



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE METIL
JASMONATO EN FRUTOS DE *FRAGARIA*
X *ANANASSA* DURANTE LA
POSTCOSECHA**

Informe de Avance

Memoria de Título

Alumno: Yasna Castañeda Carrasco

Profesor Guía: Dr. Carlos Figueroa

TALCA-CHILE
MARZO 2019

**AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN
DE MEMORIAS DE PREGRADO Y TESIS DE POSTGRADO**

Yo, YASNA VAITIARE CASTAÑEDA CARRASCO cédula de Identidad N° 18.488.850-5 autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, autorizo a la Universidad de Talca para publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo.

Esta autorización se otorga en el marco de la Ley N° 20.435 que modifica la Ley N° 17.336 sobre Propiedad Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

| | |
|----------------------------------|---|
| Título de la memoria o tesis: | EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE METIL JASMONATO EN FRUTOS DE <i>FRAGARIA X ANANASSA</i> DURANTE LA POSTCOSECHA. |
| Unidad Académica: | FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD |
| Carrera o Programa: | TECNOLOGÍA MÉDICA |
| Título y/o grado al que se opta: | LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA |
| Nota de calificación | 5.9 |



Firma de
Alumno

Rut:

18.488.850-5

Fecha:

04 marzo 2019.-

AGRADECIMIENTOS

ES DIFÍCIL EXPRESAR EN POCAS LÍNEAS LOS AGRADECIMIENTOS YA QUE ESTE FIN NO ES SOLO LO QUE DURA UNA CARRERA UNIVERSITARIA, SINO MÁS BIEN EL FRUTO DE AÑOS DE ESTUDIOS DESDE QUE EMPEZAMOS NUESTRA FORMACIÓN EN CASA HASTA NUESTRA FORMACIÓN PROFESIONAL.

EL CULMINO TANTO DE ESTA ETAPA COMO DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, HA SIDO POSIBLE GRACIAS A LA COLABORACIÓN, DE MUCHAS PERSONAS, A LAS CUALES QUIERO

MANIFESTAR MI AGRADECIMIENTO.

EN PRIMER LUGAR A MI FAMILIA, A MIS PADRES LOA CUALES HICIERON UN GRAN ESFUERZO PARA PODER PAGAR MIS GASTOS AL ESTAR LEJOS DE CASA, ELLOS SON MI PAPÁ ENRIQUE Y MI MADRE JULIA, ELLA QUIEN HA SIDO UN PILAR FUNDAMENTAL EN TODOS LOS MOMENTOS, POR MUY BUENOS O NO TAN BUENOS QUE SEAN, ADEMÁS DE SU ENORME PACIENCIA, AMOR Y COMPRENSIÓN DURANTE TODO ESTE TIEMPO QUE NO HA SIDO FÁCIL; A MIS HERMANOS POR SIEMPRE ESTAR AHÍ CON SUS PALABRAS, CONSEJOS, Y MÁS DE ALGUNA AYUDA MEDIA TRUCHA Y SUS ABRAZOS ETERNOS QUE MÁS DE ALGUNA VEZ NECESITÉ Y QUE SIN DUDA NECESITARÉ; A MANUEL Y MARCELO POR ESTAR AHÍ CON APOYO Y AYUDA PRINCIPALMENTE ECONÓMICA CUANDO MIS BANCA HA ESTADO NUMEROS ROJOS; A CÉSAR POR ESTAR PRESENTE EN TODAS, POR SER “UBER” PERSONAL. NO MENOS IMPORTANTE ES EL AGRADECIMIENTO Y DISCULPAS A TODOS ELLOS Y A MIS ANGELITOS QUE ESTÁN EN EL CIELO, A MI ROSITA QUIEN NO ALCANZÓ A VER EL CULMINE DE ESTA ETAPA Y QUE ESTUVO CONMIGO SIEMPRE, POR HACER UN MÁS LARGO ESTE CAMINO A SER PROFESIONAL.

TAMBIÉN A TODAS Y TODOS AQUELLOS QUE DE ALGUNA U OTRA FORMA SE ACERCARON A MÍ, AYUDÁNDOME YA SEA EN EL LABORATORIO, CATEDRA O FUERA DE LO ACADÉMICO, AQUELLAS ETERNAS ONCE, ALMUERZOS, TARDES DE TROTE Y NOCHES ETERNAS. AQUELLOS QUE ME BRINDARON UNA MANO, Y MÁS DE UNA VEZ UNA PALABRA DE ALIENTO CUANDO SIN PEDIRLA, LA

RECIBÍ. COMO DICEN POR AHÍ, UDS SABEN QUE ESTAR LEJOS DE CASA NO ES TAN FÁCIL COMO PARECE Y QUE UDS. PASAN A SER COMO LA SEGUNDA CASA. GRACIAS MIS NENAS.

A TODOS LOS QUE COLABORADO EN LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN, A MI PROFESOR GUÍA, CARLOS FIGUEROA POR SU PACIENCIA Y DISPOSICIÓN, A LA INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL SEÑORITA PAZ ZÚÑIGA POR SER EL MOTOR DE LOS LABORATORIOS Y SU ENORME Y GRAN PACIENCIA. AL FINANCIAMIENTO DE ESTA INVESTIGACIÓN CORRESPONDIENTE A CONICYT, FONDECYT/REGULAR 1140663 Y1181310.

1. INDICE

| CONTENIDO | PÁGINA |
|---|--------|
| 2.-Resumen..... | 6 |
| 3.-Introducción..... | 7 |
| 4.-Marco teórico..... | 9 |
| 4.1 Antecedentes generales de <i>Fragaria x ananassa</i> | 9 |
| 4.1.2 Caracterización de flavonoides y contenido antioxidante..... | 10 |
| 4.1.3. Actividad enzimática de <i>Fragaria x ananassa</i> | 11 |
| 4.1.4 Contenido de solidos solubles (CSS) y acidez titulable (AT) de <i>Fragaria x ananassa</i> | 12 |
| 4.2 Metil jasmonato (MeJA)..... | 13 |
| 5.- Hipótesis..... | 16 |
| 6.-Objetivos..... | 16 |
| 6.1 Objetivo general..... | 16 |
| 6.2 Objetivos específicos..... | 16 |
| 7.- Material y métodos..... | 17 |
| 7.1 Material vegetal..... | 17 |
| 7.2 Productos químicos y tratamientos..... | 17 |
| 7.3 Diseño experimental..... | 18 |
| 7.4 Extracción y preparación de las muestras..... | 18 |
| 7.5 Determinación de antocianinas..... | 19 |

| | |
|--|----|
| 7.6 Determinación de proantocianinas..... | 20 |
| 7.7 Determinación de actividad enzimática | |
| 7.7.1 Determinación actividad de catalasa (CAT)..... | 21 |
| 7.7.2 Determinación de ascorbato peroxidasa (APX)..... | 21 |
| 7.7.3 Determinación de guaiacol peroxidasa (GPX)..... | 22 |
| 7.8 Determinación de contenido sólidos solubles (CSS) y acidez titulable (AT)..... | 22 |
| 7.9 Análisis estadístico..... | 23 |
| 8.-Resultados..... | 24 |
| 8.1 Contenido de antocianinas..... | 24 |
| 8.2 Contenido de proantocianinas..... | 25 |
| 8.3 Actividad enzimática de CAT, GPX y APX | |
| 8.3.1 Actividad de catalasa (CAT)..... | 26 |
| 8.7.2 Actividad de ascorbato peroxidasa (GPX)..... | 27 |
| 8.7.3 Actividad de guaiacol peroxidasa (APX)..... | 28 |
| 8.4 Relación CSS/AT..... | 29 |
| 9.- Discusión..... | 30 |
| 10.- Conclusión..... | 33 |
| 11.-Bibliografía..... | 34 |

2. RESUMEN

La frutilla es un fruto que contiene una gran cantidad de compuestos flavonoides, los cuales le confieren un alto valor nutricional, además de potentes funciones antioxidantes y antiinflamatorias.

Como una forma de satisfacer las necesidades en la demanda de productos agrícolas se han estudiado técnicas de protección de los cultivos para así obtener mayor rendimiento y calidad de estos productos. Es así como se ha estudiado el efecto del ácido jasmónico (JA) y su éster metílico metil jasmonato (MeJA). En este sentido, se ha demostrado que aplicado exógenamente en frutos tanto en campo como en el laboratorio (sistema de maduración *in vitro*), tiene un efecto acelerador en la maduración.

