

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**ROL DE LA CERA CUTICULAR EN LA SUSCEPTIBILIDAD A
PARTIDURA EN DOS VARIEDADES CONTRASTANTES DE CEREZAS**

FRANCISCA FABIOLA MATUS CAMPOS

Santiago, Chile
2013

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**ROL DE LA CERA CUTICULAR EN LA SUSCEPTIBILIDAD A
PARTIDURA EN DOS VARIEDADES CONTRASTANTES DE CEREZAS**

**ROLE OF CUTICULAR WAX IN SUSCEPTIBILITY TO CRACKING IN
TWO CONTRASTING VARIETIES OF SWEET CHERRIES**

FRANCISCA FABIOLA MATUS CAMPOS

**Santiago, Chile
2013**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

ROL DE LA CERA CUTICULAR EN LA SUSCEPTIBILIDAD A PARTIDURA
EN DOS VARIEDADES CONTRASTANTES DE CEREZAS

FRANCISCA FABIOLA MATUS CAMPOS

Memoria para optar al título
Profesional de Ingeniero Agrónomo

| PROFESOR GUÍA | CALIFICACIONES |
|---|-----------------------|
| Sr. Herman Silva A. Bioquímico, Ph. D. | 7,0 |
| PROFESORES EVALUADORES | |
| Sra. Karen Sagredo U. Ingeniero Agrónomo, Ph. D. | 6,4 |
| Sra. María Verónica Díaz M. Ingeniero Agrónomo, Mg.Sc. | 6,5 |
| COLABORADOR | |
| Sr. Juan Carlos Ríos Q. Bioquímico, Mg.Sc. | |

Santiago, Chile
2013

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar primeramente mi gratitud a quienes han estado todos los días acompañándome en este largo proceso de formación profesional, muy especialmente al apoyo incondicional de mi familia, en particular a mi padre quien ha sido mi pilar fundamental desde lo vocacional a inspiración a no dejar de trabajar por las metas. Agradezco el apoyo de mi madre, mi hermano, mis tíos y a mi nueva familia, especialmente Karol y la tía Rosario.

Además agradezco a las personas que me ayudaron en la realización de esta investigación a mi colaborador Juan Carlos Ríos, al profesor Herman Silva A. y a Ernesto Torres, quienes me cooperaron en llevar a cabo mi memoria junto con el equipo del Laboratorio de Genómica Funcional & Bioinformática, también a la profesora Karen Sagredo y su grupo de trabajo, que me ayudaron tanto en conseguir el material vegetal y a organizar mis ensayos.

También quiero incluir a las personas que han sido importantes desde que inicie mis estudios en el área Agropecuaria, desde la vocación a partir de mi familia de origen rural, los profesores de mi querida Escuela Particular n° 42 Malloco, donde siempre me incentivaron a cumplir los sueños, al Complejo Educacional Agrícola de Talagante, que me entregaron las bases para enfrentarme al desafío de una profesión agrícola, al cuerpo docente de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, quienes me han entregado las herramientas para realizar este estudio y completar mi formación profesional.

Tampoco quiero dejar fuera al equipo del Laboratorio de Post-cosecha de CRI INIA La Platina a cargo del Dr. Bruno Defilippi, que también cooperaron en la realización de esta investigación y además me recibieron en ambas prácticas profesionales primero como Técnico Agropecuario nivel Medio y luego como Ingeniero Agrónomo, siendo la primera vez cuando me incentivaron estudiar la carrera en esta casa de Estudios.

Al proyecto FONDECYT N° 1120261 “Functional genomics approach to understand cracking susceptibility in sweet cherry: an integrative view for *Prunus* species” que gracias a su financiamiento pude llevar a cabo esta investigación.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE | 1 |
| RESUMEN..... | 2 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 4 |
| Hipótesis..... | 6 |
| Objetivo general | 6 |
| Objetivos específicos | 6 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| Lugar de Trabajo | 7 |
| Materiales..... | 7 |
| Tratamientos..... | 7 |
| Metodología | 8 |
| Extracción de ceras | 8 |
| Aislación de cutícula..... | 8 |
| Evaluaciones | 9 |
| Caracterización de los frutos de cada variedad..... | 9 |
| Cuantificación estomática | 10 |
| Permeabilidad de cutículas..... | 10 |
| Partidura <i>in vitro</i> | 11 |
| Diseño experimental y análisis estadístico..... | 11 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 11 |
| Caracterización de variedades..... | 12 |
| Cuantificación estomática | 13 |
| Permeabilidad..... | 14 |
| Partidura <i>in vitro</i> | 15 |
| Diferencia de masa..... | 18 |
| CONCLUSIONES | 20 |
| BIBLIOGRAFÍA | 21 |
| APÉNDICE | 25 |
| Apéndice I. Curvas de permeabilidad de cutículas..... | 25 |
| Apéndice II. Resultados del ensayo partidura <i>in vitro</i> en el tiempo | 31 |
| Apéndice III. Variación de peso en ensayo de partidura <i>in vitro</i> | 33 |

RESUMEN

ROL DE LA CERA CUTICULAR EN LA SUSCEPTIBILIDAD A PARTIDURA EN DOS VARIEDADES CONTRASTANTES DE CEREZAS

La partidura es uno de los problemas más importantes que enfrentan los productores de cerezas, trayendo consigo una pérdida en la producción y en la rentabilidad. El mecanismo de la partidura está dado principalmente por el colapso de las células epidurales por entrada de agua al fruto. En este sentido, la cutícula juega un rol importante en la prevención de la partidura, limitando la entrada y salida del agua del fruto.

Este estudio postula que la cera cuticular de la cereza es un componente que modifica la entrada y salida de agua en el fruto, así como la susceptibilidad a la partidura. De esta manera, se relacionó la susceptibilidad de dos variedades de cerezas de diferente comportamiento a la partidura con su cera cuticular, donde se realizó un ensayo de partidura *in vitro* y un ensayo de permeabilidad de cutícula.

Las variedades Rainier y Regina (con alta y baja susceptibilidad a la partidura respectivamente) fueron sometidas a tratamientos consistentes en diferentes tipos de remoción de cera: frotación con pañuelos; mediante solventes químicos (cloroformo y hexano); tratamiento combinado, consistente en frotar los solventes a través de pañuelos; comparándose con un testigo sin remoción. Para el ensayo de partidura *in vitro*, se evaluó y comparó entre tratamientos el porcentaje de frutos partidos a las 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas, de sumergidos los frutos en agua. Lo mismo para el ensayo de permeabilidad de cutícula, se evaluó la pérdida de vapor de agua luego de 2, 4, 6 y 24 horas de someter cutículas a 25°C.

En 'Regina', la extracción química a través de hexano, presentó menor incidencia de frutos partidos (35%); mientras que en 'Rainier', la menor incidencia se obtuvo a través de la extracción de cera mecánica con hexano (70%). Además en 'Rainier', los tratamientos de extracción con hexano y cloroformo, junto con la extracción de cera mecánica con hexano, sufrieron una modificación en el flujo de agua, pasando desde un potencial osmótico a uno por difusión, situación que igualmente produjo partidura.

Por otra parte, todos los tratamientos de extracción de cera favorecieron la salida de agua del fruto y 'Regina' presentó mayor permeabilidad que 'Rainier', lo que disminuiría la ocurrencia a partidura.

