DM. 2004. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and carbohydrate content of *Illicium taxa* grown under varied irradiance. J Am Soc Hort Sci 129: 46–53.
- Gundogdu, M. 2013. Determination of antioxidant capacities and biochemical compounds of *Berberis vulgaris* L. fruits. Adv Environ Biol 7 (2): 344-348.
- Häkkinen, SH, Kärenlampi, SO, Mykkänen, HM, Törrönen, AR. 2000. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. J Agric Food Chem 48 (7): 2960-2965.
- Harker, FR, Redgwell, RJ, Hallett, IC, Murray, SH, Carter, G. 1997. Texture of fresh fruit. Horticult Rev (Am Soc Horticult Sci) 20: 121–124.
- Harris, JM, Kriedemann, PE, Possingham, JV. 1968. Anatomical aspects of grape berry development. Vitis 7: 106-109.
- He, F, Mu, L, Yan, G-L, Liang, N-N, Pan, Q-H, Wang, J, Reeves, MJ, Duan, C-Q. 2010. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. Molecules 15: 9057-9091. doi:10.3390/molecules15129057.
- Heinemann, K, Kitzberger, T, Veblen, T. 2000. Influences of gap microheterogeneity on the regeneration of *Nothofagus pumilio* in a xeric old-growth forest of Northwestern Patagonia, Argentina. Can J For Res 30: 25–31.
- Hieke, S, Menzel, CM, Ludders, P. 2002. Effect of leaf, shoot and fruit development on photosynthesis of lychee trees (*Litchi chinensis*). Tree Physiol. 22: 955–961.

## Bibliografía

- Hogan, KP, Fleck, I, Bungard, R, Cheeseman, JM, Whitehead, D. 1997. Effect of elevated CO<sub>2</sub> on the utilization of light energy in *Nothofagus fusca* and *Pinus radiata*. J Exp Bot 311: 1289–1297.
- Hou, DX. 2003. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. Curr Mol Med 3: 149–15.
- Huang, Y, Zhao, X, Zhou, D, Wang, T, Li, G, Li, Q. 2013. Biomass allocation to vegetative and reproductive organs of *Chenopodium acuminatum* Willd. under soil nutrient and water stress. Bangladesh J Bot 42(1): 113-121.
- Iriondo, JM, 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Revista de Investigación Agraria, Serie: Producción y Protección Vegetales 16 (1): 5–24.
- Jackson RS 2008. Wine science: principles and applications. Elsevier Ed. 751 p.
- Jakopic, J, Veberic, R, Stampar, F. 2007. The effect of reflective foil and hail nets on the lighting, color and anthocyanins of 'Fuji' apple. Sci Hortic 115: 40-46.
- Jeppsson, N. 2000. The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking'. Sci Hortic 83: 127-137.
- Job, MM, 1942. Los *Berberis* de la región del Nahuel-Huapi. Rev del Museo de la Plata (Sección Botánica) 5: 21-72.
- Kähkönen, MP, Hopia, AI, Vuorela, HJ, Rauha, J-P, Pihlaja, K, Kujala, TS, Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem 47: 3954-3962.
- Kähkönen, MP, Hopia, AI, Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. J Agric Food Chem 49: 4076-4082.
- Katahata, S-I, Naramoto, M, Kakubari, Y, Mukai, Y. 2007. Seasonal changes in photosynthesis and nitrogen allocation in leaves of different ages in evergreen understory shrub *Daphniphyllum humile*. Trees – Structure and Function 21: 619–629.
- Kéller, M, Hrazdina, G. 1998. Interaction of Nitrogen Availability During Bloom and Light Intensity During Veraison. II. Effects on Anthocyanin and Phenolic Development During Grape Ripening. Am J Enol Vitic 49 (3): 341-349.
- Kendrick, RE, Kronenberg, GHM. 1994. Photomorphogenesis in Plants. Berlin: Springer.
- Kennedy, JA. 2002. Understanding berry development. *Practical Winery and Vineyard* July/August. <http://www.practicalwinery.com/JulyAugust02/julaug02p14.htm>
- Kliewer, WM. 1977. Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. Am J Enol Vitic 28 (2): 96-103.