Para evaluar el efecto de la aplicación de la fitohormona MeJA en la calidad del fruto de frutilla durante la postcosecha, se realizaron aplicaciones de este compuesto en campo sobre plantas en etapa productiva, a partir de la floración hasta fruto maduro, en la localidad de Pelluhue (Región del Maule, Chile). El ensayo comprendió un diseño al azar con 3 tratamientos con diferente número de aplicaciones de MeJA: 1 (M1), 2 (M2) y 3 (M3) más un control (sin MeJA). Una vez maduros los frutos se cosecharon y se realizaron evaluaciones durante postcosecha (0, 24, 48 y 72 hrs). En la presente memoria de título se evaluó el efecto de MeJA en diversos parámetros fisicoquímicos: sólidos solubles, acidez titulable, acumulación de compuestos fenólicos, como antocianinas y proantocianidinas además de la respuesta antioxidante (enzimas antioxidantes) durante post cosecha, obteniendo efectos con derecha relación al número de aplicaciones de MeJA

3. INTRODUCCIÓN

La actividad silvoagropecuaria es la principal actividad económica de la Región del Maule, y la producción de frutos, en especial la frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) tiene un alto impacto económico a nivel local y nacional e internacional.

La gran demanda de este fruto radica entre otros, en sus atributos organolépticos como sabor, color y aroma, además de su alto contenido de compuestos antioxidantes como ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas. Estudios recientes resaltan la relación entre estos compuestos y la disminución en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas.

La rica diversidad climática de nuestro país permite el amplio cultivo de *F. x ananassa*, sin embargo, este fruto posee una corta vida post-cosecha además de una alta susceptibilidad a la infección por patógenos principalmente de hongos. Debido a la necesidad de satisfacer las demandas del mercado, en relación a los productos agrícolas, es que se han desarrollado diversas técnicas tendientes a proteger los cultivos, para así tener mayores rendimientos y a la vez productos de mejor calidad. La necesidad de mantener los alimentos frescos en general y prolongar su período de vida de postcosecha, han motivado a investigar distintas tecnologías de conservación de frutos, entre los cuales destacan control en la temperatura de almacenamiento, la aplicación de radiación ultravioleta, el almacenamiento en atmósferas modificadas y la aplicación exógena de fitohormonas. Sin embargo, estos tratamientos tienen una serie de inconvenientes, como por ejemplo, su alto costo además de que, algunos de ellos, pueden afectar la estabilidad de los compuestos antioxidantes de la frutilla, sobre todo de las proantocianidinas.

Los jasmonatos (JAs) son fitohormonas relacionadas a la respuesta de estrés en plantas, derivadas de lípidos, que regulan adaptaciones de las plantas al estrés biótico y abiótico, incluyendo la herbivoría y la infección por patógenos. También se ha descrito una variedad de actividades fisiológicas y de crecimiento de plantas inducidas por JA que incluyen fertilidad, determinación del sexo, formación de órganos de almacenamiento, procesos

reproductivos, elongación de la raíz, maduración y senescencia de la fruta, defensa oxidativa e interacción con otras hormonas, funciones fisiológicas relacionadas con el JA son la estimulación de la germinación en semillas inactivas, la acumulación de proteínas de almacenamiento, regulación de enzimas antioxidantes, senescencia, síntesis de néctar floral, herbivoría, resistencia sistémica, desencadenantes del metabolismo secundario de la planta.

Se ha descrito que metil jasmonato (MeJA), un tipo de JAs, produce efectos positivos en postcosecha, aumentando la firmeza y el contenido de antocianinas, en estudios *in vitro*, por lo que se postula que las aplicaciones exógenas de MeJA en campo, en distintas etapas de desarrollo del fruto mejora estándares de calidad, la acumulación de compuestos fenólicos y su respuesta antioxidante en post-cosecha.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Antecedentes generales de *Fragaria x ananassa*

Fragaria x ananassa, frutilla o fresa, es una planta herbácea que pertenece a la familia Rosaceae, género *Fragaria* (1). El género *Fragaria* abarca especies en niveles de ploidía que van desde diploides a decaploides. Los dos octoploides silvestres, *F. virginiana* y *F. chiloensis*, son especies hermanas y los progenitores de la fresa cultivada octoploide *F. x ananassa* (2), la cual se originó en el siglo XVIII a través de hibridación y fue documentada por el botánico Antoine Nicolas Duchesne (3).

La fresa se ha considerado una fruta no climatérica, ya que no hay un aumento de respiración y producción concomitante de la hormona etileno, que desencadena el proceso de maduración (4). Es una planta de tipo herbáceo y perenne, constituida por tallos cortos o coronas en forma de rosetas. Las coronas están formadas por entrenudos cortos y muy próximos, de 2 mm aproximadamente de longitud, donde se localizan los primordios foliares, radicales y yemas a partir de los cuales se originan los estolones o tallos rastreros de donde se reproducen las plantas hijas. Las plantas hijas son de gran importancia ya que comercialmente constituyen el principal método de propagación en frutillas. (3).

Fragaria x ananassa se encuentra distribuida desde el círculo ártico en el oeste de Norte América hasta el extremo más austral de Chile y Argentina, el origen de la frutilla chilena es poco claro, aunque se presume que fue introducida desde Norte América por aves migratorias. (5).

4.1.2. Caracterización de flavonoides y contenidos antioxidante.

El desarrollo y la maduración de la fruta de fresa implica cambios fisiológicos y bioquímicos complejos, que van desde la acumulación de azúcar hasta la producción de importantes compuestos volátiles que contribuyen al sabor final de esta. Los frutos de *Fragaria x ananassa* contienen altas concentraciones de flavonoides (6). En las fresas verdes, es decir inmaduras, los flavonoides están representados principalmente por proantocianidinas (PAs), mientras que en las frutas maduras también se acumulan las antocianinas, que están relacionadas con el color rojo del fruto (7). Es por esto que las frutillas son apreciadas en todo el mundo como un alimento de sabor agradable a menudo asociado con efectos medicinales o para mejorar la salud. Son una fuente rica de antioxidantes y una fruta común e importante en la dieta mediterránea debido a su alto contenido de nutrientes esenciales y fitoquímicos beneficiosos, que se relacionan con una actividad biológica relevante en la salud humana. Según Carvajal et al. (1) el contenido de sustancias activas, entre ellas los antioxidantes, está controlado genéticamente, pero su expresión fenotípica está condicionada por variables ambientales como la luz, la temperatura, la humedad o el nivel de fertilización.

El grupo de compuestos fenólicos en fresa que históricamente ha recibido la mayor atención, son las antocianinas, responsables del color rojo brillante de estas bayas. La concentración y la composición de las antocianinas son, por lo tanto, importantes para la calidad sensorial de las frutas y los productos, además de poseer posibles beneficios para la salud (8). A estas se le atribuyen un sinnúmero de efectos, como por ejemplo los descritos por Wang and Jiao (9) que describen una correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido total de fenólicos o antocianinas en mora, arándano, frambuesa y frutillas observándose actividades antioxidantes contra los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y oxígeno singlete (1O_2).

Las PAs son productos finales oligoméricos y poliméricos de la ruta biosintética de los flavonoides donde sus componentes básicos son, la catequina y epicatequina. Estas están presentes en los frutos, la corteza, las hojas y las semillas, donde brindan protección contra

la depredación por lo cual su mayor expresión es en estadios inmaduros (10). Sin embargo a medida que el fruto va alcanzando su estado maduro, el contenido de estos compuestos es significativamente menor. Por el contrario, el contenido de antocianinas tiene una tendencia completamente opuesta; estados mayormente maduros acumulan una gran cantidad de antocianinas (7).

Se ha informado que los flavonoides y otros compuestos de *Fragaria* spp. son buenos compuestos antioxidantes que han demostrado neutralizar los efectos dañinos asociados con las lesiones inducidas por especies reactivas del oxígeno (ROS) (11). Recientemente Elkhadragy et al. (12) evidenció efectos protectores del extracto metanólico de *F. x ananassa* contra la neurotoxicidad inducida por cloruro de cadmio en un modelo de rata, donde compuestos de esta fruta protegen el tejido cerebral de la toxicidad neuronal inducida por el anterior compuesto, al mejorar el sistema antioxidante y al aumentar las actividades antiapoptóticas y antiinflamatorias.