Palabras clave: partidura *in vitro*, extracción de cera, hexano, cloroformo, permeabilidad de cutícula.

ABSTRACT

ROLE OF CUTICULAR WAX IN SUSCEPTIBILITY TO CRACKING IN TWO CONTRASTING VARIETIES OF SWEET CHERRIES

This study suggests that cuticular wax of sweet cherry fruits is a component that modifies the entrance and exit of water as well as susceptibility to cracking of the fruit. Therefore using two varieties with different tolerance to cracking, Regina (high) and Rainier (low), we did a cracking *in vitro* assay and cuticle permeability assay to see the differences between them.

'Rainier' and 'Regina' fruits were submitted to different removal treatments of wax: rubbing with a paper towel, using chemical solvents (chloroform-hexane), combined treatment consisting solvent rub through a paper towel, and compared with a control without removal. For testing parting *in vitro*, was evaluated and compared between treatments the percentage of fruit games at 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours, the fruit submerged in water. Same for cuticle permeability test, the water vapor loss after 2, 4, 6 and 24 hours of subjecting cuticles was evaluated at 25 °C.

The cracking results showed that after 24 hours the variety Regina presents a 35% of fruit damaged by cracking using a chemical extraction of the wax by hexane, whereas for 'Rainier' the lower damage by cracking was obtained through the mechanical extraction plus hexane, with 70% of fruit cracking.

In the cuticle permeability assay, the results were different between treatments and varieties, but all treatments for wax cuticle extraction exhibited an increase in water loss through the cuticle membrane. 'Regina' presented a higher permeability than 'Rainier', factor that decrease the fruit cracking.

Key words: cracking *in vitro*, wax extraction, hexane, chloroform, cuticle permeability.

INTRODUCCIÓN

El cerezo (*Prunus avium* L.) es un árbol frutal de hoja caduca altamente cultivado a nivel mundial, principalmente en el Hemisferio Norte, donde los principales países productores son Turquía, Estados Unidos, Irán, Italia y España (Bravo, 2012). Entre los países productores, Chile ocupa el noveno lugar aportando un 3,4% del total de la superficie mundial plantada, siendo además el mayor exportador de cerezas desde el Hemisferio Sur, con un 68% del total de toneladas exportadas desde esta región, cuyos principales destinos son Estados Unidos, Hong Kong, China y Taiwán, mercados que representan el 85% de las exportaciones (Navarrete *et al.*, 2010).

La superficie plantada en Chile ha aumentado en 7.998 ha desde el año 2004 al 2012, alcanzando las 15.198 ha en la actualidad (ODEPA, 2012), favorecido principalmente por el aumento sostenido de la demanda de este fruto, así como por el aumento de sus precios de comercialización (Bravo, 2012). Dado el aumento de la demanda internacional, la producción de cerezas en la zona sur de Chile pasa por una fase de expansión productiva, basándose principalmente en variedades tardías y semitardías (Ellena *et al.*, 2006) las cuales consiguen mejores precios en la exportación, ya que la oferta de este fruto a nivel mundial es menor en dichos periodos de producción (Navarrete *et al.*, 2010). Este escenario hace que los parámetros de calidad del fruto como color, calibre, sólidos solubles y ausencia de desórdenes fisiológicos y superficiales sean relevantes para su exportación. Sin embargo a medida que avanza su cultivo hacia el sur del país, también aumentan las precipitaciones en esa área lo que complica la producción por la probabilidad de lluvias durante la maduración de la fruta y en época de cosecha, situación que aumenta el riesgo de presentar partidura o *cracking* en la fruta.

La partidura o *cracking* es uno de los problemas más importantes que enfrentan los productores de cerezas en Chile (Yuri *et al.*, 2010). Según Christensen (1996) la partidura puede llegar a afectar hasta el 90% de la producción, trayendo consigo una pérdida en la rentabilidad, ya que el fruto deja de estar en condición de ser exportable. Por otra parte las heridas presentes en la piel se convierten en una vía de fácil entrada para diversos patógenos, favoreciendo la pudrición de los frutos (Valenzuela, 2007).

El mecanismo de la partidura en cerezas está dado principalmente por la entrada de agua al fruto, incrementando la presión osmótica al interior del mismo, lo que deriva en un aumento del volumen provocando finalmente el colapso de las células epidérmicas (Sawada, 1931; Verner y Blodgett, 1931; Christensen, 1976). Asimismo, Yuri *et al.*, (2010), reportaron que es suficiente que el fruto aumente su tamaño por absorción de agua entre un 2% a 3% de su volumen para que se produzca este fenómeno. No obstante, el agua puede entrar y salir de la fruta a través del pedúnculo y a través de la cutícula de la fruta (Combe, 1976), no obstante Christensen (1996) atribuye este problema al contacto directo del agua con la epidermis del fruto.

Dentro de los factores asociados a la partidura de cerezas, encontramos la cantidad de precipitación en un mismo evento, la distribución de las precipitaciones durante el

periodo de crecimiento del fruto, el tipo de suelo más las condiciones de humedad del huerto y la susceptibilidad genética (Simon, 2003). Además, la partidura se vería favorecida por otros factores, como fruta de tamaño más grande, el aumento en el contenido de sólidos solubles, ambas cualidades confirmadas por Tucker (1934) y Christensen (1975), así como variedades de pulpa más firme (Christensen, 1996). Sin embargo, aún no se ha logrado determinar específicamente todos los factores que están involucrados en la partidura de la epidermis de las cerezas (Simon, 2006).

Por otro lado, Sekse (1998) señala que existen dos características morfológicas del fruto y el árbol que son importantes cuando se habla de partidura: el tejido vascular, capaz de transportar agua desde la raíz al fruto, y la cutícula de la fruta que limita la entrada y salida del agua del fruto. La cutícula además confiere protección a las plantas contra agentes patógenos, daño mecánico, pérdida de agua descontrolada en sequía, protección al daño por radiaciones ultravioleta e incluso participa en la interacción de plantas con insectos (Riederer y Schreiber, 1995; Kunst y Samuels, 2003). Estas características se deben básicamente al revestimiento de ceras en la cutícula, estando presente en todos los órganos y estructuras de las plantas, exceptuando las raíces (Martin y Juniper, 1970; Jeffree, 1996; Post-Beittenmiller, 1996).

Knoche *et al.* (2000a) relacionaron positivamente el fenómeno de la partidura con la conducción del agua a través de la membrana cuticular. Además en la misma publicación se demostró que las ceras dermales de la epidermis de cerezas tienen un rol importante en la absorción y conducción del agua a nivel cuticular, dado que al remover las ceras, la conducción del agua a nivel de la epidermis aumenta significativamente. De igual modo, Peschel y Knoche (2012) aseguran que las diferencias varietales en la susceptibilidad a la partidura pueden atribuirse a características de transporte de agua en la superficie de la fruta, epicarpio, y/o constitución de la cutícula que permitiría una mayor resistencia en la absorción de agua. Por otra parte, en otro estudio se comprobó que un importante porcentaje de la absorción de agua en el fruto es realizada a través de los estomas (Sawada, 1931; Christensen, 1972a) y además se confirmó que la superficie estomática varía de acuerdo a los cultivares según los estudios realizados por Peschel *et al.*, (2003).