## Bibliografía

- Knapp, AK, Smith, WK. 1987. Stomatal and photosynthetic responses during sun/shade transitions in subalpine plants: influence on water use efficiency. *Oec* 74: 62-67.
- Kneeshaw, DD, Kobe, RK, Coates, D, Messier, C. 2006. Sapling size influences shade tolerance ranking among southern boreal tree species. *J Ecol* 94: 471–480.
- Koncic, MZ, Kremer, D, Karlovic, K, Kosalec, I. 2010. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxic* 48(8-9): 2176-2180.
- Kramer, PJ, Kozlowski, TT. 1979. *Physiology of Woody Plants*. Academic Press, New York, p. 811.
- Kuskoski, EM, Asuero, AG, Troncoso, AM, Mancini-Filho, J, Fett, R. 2005. Aplicación de diversos Métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciën Tec Alimen, Campinas* 25 (4): 726-732.
- Lajolo, F, Saura-Calixto, F, Wittig De Penna, Wenzel De Meneses, E. 2001. Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Ed. Librería Varela. 469 p.
- Landrum, LR. 1999. Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and adjacent Southern Argentina. *Ann Missouri Bot Gard* 86 (4): 793-834.
- Lang, A. 1983: Turgor- related translocation. *Plant Cell Envir* 6: 683-689.
- Lambers, HF, Chapin III, S, Pons, TL. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer Verlag, New York, New York, USA.
- Larcher, W. 2003. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Berlin: Springer. 513 pág.
- Larson, RA. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem* 27: 969-978.
- Lechowicz, MJ. 1984. Why do temperature deciduous trees leaf out at different times? Adaptations and ecology of forest communities. *Amer Nat* 124: 821-842.
- Lee, SC, Prosky, L, Devries, JW, 1992. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. *J AOAC Int* 75:395.
- Lee, DW, O'Keefe, J, Holbrook, NM, Field, TS. 2003. Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecol Res* 18: 677–694.
- Leech, RM, Baker, NR. 1983. The development of photosynthetic capacity in leaves. In: Dale, J.E., Milthorpe, F.L. (Eds.), *The Growth and Functioning of Leaves*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Lencinas, MV, Martínez Pastur, G, Moretto, A, Gallo, E, Busso, C. 2007. Differential biomass productivity of *Nothofagus pumilio* seedlings under light and soil moisture gradients. *Bosque* 28: 241-248.

## Bibliografía

- Lencinas, MV, Martínez Pastur, G, Arena, ME, Busso, C. 2012. Physiological traits on *Osmorhiza depauperata*, a biodiversity component in the *Nothofagus* forests of Southern Patagonia. En: *Frontiers in Biodiversity Studies* (D Thangadurai, C Busso, L Abarca Arenas, S Jayabalan, Eds.). IK International Publishing House. New Delhi, Bangalore, India. Chapter 10, pp 164-178 (ISBN 978-9-381-14152-6).
- Lichtenthaler, HK, Buschmann, C, Do" Il, 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.
- Lichtenthaler, HK, Ac, A, Marek, MV 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.
- Lieffers, V, Messier, C, Gendron, F, Stadt, K, Comeau, P. 1999. Predicting and managing light in understory of boreal forests. *Can J For Res* 29: 796–811.
- Lin, ZF, Ehleringer, J. 1982. Effects of leaf age on photosynthesis and water use efficiency of papaya. *Photosynthetica* 16: 514-519.
- Lin, TT, Pitt, RE. 1986. Rheology of apple and potato tissue as affected by cell turgor pressure. *J Texture Stud* 17: 291–313.
- Lister, CE, Wilson, PE, Sutton, KH, Morrison, SC. 2002. Understanding the health benefits of blackcurrants. *Acta Hort* 585: 443-449.
- Lobit, P, Genard, M, Soing, P, Habib, R. 2006. Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. *J Exp Bot* 57 (6): 1471–1483.
- Lobos, GA, Retamales, JB, Hancock, JF, Flore, JA, Romero-Bravo, S, del Pozo, A. 2013. Productivity and fruit quality of *Vaccinium corymbosum* cv. Elliott under photo-selective shading nets. *Sci Hort* 153: 143-149.
- López, M. 2012. Curso-Taller Nutrición Frambueso. Proyecto Nodo Frambuesa. Loncoche. Corfo, Chile. 41 pág.
- López, D, Carazo, N, Rodrigo, MC, Garcia, J, Hanafi, A, Schnitzler, WH. 2007. Coloured shade nets effects on tomato crops quality. *Acta Hort* 747: 121-124.
- Lusk, Ch. 2004. Leaf area and growth of juvenile temperate evergreens in low light: species of contrasting shade tolerance change rank during ontogeny. *Funct Ecol* 18: 820-828.
- Lusk, Ch., del Pozo, A. 2002. Survival and growth of seedlings of 12 Chilean rainforest trees in two light environments: Gas exchange and biomass distribution correlates. *Aust Ecol* 27:173-182.