4.1.3. Actividad enzimática de *Fragaria x ananassa*

Según Asghari and Aghdam (13) el sistema de defensa de las plantas contra el estrés oxidativo consta de dos líneas; la primera línea de defensa se denomina genes de evitación de ROS e incluyen oxidasa alternativa (AOX) y la segunda, se denomina genes de captación de ROS que incluyen genes que codifican principalmente a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), el ciclo de ascorbato / glutatión, y el sistema de peroxidasa. Como indicó Rao (14) el metabolismo de las ROS se controla mediante esta serie de enzimas antioxidantes interrelacionadas, dependiendo en gran medida de la coordinación de estas enzimas (Fig. 1).

El radical anión superóxido se convierte eficientemente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de SOD, mientras que el H_2O_2 se destruye predominantemente por ascorbato peroxidasa (APX), guayacol peroxidasa (GPX) y CAT (15). La lipoxigenasa (LOX) cataliza la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y se cree que es un contribuyente importante al daño de la membrana inducido por enfriamiento en el tejido vegetal (11).

En relación con la localización subcelular de estas enzimas se observa que la enzima SOD esté presente en casi todos los compartimentos celulares como en cloroplastos, citosol, mitocondria, apoplasto y peroxisomas; mientras que la GPX y CAT se localizan en los peroxisomas (16). La presencia de estas enzimas en frutos cosechados conlleva a una reducción de ROS y a alargar la vida postcosecha de la fruta durante el almacenamiento en frío (17).

REPRESENTACION ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

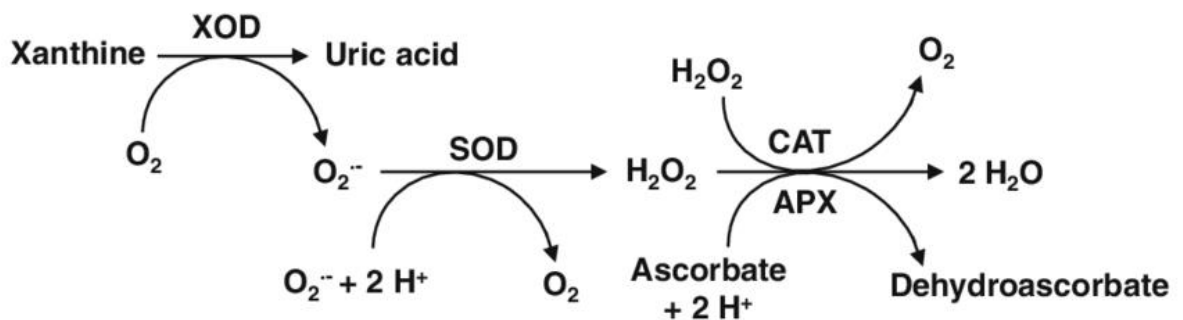


FIGURA 1: Principales reacciones de metaloenzimas involucradas en el metabolismo de ROS (especies reactivas del oxígeno) de las células vegetales. XOD, xantina oxidasa; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; APX, peroxidasa de ascorbato. (18)

4.1.4. Contenido de sólidos solubles (CSS) y acidez titulable (AT) de *Fragaria x ananassa*

Una característica atribuible de calidad de fruta es la sensación de dulce / ácido y el balance entre estos dos atributos. El dulzor y la acidez se pueden cuantificar mediante la medición del contenido de sólidos solubles (CSS) y la acidez titulable (AT). Las paredes celulares contienen grandes cantidades de polisacáridos, principalmente pectinas y celulosa, y se digieren debido a la actividad de las enzimas que degradan la pared celular, lo que conduce a un aumento significativo en el CSS. A medida que incrementa el estado de

madurez se presenta un aumento en los sólidos solubles y el índice de madurez. Este comportamiento en los sólidos solubles, se explica por la hidrólisis de diversos polisacáridos estructurales tales como almidón, pectinas de la pared celular, hasta sus componentes monoméricos básicos, por lo cual se acumulan azúcares (13). Martínez-Bolaños, Nieto-Angel (19) menciona que el mayor contenido de sólidos solubles en frutos les confiere una mayor calidad, y que los azúcares son los principales compuestos solubles en los frutos de frutilla; de los cuales fructosa, glucosa y sacarosa son los que se encuentran en mayor cantidad.

La AT indica el porcentaje de ácidos orgánicos contenido en la fruta. La pérdida de acidez durante el desarrollo se debe a incrementos en el pH de los frutos o en la relación sólidos solubles/acidez ya que el contenido de acidez titulable disminuye continuamente a medida que el desarrollo progresa (12).

La relación entre el nivel de sólidos solubles y acidez titulable es un indicador simple de la calidad de la fruta ya que bajas relaciones CSS/AT se asocian a una buena calidad de postcosecha y, al contrario, altos índices se asocian con una mayor incidencia de hongos que causan pudrición durante el almacenamiento (20).

4.2. Metil jasmonato (MeJA)

El ácido jasmónico (JA) y su éster metílico, el metil jasmonato (MeJA), son derivados de lípidos de plantas que se parecen a los eicosanoides de mamíferos en su estructura y biosíntesis (21). Las plantas producen compuestos volátiles y no volátiles, incluidas las fitohormonas, que les ayudan a adaptarse al entorno cambiante, en donde se destaca a MeJA que es un compuesto volátil fragante inicialmente identificadas de las flores de *Jasminum grandiflorum*, y se ha demostrado que se distribuye de forma ubicua en la planta. La naturaleza volátil de MeJA condujo al descubrimiento de su papel como señal en las respuestas celulares de la planta, interacciones herbívoras e interacciones planta-planta (22).

La vía de señalización de MeJA es parcialmente conocida, sin embargo es sabido que los efectos de esta fitohormona serían por la inducción de la biosíntesis de Jasmonato bioactivo. La concentración de este compuesto varía según el tipo de tejido, la etapa fenológica y estímulos externos los cuales podrían inducir señales defensivas directa o indirectamente que podrían cambiar ampliamente el perfil de los metabolitos volátiles. Por lo tanto, los niveles más altos de MeJA se reportan en tejidos reproductivos y flores, mientras que los niveles más bajos se encuentran en las hojas y raíces maduras (23).

Se presume que MeJA interactúa con receptores específicos en las membranas y el núcleo que activarían una vía de señalización, resultando en la inducción de factores de transcripción con activación o represión de genes regulados por MeJA. Ello modula negativamente la actividad de las enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos entre los componentes de la pared celular para inhibir la degradación de la pared celular en las frutas, por lo tanto mejora la firmeza y resistencia al daño mecánico (24).

Por otra parte, al igual que las células humanas, el proceso de envejecimiento y senescencia en plantas está altamente relacionado con los radicales libres, ROS, estreses (bióticos y abióticos), patógenos y las lesiones por frío, siendo responsables de la explosión oxidativa en las células de las frutas cosechadas, lo que lleva a un mayor daño a la membrana y la actividad de la polifenol oxidasa, que es la causante del pardeamiento enzimático. Se ha informado que la aplicación exógena de MeJA activa algunas proteínas de choque térmico (24). El uso de tecnologías de poscosecha adecuadas es esencial para disminuir los efectos adversos de las condiciones de estrés y la tasa de envejecimiento; mantener la calidad nutricional y mejorar la vida de almacenamiento de las frutillas (15). Según indicó Asghari (17) la aplicación de MeJA exógena mejora la actividad de SOD, CAT y APX en frutos de níspero cosechados, lo que lleva a una reducción de ROS. Además, el aumento en la actividad de SOD en los melocotones y la actividad de CAT en los tomates se ha reportado como resultado del tratamiento posterior a la cosecha con MeJA (25).

La mayoría de las evaluaciones de MeJA se han ocupado de aplicaciones de frutas en poscosecha. Se ha demostrado que los tratamientos con MeJA desacelerando los cambios en los atributos físicos como el color, el peso, la firmeza y la cantidad de compuestos bioactivos

(contenido fenólico, antioxidantes) y mejoran la vida de almacenamiento en algunas frutas (23). Se sugiere que las JAs promueven la maduración de las frutas no climatéricas a través de su participación en la acumulación de antocianinas. (26).

5. HIPÓTESIS

Aplicaciones en campo de MeJA en frutos de *Fragaria x ananassa* mejoran la calidad del fruto, y aumentan la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas y proantocianidinas en la postcosecha en forma proporcional al número de aplicaciones

6.- OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar el efecto de las aplicaciones de MeJA en condiciones de campo durante el desarrollo y crecimiento del fruto en la calidad del fruto, la acumulación de compuestos fenólicos y su respuesta antioxidante en la post-cosecha.