Existe evidencia que muestra que los estomas están relacionados con el transporte de agua hacia el fruto en cerezas, demostrándose una relación positiva entre la tasa de absorción de agua y la superficie estomática (Christensen, 1972a). En otros estudios (Knoche *et al.*, 2000a y 2000b) observaron un aumento en la conductancia del exocarpo en transpiración, además Beyer y Knoche (2002) comprobaron que aumentaba más la absorción de agua al aumentar la superficie estomática. No obstante Peschel *et al.*, (2003), señalaron que los estomas presentes en las cerezas en la etapa de madurez no son funcionales.

Existen varias estrategias para disminuir la incidencia de partidura, como evitar la exposición de los frutos a la lluvia mediante coberturas protectoras, tratamientos químicos como las aplicaciones de calcio, aluminio, cobre, boro u otras sales metálicas, las que han demostrado tener resultados variables, donde actualmente la mejor alternativa para evitar o disminuir la incidencia de partidura, es el uso de variedades más tolerantes a esta fisiopatía (Christensen, 1996; Joublan, 2004; Simon, 2006;

Peschel y Knoche, 2012).

Por lo tanto, estudiar y entender cuáles son las características que le otorgan al fruto tolerancia a la partidura, sería de gran importancia en los programas de mejoramiento genético en cerezos (Peschel y Knoche, 2012). Para esto, es fundamental tratar de entender en su totalidad este fenómeno y encontrar la mayoría, sino todos, los factores que tengan un rol en la génesis y desarrollo de esta fisiopatía, como lo podría tener la cera cuticular.

Hipótesis

La cera cuticular del cerezo es un componente que modifica la entrada y salida de agua en el fruto, así como la susceptibilidad a la partidura.

Objetivo general

Relacionar la susceptibilidad de dos variedades de cerezas de diferente comportamiento a la partidura, con su cera cuticular.

Objetivos específicos

- Cuantificar el porcentaje de partidura *in vitro* de dos variedades contrastantes en su susceptibilidad a la partidura de cerezas.
- Implementar diferentes metodologías de extracción de cera y cuantificar su porcentaje de partidura.
- Estimar “indirectamente” y comparar la cantidad de cera cuticular, en dos variedades de cerezas con distinta susceptibilidad a la partidura.
- Evaluar la variabilidad en el número de estomas en la epidermis de las cerezas con distinta susceptibilidad a la partidura.
- Evaluar la permeabilidad de la epidermis en frutos de cerezas a los cuales se le ha removido la cera cuticular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Trabajo

Los ensayos y evaluaciones fueron realizados en la temporada 2012-2013. La mayoría de ellos se realizaron en el laboratorio de Genómica Funcional & Bioinformática, perteneciente al Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. La evaluación de firmeza se realizó en el Laboratorio de Postcosecha del INIA CRI La Platina.

Materiales

El material vegetal usado fueron cerezas maduras de las variedades Rainier, la cual presenta una alta sensibilidad a la partidura y Regina, variedad que tiene una baja susceptibilidad a la partidura (Carrasco y Aliaga, 2011).

La variedad Rainier proviene del fundo San Luis (Longitudinal Sur Km. 197), Curicó, Región del Maule, cosechada el 5 de diciembre del año 2012 y 'Regina' del fundo El Mirador, Panguipulli, Región de Los Ríos, recolectadas el 21 de enero del año 2013. Se realizó una selección completamente al azar de 20 árboles como unidad muestral, de donde se eligieron 20 frutos aleatoriamente por árbol para ser sometidos a las diferentes evaluaciones.

Los reactivos químicos utilizados fueron Cloroformo (Merck, grado biología molecular) y n-Hexano (Merck, grado biología molecular).

Las enzimas utilizadas en los ensayos fueron Pectinasa y Celulasa, (Sigma-Aldrich®, obtenidas desde *Aspergillus niger*), las cuales reaccionan bajo un 'buffer' de ácido cítrico (C₆H₈O₇, Winkler®). Para la conservación de las cutículas se usó una solución de ácido bórico (H₃BO₃, Winkler®).

Tratamientos

Para la realización de los ensayos de partidura *in vitro* y permeabilidad de cutículas, se requirió de la extracción de cera de la epidermis de los frutos, para lo cual se realizaron cinco tratamientos, consistentes en la remoción mecánica, la utilización de dos solventes orgánicos, y la combinación de la extracción química y mecánica. Además, se consideró un tratamiento control, sin remoción de cera, tal como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos de extracción de cera cuticular en cerezas ‘Rainier’ y ‘Regina’.

| Tratamiento | Tipo de extracción | Método de extracción |
|-------------|--------------------|--|
| T1 | Control | Testigo |
| T2 | Químico | Cloroformo |
| T3 | Químico | Hexano |
| T4 | Mecánico | Pañuelo de papel |
| T5 | Combinado | Pañuelo de papel embebido con cloroformo |
| T6 | Combinado | Pañuelo de papel embebido con hexano |

Metodología

Extracción de ceras

Extracción química: se efectuó por medio de dos solventes orgánicos. Para la extracción de cera cuticular por medio de cloroformo se utilizó el método de Mayes *et al.* (1986) modificado, consistente en sumergir un fruto en cloroformo durante un minuto a 50°C, esto para la extracción total de cera. Dado el daño que provoca este método en la fruta, ya que el cloroformo puede dañar los componentes y estructuras orgánicas de la cutícula (Xiang y Anderson, 1994), éste fue modificado de la siguiente manera: para el ensayo de partidura *in vitro* se sumergieron frutos en cloroformo a temperatura ambiente durante 60 segundos y para permeabilidad de cutículas, por 10 segundos a temperatura ambiente.

Para la extracción de cera cuticular a través de hexano, se sumergieron los frutos en n-hexano, a temperatura ambiente, donde el fruto permanecía inmerso durante 60 segundos (Johan *et al.*, 2007). Este procedimiento fue utilizado tanto para ensayos de permeabilidad y partidura *in vitro*.

Extracción mecánica: esta extracción de cera cuticular se realizó frotando toda la superficie de los frutos con pañuelos de papel suave, durante 50 segundos, con lo que se consigue remover cera cuticular ocasionando el menor daño posible sobre la epidermis.

Extracción combinada: fue realizado a través de pañuelos de papel suave, que se embebieron con solvente orgánico, cloroformo o n-hexano. Con los pañuelos embebidos se frotó toda la superficie de los frutos durante 50 segundos.

Aislación de cutícula

Para este procedimiento debió extraerse, mediante un sacabocados, epidermis de frutos de la variedad Regina y Rainier, sometidos a los tratamientos de remoción de cera cuticular. Las cutículas fueron aisladas según el método descrito por Schönherr y Riederer (1986), consistente en la acción enzimática de pectinasa (2% p/v) y celulasa (1% p/v), en un buffer acuoso basado en ácido cítrico (20 mM) y ajustado a pH 4 con KOH. A esta solución se le agregó azida de sodio (1 mM) como compuesto antifúngico para la protección de la membrana cuticular. La acción enzimática fue realizada en

tubos cónicos de 50 ml con 10 cutículas c/u a 150 rpm durante 6 hrs a 27°C. Después de este tiempo las cutículas aisladas fueron lavadas y conservadas en un medio de ácido bórico, concentrado al 1% p/p (Ruzin, 1999).