## Bibliografía

- Lusk, Ch, Piper, F. 2007. Seedling size influences relationships of shade tolerance with carbohydrate-storage patterns in a temperate rainforest. *Funct Ecol* 21:78-86.
- Madore, MM, Lucas, WJ eds. 1995. Carbon Partitioning and Source Sink Interactions in Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD
- Måge, F. 2002. A comparison of seven gooseberry cultivars with respect to yield components and fruit quality. *Acta Hort* 585: 481-487.
- Makkar, HPS, Bluemmel, M, Borowy, NK, Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Food Agric* 61: 161 - 165.
- Mariangel, E, Reyes-Diaz, M, Lobos, W, Bensch, E, Schalchli, H, Ibarra, P. 2013. The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four locations in southern Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 40 (1): 161-170.
- Marini, RP, Sowers, D, Marini, MC. 1991. Peach fruit quality is affected by shade 402 during final swell of fruit growth. *J Am Soc Hortic Sci* 116: 383-389.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press.
- Martin, P, Relgado, R, González, MR, Gallegos, JI. 2004: Colour of 'Tem' affected by different nitrogen and potassium fertilization rates. Proc. 1<sup>st</sup> International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research, Lisbon, Portugal. *Acta Hort*: 652: 153-159.
- Martínez Crovetto, R. 1968. Estudios etnobotánicos III- Nombres de plantas y su utilidad, según los indios araucano-pampas del Oeste de Buenos Aires. XXXVII Congreso Internacional de Americanistas, Vol.II: 603-624 y *Etnobiológica* 12: 1-24.
- Martínez Pastur, G, Lencinas, MV, Peri, P, Arena, M. 2007. Photosynthetic plasticity of *Nothofagus pumilio* seedlings to light intensity and soil moisture. *For Ecol Manag* 243: 274-282.
- McConnaughay, KDM, Coleman, JS. 1999. Biomass allocation in plants: ontogeny or optimality? A test along three resource gradients. *Ecology* 80: 2581-2593.
- Mitscherlich, EA. 1906. The law of the minimum and the law of diminishing soil productivity. *Landwirtschaftliche Jahrbuecher* 38: 537-552.
- Molina Jara, VP. 2010. Determinación del contenido de clorofila y nitrógeno foliar mediante Spad en *Vaccinium corymbosum* L. Tesis de Grado. Universidad de Talca, Chile. 33 pág.
- Monge, A, Chorghade, M, Erhardt, PW, Genellin, CR, Koga, N, Lindberg, P, Perun, TJ, Topliss, JG, Trivedi, BK, Wermuth, CG. 2000. Medicinal chemistry in the