6.2 Objetivos Específicos

- Determinar los efectos de las aplicaciones de MeJA en el contenido de sólidos solubles (CSS) -acidez titulable (AT), antocianinas y proantocianidinas durante almacenamiento de postcosecha.
- Determinar el efecto de las aplicaciones de MeJA en la respuesta antioxidante durante el almacenamiento de postcosecha
- Asociar el número de aplicaciones de MeJA con los parámetros de calidad, acumulación de compuestos fenólicos y respuesta antioxidante en postcosecha.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material vegetal

Frutos maduros de *Fragaria x ananassa* se recolectaron desde parcelas experimentales en la localidad de Pelluhue (Región del Maule, Chile) en la temporada de producción 2016-2017.

7.2 Productos químicos y tratamientos

Para los tratamientos se utilizó 0.25 mM MeJA (Sigma–Aldrich) más 0,05% (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich) (pH 4.3), y como control 0,05% (v/v) Tween-20 (pH 4.3). Los frutos que recibieron el tratamiento control (C1, C2, C3) solo recibieron la solución de 0,05% (v/v) Tween-20 (pH 4.3). Los frutos que recibieron el tratamiento con MeJA (M1, M2, M3, donde corresponden a 1, 2 y 3 aplicaciones durante el desarrollo y crecimiento del fruto respectivamente) contenía tanto la solución MeJA como la solución Tween-20, como se muestra en la Tabla 1.

| T r a t a m i e n t o s | | | |
|--------------------------------|----------------------------|------|------|
| Control | C1 | C2 | C3 |
| MeJA | <u>Replicas biológicas</u> | | |
| M1 | M1-1 | M1-2 | M1-3 |
| M2 | M2-1 | M2-2 | M2-3 |
| M3 | M3-1 | M3-2 | M3-3 |

TABLA 1: Los tratamientos M1, M2 y M3 corresponden al número total de aplicaciones de MeJA que se efectuaron a través del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas), durante el desarrollo de los frutos (1, 2 y 3 aplicaciones respectivamente) con sus respectivas réplicas biológicas.

7.3 Diseño experimental

La aplicación de los tratamientos se realizó a partir de floración hasta fruto maduro con una unidad experimental de 3 parcelas por tratamiento con un total de 12 parcelas en los 4 tratamientos (Tabla 2), donde se distribuyeron 30 plantas por parcela con un total de 90 plantas dispuestas al azar por tratamiento (Tabla 3), los cuales fueron segmentados distintos tiempos de almacenamiento post-cosecha (0, 24, 48 y 72 h)

| Tratamiento | Floración | Fruto inmaduro (blanco) | Fruto maduro |
|--------------------|------------------|------------------------------------|---------------------|
| M1 | -- | -- | X |
| M2 | -- | X | X |
| M3 | X | X | X |
| Control | -- | -- | -- |

TABLA 2: Aplicaciones de MeJA (1, 2 y 3 aplicaciones) que se efectuaron a través del tiempo durante el desarrollo de los frutos, en donde M3 comienza con su primera aplicación desde la floración hasta fruto maduro, la segunda aplicación en fruto inmaduro y la tercera en fruto maduro; M2 desde fruto inmaduro hasta fruto maduro y M1 solamente en fruto maduro.

De cada parcela por tratamiento se tomaron 3 réplicas biológicas (Tabla 1) y cada una de ellas con sus 3 réplicas técnicas (denominadas R), para cada tiempo de almacenamiento postcosecha (Ej. M1-1 R1, M1-1 R2, M1-1 R3, hasta M3-3 R3 cada una indicada a las 0,24, 48 y 72 horas) las cuales fueron utilizadas para los 8 parámetros por muestra y por tiempo (antocianinas, PAs, actividad enzimática de SOD, CAT, POD, APX, contenido sólidos solubles (CSS) y acidez titulable (AT)) analizados con los respectivos controles. Para cada réplica técnica, en cada determinación, se midieron por triplicado.

7.4. Extracción y preparación de las muestras

Las frutas de cada tratamiento fueron transportados al laboratorio en condiciones de refrigeración y para su almacenamiento se empaquetaron en contenedores de plástico (12,5 cm de ancho; 12,5 cm de profundidad; 4,5 cm de altura) y se dividieron al azar para los distintos tiempos de almacenamiento postcosecha (0, 24, 48 y 72 h) rotulados de acuerdo a los intervalos anteriormente mencionados y se almacenaron a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ con 60% de humedad relativa.

Para los análisis de relación sólidos solubles y acidez titulable (CSS-AT), antocianinas y PAs el fruto fue molido manualmente en nitrógeno líquido y para los ensayos enzimáticos las muestras fueron homogenizadas con un equipo, Ultra-Turrax Digital High-Speed Homogenizer (IKA, Australia) conservándose a -20°C .

7.5 Determinación de antocianinas

La cuantificación de antocianinas se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Lee, Durst y Wrolstad (27). Se utilizaron 200 mg (0,2 g) de frutilla molida con nitrógeno líquido los cuales fueron dispuestos en microtubos ámbar. A cada tubo se le agregó 1,5 ml de solución etanol, 1,5 M de HCl en una proporción 85:15, y se incubó a 4°C en oscuridad por toda la noche. Luego las muestras se incubaron en hielo por 10 min, agitando de vez en cuando. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C . De la fase acuosa, se tomó 400 uL que se dispusieron en un nuevo microtubo ámbar. A cada réplica se traspasaron 200 ul a dos microtubos nuevos, en donde a uno se le añadió 800 uL de solución 0,025 M KCl a pH 1.0, y al otro se le agregó 800 μL de acetato de sodio 0,4 M a pH 4,5. Finalmente en placas de 96 pocillos se depositó 240 μL y se midió la absorbancia a 516 nm en el equipo lector de absorbancia TECAN M200 (Tecan Trading AG, Suiza). La concentración de cada antocianina se calculó según la siguiente fórmula y se expresa como pelargonidina equivalentes, en base a la Ley de Lambert-Beer utilizando un coeficiente de extinción molar de 31600

$$\text{Concentración antocianinas (equivalentes de pelargonidina)} = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 103}{\epsilon \times L}$$

Donde A es la absorbancia = (A pH de 1,0 - A de pH 4,5), MW es el peso molecular (g/mol) = 449,2 g/mol para pelargonidina, DF es el factor de dilución (200 mg de la muestra se diluye a 1,5 ml, df = 10), ϵ es el coeficiente de extinción ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 31600 para pelargonidina, donde L (longitud de la trayectoria en cm) = 1, y por lo tanto, el resultado reportado se expresa como equivalentes de pelargonidina.

7.6. Determinación de prontocianidinas (PAs)

Para la determinación del contenido total de PAs se utilizó el método modificado descrito por Prior et al. (28) Se utilizaron 200 mg de frutilla molida con nitrógeno líquido, Posteriormente se llevó a un tubo de 1,5 mL con 1 mL de 80:20 (v/v) acetona:agua destilada. Luego fueron sonicadas a temperatura ambiente por 30 min. En una placa de poliestireno para mediciones de absorbancia en rango visible de 96 pocillos se agregó 70 μL de 80% etanol acidificado (36% de HCl con 12,5 mL de H_2O destilada y 75 mL de 91% de etanol) para los blancos y 70 μL de muestras (diluídas 1:50), correspondientes a los diferentes tratamientos con 210 μL de p-dimetilaminocinnamaldehido (DMACA). La placa se dejó incubar por 20 min a temperatura ambiente para posteriormente medir a 640 nm en un equipo lector de absorbancia TECAN M200 (Tecan Trading AG, Suiza). Se calculó la concentración de cada muestra mediante una regresión lineal en base a las absorbancias de una curva estándar de catequina.

7.7. Determinación de actividad enzimática

Las proteínas solubles totales se extrajeron después de volver a suspender 1 g de polvo de tejido de fruta congelada en 5 ml de tampón de extracción que contenía 1 ml de 500 mM de fosfato de potasio (pH 7.8), 500 μL 10 mM de EDTA de sodio (pH 7), 5% (p/p) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 50 μL de 500 mM ácido ascórbico (el ácido ascórbico se utilizó solo para la extracción de enzimas APX). El homogeneizado se centrifugó a $10,000 \times$

g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la catalasa (CAT), el ascorbato peroxidasa (APX) y guaiacol peroxidasa (POD).