Evaluaciones

Caracterización de los frutos de cada variedad

Se determinaron diferentes parámetros de los frutos en su recepción que se consideraron como los más relevantes en el proceso de la partidura inherentes al fruto: tamaño de la fruta, la concentración de sólidos solubles, según Tucker (1934) y Christensen (1975) y firmeza de la pulpa (Christensen, 1996), también se consideró en este estudio la variable materia seca. Adicionalmente para la comparación de las variedades a través de su contenido de cera, se consideró estimar indirectamente la cantidad de cera cuticular.

Diámetro de frutos: como referencia del tamaño de la fruta con la que se trabajó en ambas variedades se estimó el diámetro ecuatorial, de 20 frutos, a través de un pie de metro profesional digital, con precisión de 0,01 cm. Los datos fueron expresados en mm.

Sólidos solubles totales: se determinó mediante un refractómetro termo compensado (REF 102/112, Veto®), en donde se analizaron 20 frutos por variedad. Los resultados fueron expresados como porcentaje de sólidos solubles totales.

Firmeza de frutos: se determinó la firmeza de 20 frutos (con su pedúnculo), seleccionados al azar, con un analizador de firmeza (Firmtech 2®, BioWork Inc., U.S.A.), el cual mide la presión necesaria para deformar la baya en un milímetro. Su unidad de medida es g mm^{-1} .

Porcentaje de materia seca: Se determinó la cantidad de agua de 20 frutos por variedad, sin pedúnculo y con carozo. Cada fruto fue puesto en un contenedor de papel aluminio. Los frutos en sus contenedores se sometieron a un alza de temperatura gradual, iniciando con 80°C y aumentando 20°C cada 2 horas hasta alcanzar los 180°C, temperatura a la que permanecieron por 12 horas para luego aumentar a 200°C, temperatura en la que permanecieron 48 horas, en un horno Drying Over. El porcentaje de materia seca se calculó bajo la diferencia de peso inicial y final de los frutos, expresándolos en porcentaje, basándose en la deshidratación de los frutos.

Estimación de cera total: la cantidad de cera se estimó indirectamente por diferencia de peso de un fruto fresco y el mismo fruto luego de tratado con cloroformo durante un minuto a 50°C (Mayes *et al.*, 1986). La diferencia de masa se realizó con una balanza analítica Modelo ESJ200-4 con precisión de 0,0001 g y se expresó en porcentaje de masa que esta contribuye al total del fruto.

Cuantificación estomática

La cuantificación estomática se realizó en un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS modelo FV-100, bajo el lente objetivo de 10x. Se observaron 15 cutículas sanas y sin remoción de cera por variedad, a cada una de estas cutículas se observaron 8 campos ópticos.

Peschel *et al.* (2003) comprobaron que la densidad estomática varía de acuerdo a la zona del fruto, disminuyendo desde la zona peduncular, por lo que se utilizaron únicamente cutículas de la zona de las mejillas de los frutos. Con estas observaciones se determinó el promedio de estomas para una superficie determinada y se llevó al total de estomas en la superficie de cada fruto. Los frutos se consideraron como una esfera para calcular el área, donde finalmente se utilizó la siguiente relación.

$$\frac{\text{Cantidad de estomas}}{\text{área de observación}} : \frac{\sum \text{estomas total}}{\text{área total}}$$

Permeabilidad de cutículas

Este ensayo requirió que cutículas aisladas se sometieran a un sistema semipermeable de placas Petri con un orificio de 0,5 cm². Estas placas contenían 3 mL de agua destilada y se sellaron lateralmente con lámina de cierre Parafilm®, American National Cam. La cutícula se colocó en la zona de la apertura de la placa y fue sellada con esmalte (Figura 1). Para este estudio se utilizaron ambas caras de la epidermis, interna y externa, para generar una simulación entre la entrada y salida del agua a través de las cutículas, tal como se puede apreciar en la Figura 2. Además simultáneamente se utilizaron dos controles, el primero con la placa Petri completamente hermética y el segundo con la placa perforada sin membrana, ambos con un contenido inicial de 3 mL de agua destilada.

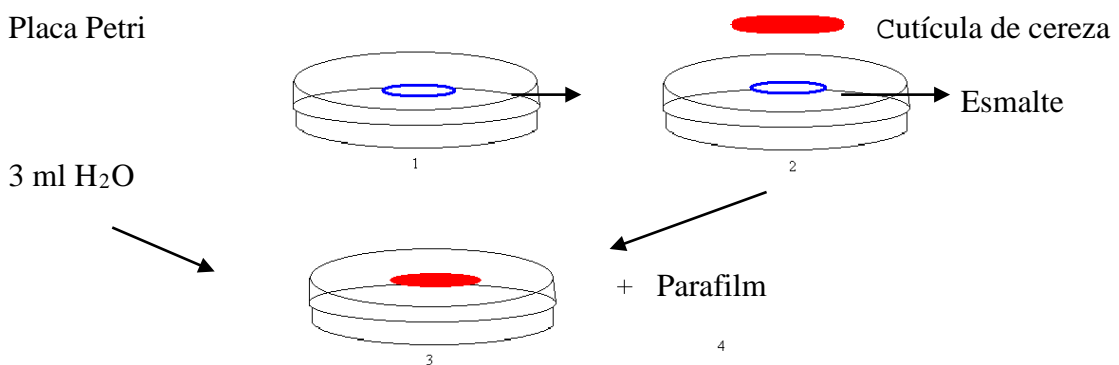


Figura 1. Diagrama de Ensayo de Permeabilidad de cutícula

Las placas se montaron en un sistema de temperatura constante de 25°C, donde se evaluó la pérdida de vapor de agua expresada en mg de agua perdida por cm² de cutícula (Baéz-Sañudo *et al.*, 1993) cada dos horas hasta las 6 horas, en cada variedad y tratamiento.

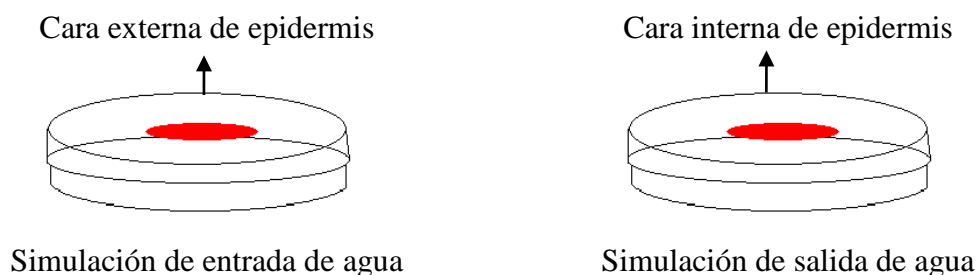


Figura 2. Diagrama simulación de entrada y salida de vapor de agua

Partidura *in vitro*

Este ensayo se realizó por el método de Christensen (1972b), donde se sumergieron cerezas sanas, con pedúnculo, en agua destilada contenida en vasos precipitados, a temperatura ambiente. Previamente estos frutos fueron sometidos a los diferentes tratamientos de extracción de cera. Luego a estos frutos se evaluó la masa (g) y la existencia del daño por partidura (escala 0= fruta sana y 1= fruta partida), en diferentes tiempos de inmersión: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas, donde se consideró el tiempo 0 como el momento de montaje del ensayo.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para el análisis de los ensayos en partidura *in vitro* se usó un diseño experimental completamente aleatorio con arreglo factorial de 2 x 6, siendo el primer factor dos variedades con diferente susceptibilidad a la partidura y el segundo los tratamientos de remoción de cera más un testigo sin remoción, donde se midieron 20 unidades por tratamiento siendo la unidad experimental un fruto. Los datos fueron analizados mediante un ANDEVA (análisis de varianza) y al existir diferencias significativas ($p \leq 0,05$) se aplicó la prueba Kruskal-Wallis para variables no paramétricas. Conjuntamente se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre partidura *in vitro* con permeabilidad y ganancia de masa.