## Bibliografía

- development of societies: Biodiversity and natural products. *Eur J Med Chem* 35: 1121-1125.
- Mooney, C, Koschnick, TJ, Haller, WT, Muller, S. 2007. Competition between two invasive Hydrocharitaceae (*Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle and *Egeria densa* Planch) as influenced by sediment fertility and season. *Aquat Bot* 86: 236-242.
- Moore, DM. 1983. Flora of Tierra del Fuego. Anthony Nelson & Missouri Botanical Garden, Oswestry, England, 396 pp.
- Motalleb, G, Hanachi, P, Kua, SH, Fauziah, O, Asmah, R 2005. Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. *J Biol Sci* 5(5): 648-653.
- Muller, O, Hirose, T, Werger, MJA, Hikosaka, K. 2011. Optimal use of leaf nitrogen explains seasonal changes in leaf nitrogen content of an understory evergreen shrub. *Ann Bot* 108 (3): 529-536.
- Muñoz, O, Montes, M, Wilkomirsky, T. 2001. Plantas medicinales de uso en Chile. Química y Farmacología. Editorial Universitaria, Chile. 330 p.
- Nafiu, AK, Togun, AO, Abiodun, M O, Chude, VO. 2011. Effects of NPK fertilizer on growth, drymatter production and yield of eggplant in southwestern Nigeria. *Agric Biol J N Am* 2(7): 1117-1125.
- Niinemets, U. 2006. The controversy over traits conferring shade-tolerance in trees: ontogenetic changes revisited. *Ecol* 94: 464–470.
- Nord, EA, Lynch, JP. 2009. Plant phenology. A critical controller of soil resource acquisition. *J Exp Bot* 60 (7): 1927-1937.
- Ogawa, K. 2003. Size dependence of leaf area and the mass of component organs during a course of self-thinning in a hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) seedling population. *Ecol Res* 18: 611 -618.
- Oregon State University Extension. 2007. Publication PN 215, Highbush Blueberry Production. 12 pag.
- Orsi, MC. 1984. Berberidaceae. En: Correa M.N. (ed). Flora Patagónica Sección 4ª, pp 325-348, INTA, Buenos Aires.
- Ort, D. 2001. When there is too much light. *Plant Physiol* 125: 29–32.
- Ovadia, R, Dori, I, Nissim Levi, A, Shahak, Y, Oren-Shamir, M. 2009. Coloured shade-nets influence stem length, time to flower, flower number, and inflorescence diameter in four ornamental cut-flower crops. *J Hortic Sci Biotech* 84: 161-166.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap J Nutr* 44: 307-15.

## Bibliografía

- Pak, N, 2001. Fibra dietética en alimentos chilenos. En "Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud. F. Lajolo, F. Saura-Calixto, E. Wittig de Penna y E. Wenzel de Meneses pp 179-185. Ed. Varela. Sao Paulo. Brasil.
- Peinemann, N. 1998. Conceptos de edafología y nutrición mineral. Editorial Universidad Nacional del Sur. 228 pág.
- Peri, PL, Arena, ME, Martínez Pastur, G, Lencinas, MV. 2011. Photosynthetic response to different light intensities, water status and leaf age of two *Berberis* species (Berberidaceae) of Patagonian steppe, Argentina. *J Arid Environ* 75: 1218-1222.
- Peri, P, Gargaglione, V, Martínez Pastur, G. 2008. Above and belowground nutrients storage and biomass accumulation in marginal *Nothofagus antarctica* forests in Southern Patagonia. *For Ecol Manag* 255: 2502–2511.
- Peri, PL, Lasagno, RG. 2006. Eficiencia en la interceptación de la radiación y relaciones biomasa-nitrógeno de las principales especies de arbustos y subarbustos de la Estepa Magallánica. In: Peri, P.L. (Ed.), Desarrollo de un Sistema de Soporte de Decisiones para mejorar porcentajes de señalada de modo ecológicamente sustentable en establecimientos de la Estepa Magallánica (Patagonia). 51-59. Editorial Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina. ISBN-13: 978-987-21-212-1.
- Pino, J, Sans, FX, Masalles, RM. 2002. Size-dependent reproductive pattern and short-term reproductive cost in *Rumex obtusifolius* L. *Acta Oecol.* 23.
- Pomilio, AB. 1973. Anthocyanins in fruits of *Berberis buxifolia*. *Phytochem* 12: 218-220.
- Pozniakovskíí, VM, Golub, OV, Popova, DG, Kovalevskaia, IN. 2003. The use of barberry in human nutrition. *Voprosy pitaniia* 72 (4): 46-49.
- Predieri, S, Dris, R. 2005. Influence of environment al conditions and orchard management on cherry productivity and fruit quality. In: Dris R, (ed) *Fruits: Growth, Nutrition, and Quality*. (WFL Publisher, Helsinki, Finlandia). ISBN: 952-99555-0-2. Pp. 220 <http://www.isfae.org/book/php>.
- Prior, RL, Cao, G, Martin, A, Sofic, E, McEwen, J, O'Brien, C, Lischner, N, Ehlenfeldt, M, Kalt, W, Krewer, G, Mainland, CM. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem* 46: 2686-2693.
- Prior, RL, Wu, X, Schaich, K 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.