7.7.1. Determinación actividad de catalasa (EC 1.11.1.6 (CAT))

Para la determinación de la actividad de la enzima CAT se utilizó el método modificado de García-Limones, et al. (29) modificado. El medio de reacción contenía 30 µL 500 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 7), 68 µL de 88 mM de H₂O₂ y 40 µL de extracto de enzima en bruto en un volumen final de 300 µL. La reacción se inició después de la adición de H₂O₂, y la disminución en la absorbancia del peróxido se midió a 240 nm. La actividad específica se expresó como peróxido de hidrogeno (mmoles/g PF). La concentración de producto de CAT se calculó según la siguiente fórmula, en donde DF corresponde al factor de dilución.

$$\text{Concentracion (mM g}^{-1}\text{)}: \left(\frac{\text{Concentracion(M)} \times \text{Vol. de reaccion (ml)} \times \text{Buffer de extraccion (mL)}}{\text{Vol de extracto(mL)} \times \text{Peso (g)}} \right) \times DF$$

7.7.2 Determinación de ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11 (APX))

Para la determinación de APX se utilizó el método modificado de García-Limones, et al. (29). La mezcla de reacción consistió en 60 µl a 500 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 7), 20 µL a 5 mM de ácido ascórbico, 1,2 µL a 88 mM de H₂O₂, 20 µL a 10 mM de EDTA de sodio (pH 7) y 20 µL de extracto de enzima en bruto en un volumen final de 300 µL. La reacción se inició después de la adición de H₂O₂, y la oxidación del ácido ascórbico fue monitoreado a 290 nm. La actividad específica se expresó como Dehidroascorbato (mmoles/g PF). La concentración de producto de APX se calculó según la siguiente fórmula, en donde DF corresponde al factor de dilución.

$$\text{Concentracion (mM g}^{-1}\text{)}: \left(\frac{\text{Concentracion(M)} \times \text{Vol. de reaccion (ml)} \times \text{Buffer de extraccion (mL)}}{\text{Vol de extracto(mL)} \times \text{Peso (g)}} \right) \times DF$$

7.7.3. Determinación de guaiacol peroxidasa (EC 1.11.1.7 GPX))

La determinación se realizó de acuerdo al método modificado de Rao, et al. (14) La mezcla de reacción contenía 60 µL de tampón de fosfato de potasio 500 mM (pH 7), 2,5 µL a 10 mM de sodio-EDTA (pH 7.0), 16,2 µL a 88 mM de H₂O₂, 60 µL a 32 mM de guaiacol y 105 µL de extracto de enzima en bruto en un volumen final de 300 µL. Se detectó actividad de GPX de manera espectrofotométrica basada en la formación de tetraguaiacol y el consiguiente aumento de absorbancia de este compuesto a 470 nm. Se expresó la actividad enzimática específica como tetraguaiacol (mmoles/g PF), donde en la fórmula que se muestra a continuación DF es el factor de dilución.

$$\text{Concentracion (mM g}^{-1}\text{)}: \left(\frac{\text{Concentracion(M)} \times \text{Vol. de reaccion (ml)} \times \text{Buffer de extraccion (mL)}}{\text{Vol de extracto(mL)} \times \text{Peso (g)}} \right) \times \text{DF}$$

7.8. Determinación contenido solidos solubles (CSS) y acidez titulable (AT)

Para la determinación de CSS y AT se utilizó el método de Saavedra et al.(30) modificado. Se pesaron 2 gramos de fruto y se homogenizó con 5 ml de agua destilada para posterior filtrarla con gasa. Para la medición de CSS se utilizó un refractómetro digital HI 96801, Hanna (Hanna, Romania) con un volumen de muestra correspondiente a 150 µl por cada replica técnica. El resultado fue expresado en ° Brix. El resto del filtrado fue disuelto 1/10 en agua destilada y se titularon con un titulador semi automatico Digitrate Pro, Jencons (Jecons,UKA) usando 25 ml por réplica, las cuales se llevaron a pH 8,2 con una solución 0,025 M de NaOH y los resultados fueron expresados como gramos de ácido cítrico /L.

$$\text{AT} = \frac{\text{FD} \times [\text{equiv.Acido cítrico} \times \text{N (NaOH)} \times \text{volumen NaOH (L)}]}{\text{volumen muestra (L)}}$$

7.9. Análisis estadístico

Las determinaciones se obtuvieron para cada tratamiento con el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar. Cada replica biológica incluye 3 réplicas técnicas. El software Infostat versión 5.0 para Windows se utilizó para el análisis estadístico, utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el test Tukey para comparaciones múltiples a un nivel de significancia $P < 0.05$.

8.- RESULTADOS

8.1. Contenido de antocianinas

En cuanto al contenido de antocianinas, se observó diferencias estadísticamente significativas con un mayor contenido de antocianinas en M3 en relación al control, durante todos los tiempos de postcosecha (Fig. 2). Además, el tratamiento M3 tiene mayor valor que el M1 en los tiempos 0, 24 y 72 (figura 2). Además a las 24 horas se observó una tendencia en el aumento del contenido de antocianinas en relación al número de aplicaciones, donde los frutos que tenían menor número de aplicaciones se relaciona con un menor contenido de antocianinas.

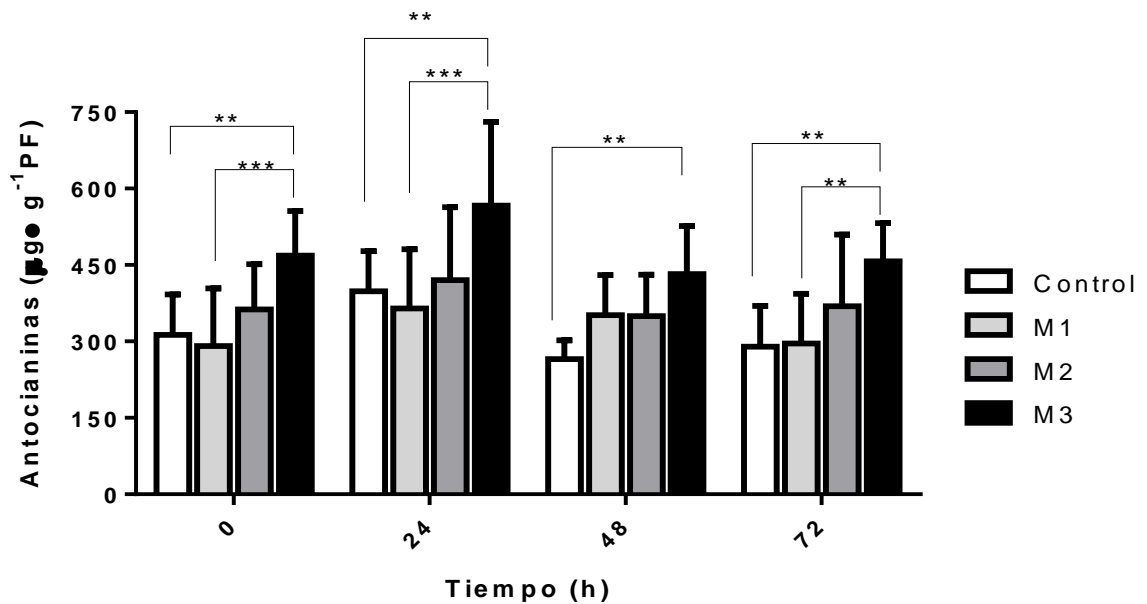


Figura 2: Contenido de antocianinas totales (μg pelargonidina/g PF) en frutos de frutilla durante la post cosecha (0, 24, 48 y 72 h), tratados en precosecha con MeJA, en donde: M1, M2 y M3 corresponden a 1, 2 y 3 aplicaciones de MeJA con sus respectivo control (C) sin tratar. Los datos corresponden a la media \pm DE ($n = 20$). Los ** representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cada tiempo ($p \leq 0,05$) y los *** un valor $p (=0.0001)$.

8.2 Contenido de proantocianidinas (PAs)

En el contenido de PAs (figura 3) se observó diferencias sólo en el tiempo 0. Se mostró una relación entre el número de aplicaciones y el contenido de PAs ya que existe un mayor contenido de PAs en el tratamiento M3 en comparación con M1 y M2. Durante los tiempo 24, 48 y 72 las PAs se mantuvieron sin diferencias significativas.