En la comparación de dos muestras se aplicó la prueba de t-Student al 5%. Además se realizaron regresiones para las evaluaciones de permeabilidad y para diferencia de peso en el ensayo de partidura *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de variedades

Las diferencias más relevantes entre las variedades estudiadas, asociadas al proceso de partidura, fueron los sólidos solubles totales, el porcentaje de cera y la materia seca (Cuadro 2). Dentro de estos factores el más importante es la concentración de sólidos solubles, existiendo antecedentes de que a mayor porcentaje de sólidos solubles es mayor la incidencia a partidura (Tucker 1934; Christiensen 1975), pero Yuri *et al.* (2010), determinaron que en condiciones de laboratorio las cerezas sufren de daño por partidura a partir de los 16° Brix, sin importar la diferencia de esta.

Por otra parte, la variedad Regina presentó mayor porcentaje de ceras que 'Rainier', lo cual se debería a la diferencia de tamaño de los frutos, representando la variedad Rainier una esfera más grande que la variedad Regina y por ende tienen diferencia en su área. En este sentido, Peschel *et al.* (2007) demostraron que el porcentaje de cera disminuye a medida que los frutos aumentan de tamaño en la fase III de crecimiento.

Cuadro 2. Parámetros observados en 'Regina' y 'Rainier' a recepción de la fruta.

| Variedad | Sólidos solubles totales (%) | Diámetro ecuatorial (mm) | Firmeza (g mm ⁻¹) | Materia seca (%) | Cera (%) |
|----------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Rainier | 17,4 ± 2,2 ¹ | 30,2 ± 3,3 ¹ | 267,6 ± 34,2 | 13,5 ± 2,5 ¹ | 0,21 ± 0,1 ¹ |
| Regina | 18,5 ± 1,3 | 26,1 ± 3,7 | 281,4 ± 37,2 | 19,7 ± 2,5 | 0,54 ± 0,1 |

¹Representan diferencias significativas entre las variedades, t-Student ($p \leq 0,05$).

Esta última diferencia entre las variedades puede implicar un factor importante en la susceptibilidad a la partidura. No obstante, el método de cuantificación de cera utilizado en este estudio no es el más adecuado, ya que el cloroformo es capaz de extraer otros elementos diferentes a la cera, dañando la pared y la membrana celular, solubilizando, precipitando y desnaturalizando lípidos (Xian y Anderson, 1994), polisacáridos (Hussain *et al.*, 2008) y proteínas (Asakura *et al.*, 1978), elementos que estarían afectando el resultado de la estimación de cera total mostrado en el Cuadro 2.

Ríos y Silva¹ (comunicación personal) determinaron que en la cera epicuticular de frutos de cerezas, los alcanos de 29 carbonos juegan un papel importante en el proceso de tolerancia a la partidura, determinando para frutos de la variedad 'Rainier' la concentración de alcanos de 29 carbonos en $4,4 \times 10^{-2}$ M, mientras que en los frutos de la variedad Lapins, con similar resistencia a partidura que 'Regina' (Bargioni, 1996), analizada en este estudio, presenta una concentración de 4×10^{-4} M de estos alcanos, considerando que frutos con menor concentración de alcanos de 29 carbonos favorecen

Ríos, J.C. y H. Silva. 2013, ago. Producción Agrícola. [Entrevista personal]. Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

la permeabilidad a través de la cutícula, lo que tendría una menor incidencia a la partidura de frutos. No obstante a esto hay otras evidencias que señalan a la variedad Lapins con una susceptibilidad a partidura mayor a 'Regina' para condiciones chilenas (Carrasco y Aliaga, 2011).

Dado a que el método utilizado por Ríos y Silva fue más fiel en cuantificación de alcanos, ya que el realizado el presente estudio no consideró la extracción de otros elementos en la extracción total de ceras, mientras, se puede concluir que la menor concentración de alcanos de 29 carbonos proporciona mayor resistencia en la partidura permitiendo que la cutícula elimine agua contenida en su interior, datos que se pueden comparar con el cuadro de permeabilidad realizado en este ensayo, donde 'Regina' presenta mayor tasa de pérdida de agua al invertir la cutícula que la variedad Rainier (Cuadro 4) situación que simula la salida de agua a través del fruto, siendo a la vez la variedad que obtuvo un menor porcentaje de fruta partida al cabo de las 24 horas de sumergida la fruta en agua (Cuadro 5).

Cuantificación estomática

Según la cuantificación estomática, se observan diferencias en el número de estomas por fruto entre 'Rainier' y 'Regina' (Cuadro 3). Peschel *et al.* (2003) confirmaron que las variedades de cerezas tienen diferencias a nivel estomático, en la densidad, tamaño y número de estomas.

En este caso no existe diferencia en el número de estomas por superficie entre las variedades. Sin embargo, la variedad Rainier al tener mayor superficie posee más estomas por fruto, lo que puede implicar una mayor entrada de agua hacia los frutos (Knoche, y Peschel, 2002), lo que contribuiría a su vez, a una mayor susceptibilidad a la partidura al existir mayor cantidad de vías de entrada de agua hacia el fruto. También se podría relacionar con la mayor susceptibilidad a la partidura que presentan frutos más grandes (Tucker, 1934), aunque esto varía dependiendo de las variedades.

Cuadro 3. Tabla de cuantificación estomática para las variedades Rainier y Regina.

| | Superficie de un fruto (cm ²) | Estomas por mm ² | Estomas por fruto |
|---------|--|--------------------------------|---------------------|
| Rainier | 28,65 ± 0,62 ¹ | 0,101 ± 0,0027 ns ² | 289,36 ¹ |
| Regina | 21,20 ± 0,73 | 0,106 ± 0,0041 | 224,72 |

¹ Representan diferencias significativas entre las variedades, t-Student ($p \leq 0,05$).

² No existen diferencias significativas.