## Bibliografía

- Qadir, SA, Kwon, MC, Han, JG, Ha, JH, Chung, HS, Ahn, J, Lee, HY. 2009. Effect of different extraction protocols on anticancer and antioxidant activities of *Berberis koreana* bark extracts. J Biosci Bioeng 107 (3): 331-338.
- Radice, S, Arena, ME. 2015. Environmental effect on the leaf morphology and anatomy of *Berberis microphylla* G. Forst. International Journal of Plant Biology 6: 5677. doi:10.4081/pb.2015.5677.
- Raese, JT. 1997. Cold tolerance, yield and fruit quality of 'd'Anjou' pears influenced by nitrogen fertilizer rates and time of application. J Plant Nutr 20: 1007-1025.
- Raese, JT, Drake, SR. 1997. Nitrogen fertilization and elemental composition affects fruit quality of 'Fuji' apples. J. Plant Nutr 20: 1797-1809.
- Raffo, A, Paoletti, F, Antonelli, M. 2004. Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars. Eur Food Res Tech 219 (4): 1438-2377.
- Ramirez, JE, Zambrano, R, Silpúveda, B, Kennelly, EJ, Simirgiotis, MJ. 2015. Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC-HR-ESI-ToF-MS. Food Chemistry 176: 106-114.
- Rapoport, E, Ladio, A, Sanz, E. 1999. Plantas nativas comestibles de la Patagonia andina argentino-chilena. Dpto de Ecología, Centro Regional Universitario Bariloche. Ediciones de Imaginaria. Bariloche. 81 pág.
- Retamales, JB, Montecino, JM, Lobos, GA, Rojas, LA. 2008. Colored shading nets increase yields and profitability of highbush blueberries. Acta Horti 770: 193-197.
- Reyes-Farias, M, Vasquez, K, Ovalle-Marin, A, Fuentes, F, Parra, C, Quiral, V, Jimenez, P, Garcia-Diaz, DF. 2014. Chilean native fruit extracts inhibit inflammation linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. Journal of Medicinal Food 00 (0): 1-8.
- Reynolds, PE, Frochot, H. 2003. Photosynthetic acclimation of beech seedlings to full sunlight following a major windstorm event in France. Ann For Sci 60: 701-709.
- Rodoni, LM, Feuring, V, Zaro, MJ, Sozzi, G, Vicente, AR, Arena, ME. 2014. Ethylene responses and quality of antioxidant-rich stored barberry fruit (*Berberis microphylla*). Scientia Horticulturae 179: 233-238.
- Rose, JKC, Catala, C., Gonzalez-Carranza, CZH, Roberts, JA. 2003. Plant cell wall disassembly. In JKC Rose, ed, The Plant Cell Wall, Vol 8. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 264-324.
- Roussos, PA, Denaxa, N-K, Damvakaris, T. 2009. Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. Sci Horti 119: 138-146.