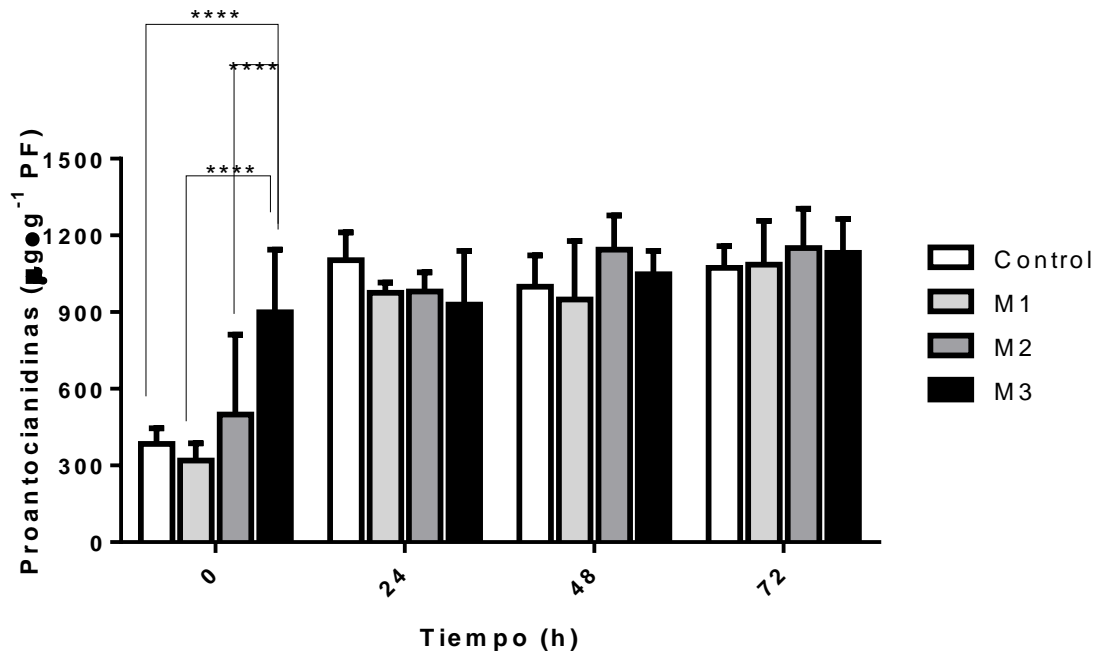


Figura 3. Contenido de proantocianidinas totales ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco) en frutos de frutilla tratadas con MeJA durante la poscosecha (0, 24, 48 y 72 h) después del tratamiento previo a la cosecha con MeJA (M1, M2 y M3) y control (C). Los datos corresponden a la media \pm DE ($n = 20$). Los **** representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cada tiempo (valor $p \leq 0.0001$).

8.3 Actividad enzimática de catalasa (CAT), guaiacol peroxidasa (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX)

8.3.1 Actividad enzimática de CAT

La actividad de la enzima CAT, como un importante antioxidante muestra que a mayor número de aplicaciones de MeJA presentó una menor actividad catalítica mostrándose una relación inversa entre número de aplicación de MeJA y su actividad enzimática (figura 3 A), mostrando una mayor actividad enzimática con tan solo una aplicación, en todos los tiempos.

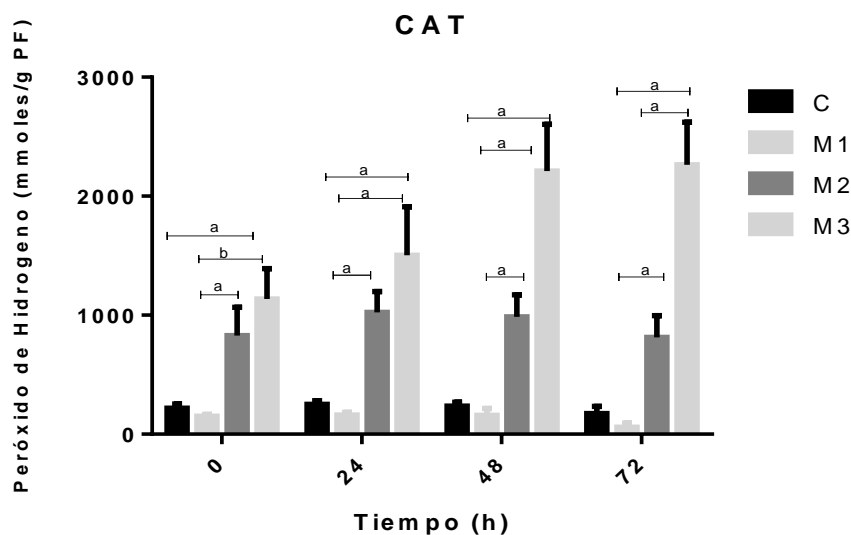


Figura 3 A: Efectos de la actividad de las enzimas CAT en poscosecha con la aplicación en campo de MeJA. Los datos corresponden a la media \pm DE (n = 20). La letra a representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en donde con valor p (< 0,0001) y b con valor p= 0.0001.

8.3.2 Actividad enzimática de GPX

Se observó que la actividad de GPX aumenta proporcional al número de aplicaciones en los tiempos 0, 24 y 48, mostrándose una considerable actividad enzimática en las muestras control, siendo muy similar a la actividad a los frutos tratados con MeJA en M1. A su vez se observó que en el tiempo 72 no hay diferencias significativas entre los frutos tratados y las muestras control, sin embargo se observa una actividad enzimática constante. (Figura 3 B)

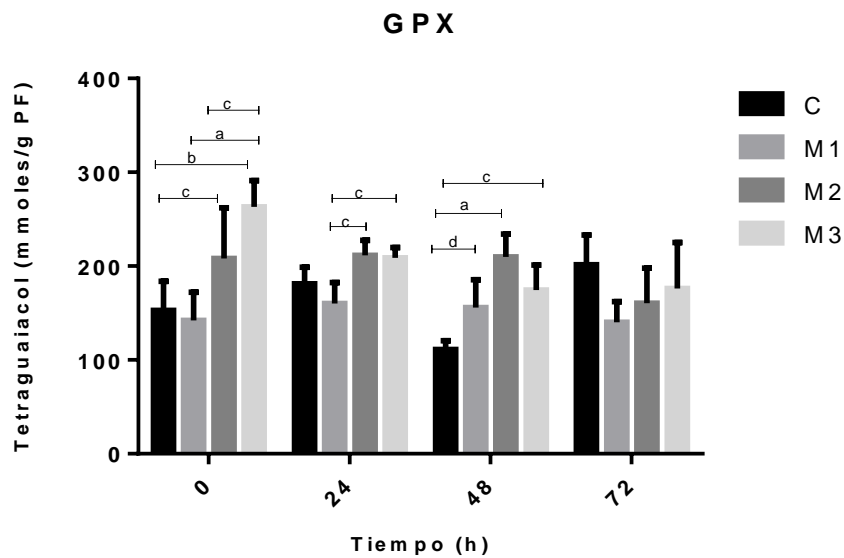


Figura 3 B: Efectos de la actividad de las enzimas GPX en poscosecha con la aplicación en campo de Me JA. Los datos corresponden a la media \pm DE (n = 20). La letra a representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en donde con valor p (< 0,0001) , b con valor p= 0.0001, c von valor p (< 0.001) y d con valor p (< 0,005).

8.3.2 Actividad enzimática de APX

La mayor diferencia entre la actividad enzimática de frutos control y frutos tratados con MeJA los mostró esta enzima ya que se observó en todos los tiempos una diferencia estadísticamente significativa entre los controles (figura 3C). No obstante, no hay una clara tendencia del aumento de producto relacionado al número proporcional de aplicaciones de MeJA.