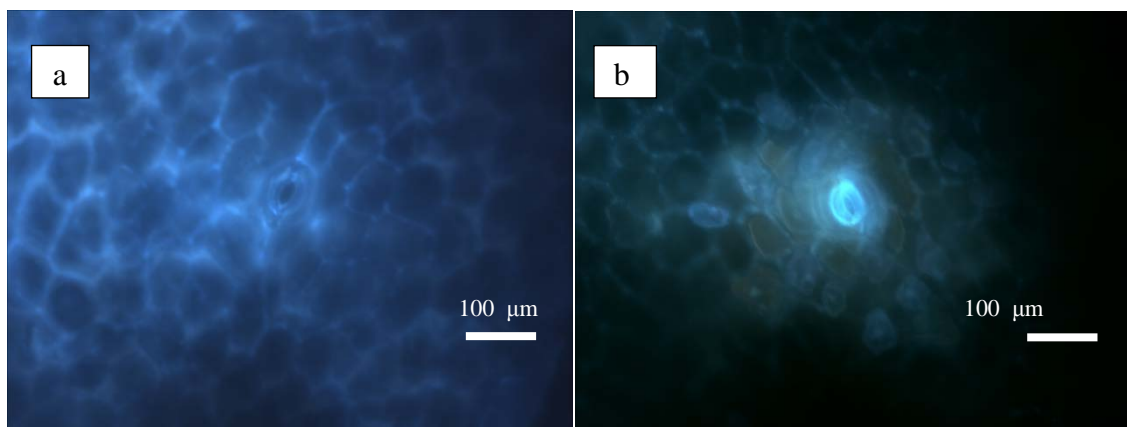


Figura 3. Microfotografía de estomas en frutos de cerezas a madurez de cosecha. a) Rainier, b) Regina

Permeabilidad

En los análisis de pérdida de vapor de agua de la cutícula se puede apreciar que en la variedad Regina se favorece la salida de agua desde los frutos, tal como se muestra en el Cuadro 4, corroborando estas diferencias entre las variedades con un p-valor $<0,0001$, ocurriendo de igual forma lo presentado en cutícula invertida que simula la salida de agua, con igual p-valor.

Cuadro 4. Tasa de pérdida de vapor de agua, ensayo de permeabilidad (promedios en base a 3 muestras).

| Extracción | Rainier | | Regina | |
|---|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | Normal mg h ⁻¹ | Invertida mg h ⁻¹ | Normal mg h ⁻¹ | Invertida mg h ⁻¹ |
| Control (T1) | 2,6 c | 8,3 bc | 2,3 c | 9,4 c |
| Química CHCl ₃ (T2) | 14,2 a | 8,5 bc | 15,2 a | 17,7 b |
| Química C ₆ H ₁₄ (T3) | 6,3 b | 10,6 b | 15,0 a | 25,3 a* |
| Mecánica (T4) | 7,1 b | 8,1 c | 5,5 c | 19,5 ab |
| Combinada CHCl ₃ (T5) | 12,0 a | 14,2 a | 10,7 b | 20,4 ab |
| Combinada C ₆ H ₁₄ (T6) | 7,5 b | 7,6 c | 5,0 c | 10,2 c |

Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para cada situación de cutícula en la variedad.

*Resultados más bajos en partidura *in vitro* para el estudio.

Los resultados obtenidos para el ensayo de permeabilidad difieren entre los tratamientos y entre las variedades (Apéndice I, Figuras 1 a 12). Al ser dos variedades distintas se presentan diferencias en la constitución de la epidermis, como la cantidad de estomas en el fruto y la cantidad de cera, siendo ésta una barrera para la entrada de agua que confiere diferente resistencia a las variedades (Webster y Cline, 1994). Además existen otros factores de la epidermis que contribuyen en la permeabilidad de las cutículas, como la cantidad de estomas, grosor de la cutícula, grosor de las células epidermales, número de células de la epidermis, grosor de la subepidermis, número de capas de células de subepidermis, (Demirsoy y Demirsoy, 2004), factores que además contribuyen a la partidura.

También se observa un aumento de la tasa de pérdida de vapor de agua los tratamientos en que se removió cera respecto al control, evidenciando que la remoción de la cera modifica la permeabilidad de la cutícula de los frutos, lo cual es consistente con lo que postulan Knoche *et al.* (2000a), ya que al extraer la cera de la epidermis se favorece la conducción de agua a través de la cutícula.

Asimismo la permeabilidad también se ve modificada al utilizar cloroformo, ya que estos pueden dañar la pared y la membrana celular, solubilizan, precipitan y desnaturalizan lípidos (Xian y Anderson, 1994), polisacáridos (Hussain *et al.*, 2008) y proteínas (Asakura *et al.*, 1978).

Partidura *in vitro*

En este ensayo, se pudo observar una interacción entre las variedades y los tratamientos de extracción de cera en la incidencia a partidura de los frutos estudiados, lo que demuestra que los factores involucrados en la partidura no actúan de forma independiente entre sí. Dado estos antecedentes se procedió a realizar un análisis de varianza para cada momento de observación comparando los tratamientos entre las variedades y como se comportaron ellos, lo cual puede apreciarse en los cuadros 5 y 6, que muestran los resultados a las 2 y 24 horas de montado el ensayo respectivamente. El resto de los tiempos 4, 6, 8, 10 y 12 horas pueden ser apreciados en el Apéndice II, Cuadros 1, 2, 3, 4 y 5 correspondientemente.

Además, se corroboró la alta susceptibilidad a partidura de la variedad Rainier, mientras que 'Regina' se expresó como variedad menos susceptible a este problema, tal como lo describen Carrasco y Aliaga (2011) (Figura 4 y Figura 5). Se pudo comparar ambas variedades a través de su comportamiento en los testigos sin remoción de cera, donde 'Rainier' el 85% de fruta partida se logró a las 4 horas y el 100% se alcanzó a las 10 horas (Figura 4), sin embargo en 'Regina' se alcanzó solo a las 24 horas el 85% de fruta partida (Figura 5).