## Bibliografía

- Ruiz, A, Hermosin-Gutierrez, I, Mardones, C, Vergara, C, Hertlitz, E, Vega, M, Dorau, C, Winterhalter, P, von Baer, D. 2010. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from southern Chile. *J Agric Food Chem* 58(10): 6081-6089.
- Ruiz, A, Hermosin-Gutierrez, I, Vergara, C, von Baer, D, Zapata, M, Hitschfeld, A, Obando, O, Mardones, C. 2013. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International* 51: 706-713.
- Ruiz, A, Zapata, M, Sabando, C, Bustamante, L, von Baer, D, Vergara, C, Mardones, C. 2014. Flavonols, alkaloids and antioxidant capacity of edible wild *Berberis* species from Patagonia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 62: 12407-12417.
- Ruiz-Rodríguez, BM, Morales, P, Fernández-Ruiz, V, Sánchez-Mata, MC, Cámara, M, Díez-Marqués, C, Pardo-de-Santayana, M, Molina, M, Tardío, J. 2011. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Res Int* 44: 1244-1253.
- Rylski, I, Spigelman, M. 1986a. Effect of shading on plant development, yield and fruit quality of sweet pepper grown under conditions of high temperature and radiation. *Sci Hortic* 29: 31-35.
- Rylski, I, Spigelman, M. 1986b. Use of shading to control the time of harvest of red ripe pepper fruits during the winter season in a high-radiation desert climate. *Sci Hortic* 29: 37-45.
- Saifuddin, M, Hossain, AMBS, Normaniza, O. 2010. Impacts of shading on flower formation and longevity, leaf chlorophyll and growth of *Bougainvillea glabra*. *Asian J Plant Sci* 9: 20-27.
- Sardans, J, Peñuelas, J, Rodá, F. 2006. Plasticity of leaf morphological traits, leaf nutrient content, and water capture in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex* subsp. *ballota* in response to fertilization and changes in competitive conditions. *Ecosci* 13: 258–270.
- Šavikin, K, Zdumić, G, Janković, T, Tasić, S, Menković, N, Stević, T, Đorđević, B. Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia. *Plant Food Hum Nutr* 64: 212–217, 2009.
- Schiappacasse, F, Carrasco, G, Carrasco, F. 2007. Effect of four shading levels on flower stem and corm quality of liatris (*Liatris spicata*). *Agr Tec* 67: 100-104.
- Shackel, KA, Greve, C, Labavitch, JM, Ahmadi, H. 1991. Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiol* 97: 814–816.
- Shaffer, JE. 1985. Inotropic and chronotropic activity of berberine on isolated Guinea pig Atria. *J Cardiovascular Pharm* 7: 307- 315.