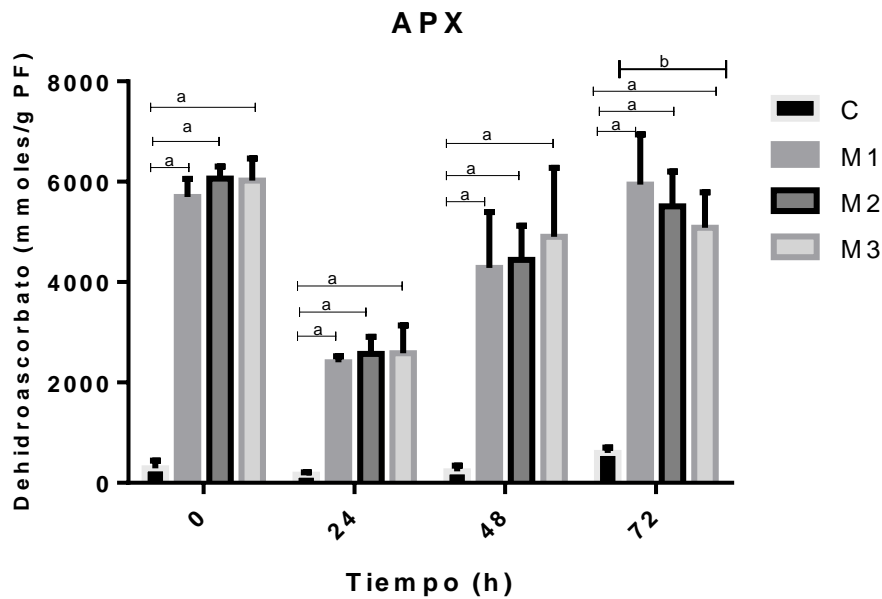


Figura 3C: Efectos de la actividad de la enzima APX (C) en poscosecha con la aplicación en campo de MeJA. Los datos corresponden a la media \pm DE (n = 20). La letra a representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en donde con valor p (< 0,0001) y b con valor p= 0.0001.

7.4.Relación contenido solidos solubles (CSS) y acidez titulable (AT).

La relación de CSS/AT no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las frutillas tratadas con MeJA con aplicación M1, M2 y M3, sin embargo se muestra una clara tendencia al alza de la relación al número ascendente de aplicaciones de MeJA, observándose un alza en la relación CSS/AT en los distintos tiempos (figura 4).

Relación Contenido de sólidos solubles y acidez titulable

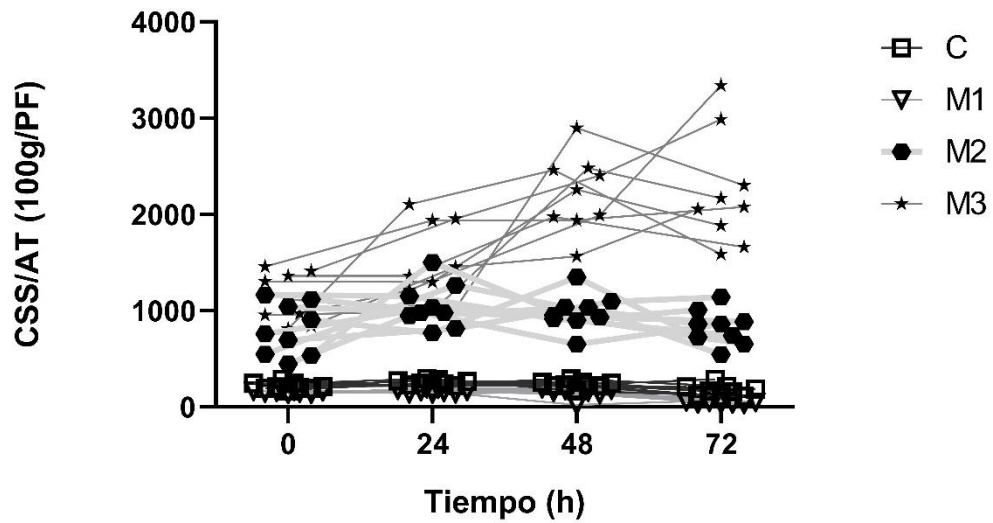


Figura 4: Efectos en la relación de CSS/AT en frutos tratados con MeJA en la poscosecha.

9.-DISCUSIÓN

Se ha informado que los tratamientos con Metil jasmonato exógenos promueven la síntesis de antocianinas (31) y los hallazgos del presente estudio concuerdan con el efecto de MeJA observado en el aumento en el contenido de antocianinas en las frutas tratadas con esta fitohormona. El aumento en equivalentes de pelargonidina visto en los resultados se explican ya que en la frutillas la pelargonidina-3-glucósido y la pelargonidina-3- *O* malonil-glucósido representan el 80% y el 14% del contenido total de antocianinas, respectivamente, que se acumulan al final del proceso de maduración (32), Por lo cual se podría inferir que la aplicación de MeJA participa la biosíntesis de antocianinas en frutillas a través de la activación de la señalización de MeJA por un aumento en la biosíntesis de JA-Ile ((33) En este estudio el uso de MeJA muestra un aumento del contenido de antocianinas siendo este proporcional al número de aplicaciones exógenas de esta MeJA como se ve en la fig. 2, de esta forma las muestras tratadas con tres aplicaciones (M3) exhibieron una aumento significativo ($p < 0,05$) de antocianinas en comparación con el contenido de muestras tratadas con una aplicación. Estos resultados son similares a los de Ju, Liu (34) en donde el tratamiento mejoró la síntesis de estructuras y la regulación de los genes en la vía de las antocianinas.

Lo expuesto en los resultados de PAs muestra una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo 0, relacionándose con el número de aplicaciones (M3) de esta fitohormona. A medida que se aumenta el tiempo poscosecha y número de aplicaciones de MeJA las concentraciones de proantocininas se mantienen altas y sin diferencias significativas. Ante lo tratado, por Pang et al. (35) muestra resultados similares, explicando que, existiría un aumento en los niveles de PA insolubles en las últimas etapas del desarrollo de la fruta, viéndose aumentadas, lo que sugirió que las proantocianinas en frutillas son inicialmente solubles y posteriormente se insolubilizan ,probablemente en la pared celular (36).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son formas parcialmente reducidas o excitadas de oxígeno atmosférico (O_2) producidas continuamente en las células durante el

metabolismo aeróbico (37). Pueden causar lesiones celulares extensas o la muerte, pero desempeñan un papel central en muchas vías de señalización en plantas involucradas en la percepción del estrés, la regulación de la fotosíntesis, la respuesta de patógenos, la muerte celular programada, la acción hormonal y el crecimiento y desarrollo de las plantas. Cualquier factor que disminuya las actividades metabólicas celulares y contribuya en sistemas de defensa contra diferente tipo de estrés, disminuirá la tasa de producción de radicales libres y la senescencia que conduce a la preservación de antioxidantes (17). Una mejora a lo antes mencionado se observa en las frutillas tratadas con MeJA, en las cuales se observan actividades significativamente más altas de catalasa (CAT), guaiacol peroxidasa (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX) en comparación a las muestras control.

El alza de la actividad enzimática mostrada de CAT y GPX, en frutos tratados con MeJA, se relaciona con otros estudio, por otros autores en frutos de níspero, los cuales concluyen que MeJA contribuye a la eliminación más fuerte de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (15). Según lo mencionado por Cao et al. (15) una progresiva baja en la actividad de CAT, tal como en esta investigación, sugieren que, el efecto de MeJA reduce de la aparición de lesiones por enfriamiento y se correlaciona con una actividad enzimática antioxidante mejorada. A su vez se sabe que CAT y GPX funcionan de forma sinérgica para desintoxicar los radicales libres, por lo cual el alza con sólo con una aplicación de MeJA, en la actividad enzimática de CAT, podría ser responsables de la eliminación de ROS durante el estrés, y GPX podría ser responsable de la mantención de ROS en niveles bajos, mediante señalización (37).

La mayor alza de la actividad enzimática en APX frutos tratados, se ha observado en otros estudios, en donde Petriccione et al (38) indicó que CAT podría ser responsable de la eliminación de ROS durante el estrés, y APX podría ser responsable del ajuste fino de ROS durante la señalización, mostrándose mayor actividad de esta.

Uno de los aspectos que refleja la madurez es el comportamiento de contenido de sólidos solubles (CSS) y acidez titulable (AT). El contenido de CSS está constituido por 80 a 95% de azúcares y la medida de CSS se encuentra asociada con los azúcares disueltos en el jugo celular (17). Con respecto a la calidad del fruto, relación de contenido de sólidos solubles (CSS) y acidez titulable (AT) (figura 4) las diferencias de SSC y de AT se atribuyeron a los distintos grados de maduración y al tratamiento con MeJA(38).esto dado por que la acumulación de los azúcares se asocia con el desarrollo de la calidad óptima para el consumo; aunque los azúcares pueden ser transportados al fruto por la savia, también son aportados por el desdoblamiento de las reservas de almidón de los frutos. Fischer y Martínez (39) afirman que cuando el fruto de la uchuva presenta su contenido de azúcares más alto ha alcanzado su madurez fisiológica, lo cual coincide con lo hallado para el estado M3 en la figura 4.