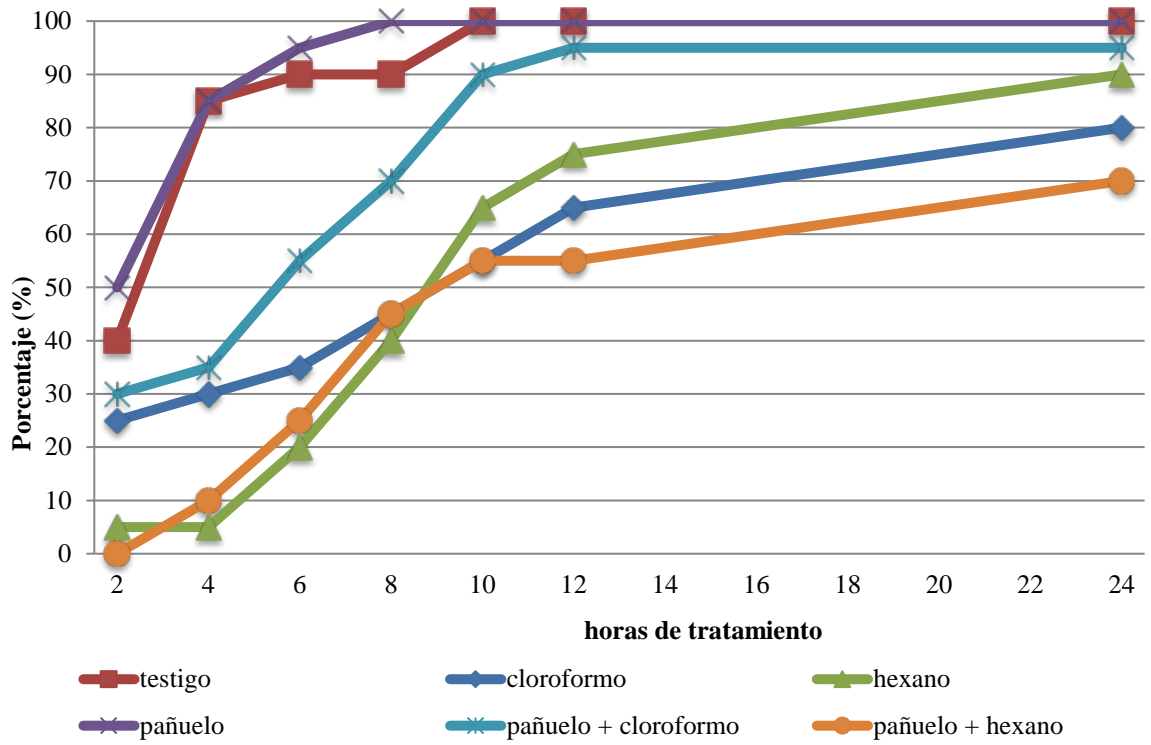


Figura 4. Porcentaje de partidura en 'Rainier' para los diferentes tratamientos de extracción de cera.

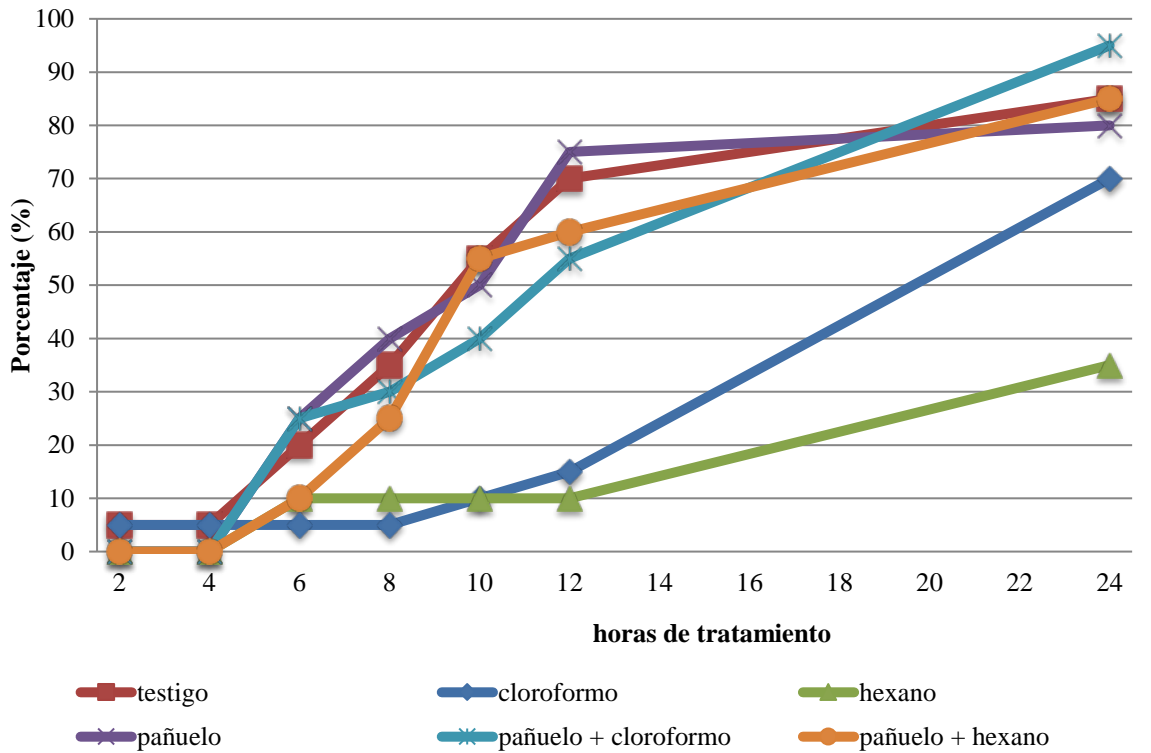


Figura 5. Porcentaje de partidura en 'Regina' para los diferentes tratamientos de extracción de cera.

Al cabo de dos horas de iniciado el ensayo de partidura *in vitro*, la variedad Rainier presentó diferencias significativas en los diferentes tratamientos de extracción de cera cuticular, mostrando fruta partida dado a su susceptibilidad varietal. En Regina se apreció fruta partida, pero esta no tuvo significancia entre los tratamientos de extracción de cera.

Cuadro 5. Resultados del ensayo de partidura *in vitro* al tiempo de 2 horas, expresados en porcentaje de fruta partida.

| Tratamientos de extracción de cera | Rainier (%) | Regina (%) |
|------------------------------------|-------------|------------------------|
| Testigo (T1) | 6 ± 22 a | 5 ± 22 ns ¹ |
| Químico con cloroformo (T2) | 8 ± 22 a | 5 ± 22 |
| Químico con n-Hexano (T3) | 10 ± 22 ab | 0 ± 0 |
| Mecánico con pañuelo (T4) | 12 ± 22 ab | 0 ± 0 |
| Mecánico más cloroformo (T5) | 14 ± 22 b | 0 ± 0 |
| Mecánico más n-Hexano (T6) | 16 ± 22 b | 0 ± 0 |

Letras diferentes en sentido vertical evidencian diferencias significativas ($p \leq 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

¹No hay significativas en los tratamientos para 'Regina' y entre variedades para los tratamientos.

Finalizado el ensayo, a las 24 horas, el tratamiento de extracción química de cera con hexano (T3) en la variedad Regina presentó mayor tolerancia a la partidura, llegando a un 35% de fruta partida, mientras que el tratamiento con menor partidura se observó en con el método de extracción química de cera con cloroformo (80%) y la extracción de cera mecánica más hexano (70%) en la variedad 'Rainier', tal como se aprecia en el Cuadro 6. Además en el mismo cuadro se puede apreciar que para los tratamientos de extracción de cera a través de n-Hexano (T3) y mecánico (T4), la variedad Regina mostró tener mejores resultados que Rainier. Sin embargo no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos de extracción de cera química con n-Hexano (T3) y extracción de cera mecánica (T4).

Cuadro 6. Resultados del ensayo de partidura *in vitro* al tiempo de 24 hrs, expresados en porcentaje de fruta partida.

| Tratamientos de extracción de cera | Rainier (%) | Regina (%) |
|------------------------------------|-------------------------|------------|
| Testigo (T1) | 100 ± 0 d | 85 ± 37 b |
| Químico con cloroformo (T2) | 80 ± 41 a | 70 ± 47 b |
| Químico con n-Hexano (T3) | 90 ± 31 bc ¹ | 35 ± 49 a |
| Mecánico con pañuelo (T4) | 100 ± 0 d ¹ | 80 ± 41 b |
| Mecánico más cloroformo (T5) | 95 ± 22 cd | 95 ± 22 c |
| Mecánico más n-Hexano (T6) | 70 ± 47 a | 85 ± 37 b |

Letras diferentes en sentido vertical evidencian diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

¹Evidencian diferencias significativas (5%) entre las variedades para un mismo tratamiento de extracción.