## Bibliografía

- Shahak, Y, Gussakovsky, EE, Cohen, Y, Lurie, S, Stern, R, Kfir, S, Naor, A, Atzmon, I, Doron, I, Greenblat-Avron, Y, 2004a. ColorNets: a new approach for light manipulation in fruit trees. *Acta Horti* 636: 609-616.
- Shahak, Y, Gussakovsky, EE, Gal, E, Ganelevin, R, 2004b. ColorNets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. *Acta Horti* 659: 143-151.
- Shiflett, SA, Zinnert, JC, Younh, DR. 2013. Seasonal patterns of light availability and light use of broadleaf evergreens in a deciduous forest understory: Potential mechanisms for expansion. *Open J Ecol* 3 (2): 151-160.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T 1992. Antioxidative properties of Xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric and Food Chem* 6: 945-948.
- Shiple, B, Meziane, D. 2002. The balanced-growth hypothesis and the allometry of leaf and root biomass allocation. *Funct Ecol* 16: 326-331.
- Sims, DA, Gamon, JA.. 2002. Relationship between pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing Environ* 81: 337–354.
- Smit, A. 2007. Apple tree and fruit responses to shade netting. Thesis Master of Science of Agriculture of University of Stellenbosch. 145 p.
- Soler Esteban, R, Martínez Pastur, G, Lencinas, MV, Moretto, A, Peri, P. 2011. Above- and below-ground nutrient tissue concentration and leaf pigment changes in Patagonian woody seedlings grown under light and soil moisture gradients. *J Plant Nutr* 34: 2222-2226.
- Sommers, T C. 1977: A connection between potassium levels in the harvest and relative quality in Australian red wines. *Aust Wine Brew Spirit Rev* 96: 32-34.
- Souci, SW, Fachmann, W, Kraut, H. 2008. Food composition and nutrition tables (7th ed). Stuttgart, Germany: medpharm Scientific Publishers. Available on-line at <http://www.sfk-online.net/cgi-bin/sfkstart.mysql/language=english>
- Sozzi, G, 2007. Fisiología de la maduración de los frutos de especies leñosas. In: *Árboles frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento* (Ed G. Sozzi). Pp 669-706.
- Spayd, SE, Wample, E, Stevens, BL, Evans, RG, Kawakami, AK. 1993: Nitrogen fertilization of White Riesling in Washington: Effect on petiole nutrient concentration, yield components, and vegetative growth. *Am J Enol Vitic* 44: 378-386.
- Stampar, F, Hudina, M, Usenik, V, Sturm, K, Zadavec, P. 2001. Influence of black and white nets on photosynthesis, yield and fruit quality of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Acta Horti* 557: 357-361.

## Bibliografía

- Sun, OJ, Sweet, GB, Whitehead, D, Buchan, G D. 1995. Physiological responses to water stress and waterlogging in *Nothofagus* species. *Tree Physiol* 15: 629–638.
- Surveswaran, D, Cai, Y-Z, Corke, H, Sun, M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 102: 938–953.
- Taga, MS, Miller, EE, Pratt, DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Amer Oil Chem Soc* 61: 928-993.
- Taiz, L, Zeiger, E. 2006. *Fisiología vegetal*. Vol. II. Publicacions de la Universitat Jaume I. 753 pág.
- Talcott, ST, 2007. Chemical components of berry fruits. In Y. Zhao (Ed), *Berry fruits: Value added products for health promotion* (pp51-72). Boca Raton, Fl: CRC Press.
- Timko, M.P. 1998. Pigment biosynthesis: Chlorophylls, heme, and carotenoids. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, eds. J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, pp. 377–414. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Tisdale, SL, Nelson, WL, Reaton, JD. 1985, *Soil fertility and fertilizers*. Macmillan Publishing Company, New York, USA.
- Tognetti, R, Minotta, G, Pinzauti, S, Michelozzi, M, Borghetti, M. 1998. Acclimation to changing light conditions of long-term shade-grown beech (*Fagus sylvatica*) seedlings of different geographic origins. *Trees* 12: 326–333.
- Toldam-Andersen, T, Hansen, P. 1993. Growth and development in black currants (*Ribes nigrum*). I. Effects of light and leaf-shoot removals on growth distribution and fruit drop. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 352:237-246 [http://www.actahort.org/books/352/352\\_34.htm](http://www.actahort.org/books/352/352_34.htm)
- Toldam-Andersen, T, Hansen, P. 1997. Growth and development in black currants (*Ribes nigrum*). III. Seasonal changes in sugars, organic acids, chlorophyll and anthocyanins and their possible metabolic background. *J Hortic Sci* 72 (1), 155-169.
- Tomosaka, H, Chin, YW, Salim, AA, Keller, WJ, Chai, H, Douglas Kinghom, A. 2008. Antioxidant and cytoprotective compounds from *Berberis vulgaris* (barberry). *Phytother Res* 22(7): 979-981.
- Torres, C A, Davies, NM, Yañez, JA, Andrews, PK. 2005. Disposition of Selected Flavonoids in Fruit Tissues of Various Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Genotypes. *J Agric Food Chem* 53: 9536-9543.