10.-CONCLUSIÓN

Los resultados nos muestran que MeJA tiene un papel clave en la mejora de la vida de postcosecha de las frutillas, los sistemas de defensa y antioxidantes. El tratamiento de las frutas cosechadas con MeJA, puede mejorar significativamente la vida de almacenamiento de la fruta, mejorar los atributos de calidad, y calidad nutricional al aumentar la capacidad antioxidante total y la actividad de las enzimas de defensa de la fruta.

Los efectos en la aplicación de esta fitohormona muestra una clara tendencia en los efectos ya sea de CSS y AT, antocianinas, proantocianinas durante el almacenamiento de postcosecha a mejorar estos parámetros mostrando una clara alza de ellos. . Esta mejora se mostró una relacionarían directamente proporcionalmente al número de aplicaciones en campo de MeJA en la mayoría de los parámetros medidos, por lo cual se responde a la hipótesis.

El efecto antioxidante fue potenciado por el uso de MeJA sin embargo no se relaciona con el número de aplicaciones, puesto que, tanto para CAT, APX y GPX la mejor actividad enzimática se obtienen con tan solo una aplicación. Con lo anterior se desprende que para mejorar los parámetros de calidad de acumulación de compuestos fenólicos y respuesta antioxidante como un todo, hace falta estudios, en donde la concentración de MeJA se optima y muestre una mejora en todos los parámetros con el mismo número de aplicaciones, la cual pudiese ocuparse en campo por pequeños y grandes agricultores como una técnica más de mejoramiento de producción.

11.-BIBLIOGRAFÍA

1. Carvajal de Pabón LM, El Hadi Y, Cartagena R, Peláez C, Gaviria CA, Rojano BA. Capacidad antioxidante de dos variedades de *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne (fresa) sometidas a variaciones en la nutrición vegetal. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012;17:37-53.
2. Njuguna W, Liston A, Cronn R, Ashman T-L, Bassil N. Insights into phylogeny, sex function and age of *Fragaria* based on whole chloroplast genome sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2013;66(1):17-29.
3. Liston A, Cronn R, Ashman T-L. *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany*. 2014;101(10):1686-99.
4. Iannetta PPM, Laarhoven L-J, Medina-Escobar N, James EK, McManus MT, Davies HV, et al. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum*. 2006;127(2):247-59.
5. Hancock JF, Lavín A, Retamales JB. Our Southern Strawberry Heritage: *Fragaria chiloensis* of Chile. *HortScience*. 1999;34(5):814-6.
6. Staudt G. TAXONOMIC STUDIES IN THE GENUS *FRAGARIA* TYPIIFICATION OF *FRAGARIA* SPECIES KNOWN AT THE TIME OF LINNAEUS. *Canadian Journal of Botany*. 1962;40(6):869-86.
7. Schaart JG, Dubos C, Romero De La Fuente I, Houwelingen AMML, Vos RCH, Jonker HH, et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *New Phytologist*. 2012;197(2):454-67.
8. Aaby K, Mazur S, Nes A, Skrede G. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*. 2012;132(1):86-97.

9. Wang SY, Jiao H. Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(11):5677-84.
10. Dixon RA, Xie D-Y, Sharma SB. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*. 2004;165(1):9-28.
11. Ibrahim DS, Abd El-Maksoud MAE. Effect of strawberry (*Fragaria × ananassa*) leaf extract on diabetic nephropathy in rats. *International Journal of Experimental Pathology*. 2015;96(2):87-93.
12. Elkhadragy MF, Kassab RB, Metwally DM, Almeer R, Abdel-Gaber R, Al-Olayan EM, et al. Protective effects of *Fragaria ananassa* methanolic extract in a rat model of cadmium chloride-induced neurotoxicity. *Bioscience Reports*. 2018.
13. Asghari M, Aghdam MS. Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(10):502-9.
14. Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. Ultraviolet-B- and Ozone-Induced Biochemical Changes in Antioxidant Enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 1996;110(1):125-36.
15. Cao S, Zheng Y, Wang K, Jin P, Rui H. Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. *Food Chemistry*. 2009;115(4):1458-63.
16. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 2002;7(9):405-10.
17. Asghari M, Hasanlooee AR. Methyl jasmonate effectively enhanced some defense enzymes activity and Total Antioxidant content in harvested “Sabrosa” strawberry fruit. *Food Science & Nutrition*. 2016;4(3):377-83.
18. J. Corpas F, Gupta D, Palma J. Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells. 2015. p. 1-22.
19. Martínez-Bolaños M, Nieto-Angel D, Téliz-Ortiz D, Rodríguez-Alcazar J, Martínez-Damian MT, Vaquera-Huerta H, et al. Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria x ananassa* Duch.) de cultivares mexicanos y estadounidenses. *Revista Chapingo Serie horticultura*. 2008;14:113-9.
20. Ribera AE, Reyes-Diaz M, Alberdi M, Zuñiga GE, Mora ML. ANTIOXIDANT COMPOUNDS IN SKIN AND PULP OF FRUITS CHANGE AMONG GENOTYPES AND

MATURITY STAGES IN Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Grown in Southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2010;10:509-36.

21. Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(11):4938-41.

22. Cheong J-J, Choi YD. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*. 2003;19(7):409-13.

23. Reyes-Díaz M, Lobos T, Cardemil L, Nunes-Nesi A, Retamales J, Jaakola L, et al. Methyl Jasmonate: An Alternative for Improving the Quality and Health Properties of Fresh Fruits 2016. 567 p.

24. Yang D-L, Yang Y, He Z. Roles of Plant Hormones and Their Interplay in Rice Immunity. *Molecular Plant*. 2013;6(3):675-85.

25. Yao HJ, Tian SP. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;98(4):941-50.

26. Concha CM, Figueroa NE, Poblete LA, Oñate FA, Schwab W, Figueroa CR. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013;70:433-44.

27. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 2005;88(5):1269-78.

28. Prior RL, Fan E, Ji H, Howell A, Nio C, Payne MJ, et al. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010;90(9):1473-8.

29. García-Limones C, Hervás A, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, Tena M. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2002;61(6):325-37.

30. G.M. Saavedra, N. E. Figueroa, L. A. Poblete, S. Cherian, C. R. Figueroa, Effects of preharvest applications of methyl jasmonate and chitosan on postharvest decay, quality and chemical attributes of *Fragaria chiloensis* fruit, *Food Chemistry*, Volume 190, 2016, Pages 448-453, ISSN 0308-8146,
31. Langlois J, Ballester J, Campo E, Dacremont C, Peyron D. Combining Olfactory and Gustatory Clues in the Judgment of Aging Potential of Red Wine by Wine Professionals. 2010;61(1):15-22.
32. Almeida JRM, D'Amico E, Preuss A, Carbone F, de Vos CHR, Deiml B, et al. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria ×ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007;465(1):61-71.
33. Delgado LD, Zúñiga PE, Figueroa NE, Pastene E, Escobar-Sepúlveda HF, Figueroa PM, et al. Application of a JA-Ile Biosynthesis Inhibitor to Methyl Jasmonate-Treated Strawberry Fruit Induces Upregulation of Specific MBW Complex-Related Genes and Accumulation of Proanthocyanidins. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2018;23(6):1433.
34. Ju Y-L, Liu M, Zhao H, Meng J-F, Fang Y-L. Effect of Exogenous Abscisic Acid and Methyl Jasmonate on Anthocyanin Composition, Fatty Acids, and Volatile Compounds of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) Grape Berries. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2016;21(10):1354.
35. Pang Y, Peel GJ, Wright E, Wang Z, Dixon RA. Early Steps in Proanthocyanidin Biosynthesis in the Model Legume *Medicago truncatula*. 2007;145(3):601-15.
36. Jaakola L, Määttä K, Pirttilä AM, Törrönen R, Kärenlampi S, Hohtola A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant physiology*. 2002;130(2):729-39.
37. Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *The Plant cell*. 2005;17(1):268-81.
- 38 Petriccione M, Mastrobuoni F, Pasquariello MS, et al. Efecto del recubrimiento de quitosano sobre la calidad poscosecha y la respuesta del sistema enzimático antioxidante de

la fruta de fresa durante el almacenamiento en frío.*Los alimentos* .2015; 4 (4): 501-523. Publicado 2015 sep 29. doi: 10.3390 / foods4040501

39. Montero-Calderón M, Rojas-Graü MA, Martín-Belloso O. Aroma Profile and Volatiles Odor Activity Along Gold Cultivar Pineapple Flesh. *Journal of Food Science*. 2010;75(9):S506-S12.

40. Fischer G, Martínez O. Calidad y madurez de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en relación con la coloración del fruto1999. 35-9 p.