## Bibliografía

- Torres Netto, A, Campostrini, E, Gonçalves de Oliveira, J, Bressan-Smith, RE. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Sci Hortic* 104: 199-209.
- Turkoglu, A, Duru, ME, Mercan, N, Kivrak, I, Gezer, K 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murril. *Food Chem* 101: 267-273.
- Valladares, F, Martínez-Ferri, E, Balaguer, L, Perez-Corona, E, Manrique, E. 2000. Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: A conservative resource-use strategy? *New Phytologist* 148: 79-91.
- Vance, AJ, Reeve, AL, Skinkis, PA. 2013. The role of canopy management in vine balance. Oregon State University. EM 9071. 12 pág.
- Vicente, AR, Manganaris, GA, Sozzi, GO, Crisosto, CH. 2009. Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. In: *Postharvest Handling: A Systems Approach*, Second Edition. ISBN: 978-0-12-374112-7. Pp 57-106. Edited by Wojciech J. Florkowski, Robert L. Shewfelt, Bernhard Brueckner and Stanley E. Prussia.
- Vozmediano, J. 1982. *Fruticultura: Fisiología, ecología del árbol frutal y tecnología*. Editorial Servicio de publicación Agraria. 521 pág.
- Vvedenskaya, IO, Vorsa, N 2004. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. *Plant Sc* 167: 1043-1054.
- Wade, G, Nash, E, McDowell, B, Beckham, SC. 2011. Native plants for Georgia. Part 1: Trees, shrubs and woody vines. B 987. College of Agricultural and Environmental Sciences. University of Georgia. 108 páginas.
- Walters, MB, Reich, PB. 1999. Low-light carbon balance and shade tolerance in the seedlings of woody plants: Do winter deciduous and broad-leaved evergreen species differ? *New Phytol* 143:143-154.
- Wang, SY, Lin, H-S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of Blackberry, Raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem* 48 (2): 140-146.
- Wang, SY, Lin, H-S. 2003. Compost as a soil supplement increases the level of antioxidant compounds and oxygen radical absorbance capacity in strawberries. *J Agric Food Chem* 51: 6844-6850.
- Wills, R, Lee, T, Graham, D, McGlasson, W, Hall, E. 1981. *Postharvest: An Introduction to the physiology and Handling of Fruits and vegetables*. New South Wales University press Limited. Kensington, Australia. 150 p.
- World, A-B, Opstad, N. 2007. Fruit quality in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Korona) at three times during the season and with two fertilizer strategies. *J Appl Bot Food Qual*: 81: 36-40.

## Bibliografía

- Wright, STC. 1956. Studies of fruit development in relation to plant hormones III. Auxins in relation to fruit morphogenesis and fruit drop in black currant (*Ribes nigrum*). J Hort Sc 31:196-211.
- Xu, C-Y, Griffin, KL, Schuster, WSF. 2007. Leaf phenology and seasonal variation of photosynthesis of invasive *Berberis thunbergii* (Japanese barberry) and two co-occurring native understory shrubs in a northeastern United States deciduous forest. Oecol 154: 11-21.
- Yáñez, P, Retamales, JB, Lobos, GA, del Pozo, A. 2009. Light environment within mature rabbiteye blueberry canopies influences flower bud formation. Acta Hort 810: 417-473.
- Zamski, E. Schaffer, A. eds., 1996. *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source–Sink Relationships*. M. Dekker, New York.
- Zheng, W, Wang, SY. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. J Agric Food Chem 51: 502-509.
- Zhi, Wu Sheng, Li, Yu Fen, Zi, Sheng Wu, Xue, Xue Bao. 2004. Sugar transport, metabolism, accumulation and their regulation in fruits. J Plant Physiol Molec Biol 30 (1): 1-10.
- Zhishen, J, Mengcheng, T, Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 64: 555-559.
- Zúñiga, R, Alberdi, M, Reyes-Díaz, M, Olivares, E, Hess, S, Bravo, LA, Corcuera, LJ. 2006. Seasonal changes in the photosynthetic performance of two evergreen *Nothofagus* species in south central Chile. Rev Chil Hist Nat 79: 489–504.