A partir de estos resultados no se logró demostrar que a menor cantidad de cera cuticular hay mayor o menor permeabilidad de cutícula que disminuiría la incidencia a partidura, aunque se pueden ver diferencias en el patrón de partidura en algunos tratamientos. No obstante, sí se puede estimar que 'Regina' tiene una mayor permeabilidad en la cutícula invertida, que simula la salida de agua del fruto (Cuadro 4). Por otra parte, se consiguió establecer una correlación negativa no significativa ($p \leq 0,05$) entre la variable partidura y permeabilidad, que relaciona la mayor permeabilidad con la disminución en la ocurrencia de partidura, con un coeficiente de correlación de Pearson de -0,26.

Asimismo es recomendable realizar una cuantificación de cera más precisa o determinar más específicamente la cantidad de alcanos de 29 carbonos presentes en la cera cuticular de las cerezas estudiadas y su respectiva remoción por los diferentes tratamientos de extracción, para verificar su relevancia en la permeabilidad de las cutículas, y así relacionar de mejor manera como estos alcanos modifican la permeabilidad y la incidencia a partidura.

Diferencia de masa

Dado la diferencia de peso durante todos los momentos observados (Apéndice III), se determinó que la ganancia de masa por entrada de agua necesaria para producir partidura en 'Rainier' es alrededor de un 4% ($\pm 2,7$), mientras que en 'Regina' 6,5% ($\pm 3,8$).

Por otra parte, se observó que la partidura se produce incluso con una pérdida de masa, en los tratamientos de extracción química de cera con cloroformo (T2) y hexano (T3) más la extracción mecánica con hexano (T6) en la variedad Rainier (Apéndice III Figuras 2, 3 y 6 respectivamente, comparados a las Figuras 1, 4 y 5 del mismo Apéndice). De esta manera, una reducción de la cantidad de cera en la cutícula de estos frutos altera su permeabilidad, favoreciendo la salida de agua desde el fruto al medio en que estaban sumergidos. En este sentido se postula que existe un cambio desde un flujo de potencial osmótico, fenómeno que produce la partidura de frutos de cereza (Sawada, 1931; Verner y Blodgett, 1931; Christensen, 1976; Balbontin *et al.*, 2013) a un flujo por difusión, que igualmente produce partidura. No obstante Knoche *et al.*, 2000b, afirmaron que el flujo de agua a través de la membrana cuticular de la fruta de cerezas, es a través de difusión.

Además, se encontró una correlación positiva, pero no significativa ($p \leq 0,05$) entre la ganancia de masa y la ocurrencia de partidura, obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson de 0,36, por lo que en este caso, la partidura se ve explicada en un 36% por la ganancia de masa a través de la entrada de agua, lo que ratifica en sí que hay varios procesos involucrados en la partidura de fruta de cerezas.

Para estos resultados no se desestima el rol que tiene el agua en la partidura de frutas de cereza, ya que es el principal factor que lo produce (Sekse, 1998), sin embargo no se pueden pasar por alto otros factores que están involucrados en la partidura como el tamaño de la fruta, la cantidad de sólidos solubles (Tucker, 1934; Christensen, 1975) y

firmeza de la pulpa (Christiensen, 1996), componentes cuticulares como cantidad de estomas, grosor de la cutícula, grosor de las células epidermales, número de células de la epidermis, grosor de la subepidermis, número de capas de células de subepidermis (Demirsoy y Demirsoy, 2004), además se pueden estudiar y buscar otras características que otorgan tolerancia o susceptibilidad a la partidura (Peschel y Knoche, 2012) para así descubrir todos los factores involucrados en este fenómeno.

CONCLUSIONES

La remoción de cera cuticular altera su permeabilidad modificando el flujo de entrada y salida de agua a los frutos, provocando cambios en el patrón de partidura.

Los factores involucrados en el proceso de partidura no actúan de forma independiente.

La partidura de frutos en la variedad Rainier se produce con un 4% de ganancia de masa por entrada de agua, mientras que para 'Regina' con un 6,5%.

La variedad Rainier con los tratamientos de extracción de cera química con hexano (T3) y cloroformo (T2) junto con la extracción de cera mecánica con hexano (T6), sufrieron una modificación en el flujo de agua, pasando desde un potencial osmótico a uno por difusión.

La salida de agua desde los frutos produce igualmente partidura.

BIBLIOGRAFÍA

- Baéz-Sañudo, R.; F, Tadeo; E, Primo-Millo and L. Zacarias. 1993. Physiological and ultrastructural changes during the ripening and senescence of clementine mandarin. *Acta Horticulturae*. 343:18-24.
- Balbontín, C.; H. Ayala; R. Bastías; G. Tapia; M. Ellena; C. Torres, *et. al.* 2013. Cracking in sweet cherries: A comprehensive review from a physiological, molecular, and genomic perspective. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 73(1): 66-72.
- Bargioni, G. 1996. Sweet Cherry Scions: characteristics of the principal commercial cultivars, breeding objectives and methods. *In: Webster A. and N. Looney (Eds).* Cherries: Crop Physiology, Production and Uses. Cab International. 73-112.
- Beyer, M. and Knoche, M. 2002. Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface. V. Conductance for water uptake. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 27:325–332.
- Bravo, J. 2012, mayo. Mercado de la Cereza. Mercados agropecuarios (Inf. n° 238). Oficina de estudios y políticas agrarias, Ministerio de Agricultura (ODEPA). Santiago, Chile: ODEPA. 19p.
- Carrasco, O y O. Aliaga. 2011. Sistemas de producción en cerezos. Análisis de variedades y desafíos de la industria. *In: Seminario Cerezas Curicó.* Asociación de exportadores de Chile (ASOEX). 61p.
- Christensen, J. 1972a. Cracking in cherries. IV. Physiological studies of the mechanism of cracking. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 22, 153–162.
- Christensen, J. 1972b. Cracking in cherries III. Determination of cracking susceptibility. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 22: 153-162.
- Christensen, J. 1975. Cracking in cherries VII. Cracking susceptibility in relation to fruit size and firmness. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 25:301-312.
- Christensen, J. 1976. Cracking in cherries. *Danish Journal of Plant and Soil Science*. 80: 290-324.
- Christensen, J. 1996. Rain-induced fruit cracking of sweet cherries: Its causes and prevention. *En: Webster A. and N. Looney (Eds).* Cherries: Crop Physiology, Production and Uses. Cab International. 297-327p.
- Combe, J. 1976. The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology*. 27, 507-528.
- Demirsoy L. and H. Demirsoy. 2004. The epidermal characteristics of fruit skin of some

sweet cherry cultivars in relation to fruit cracking. *Pakistan Journal of Botany*. 36(4): 725-73.

Ellena, M.; A. Aguilera; S. Ferrada; A. Montenegro; J. Guerrero, y A. Rombolá. 2006. Cultivo del Cerezo para la Zona Sur de Chile. Temuco, Chile. Boletín INIA n° 135. 195p.

Hussain, K.; Z. Ismail; A. Sadikun and P. Ibrahim. 2008. Analysis of proteins, polysaccharides, glycosaponins contents of *Piper sarmentosum* Roxb. and anti-TB evaluation for bio-enhancing/interaction effects of leaf extracts with Isoniazid (INH). *Natural Product Radiance*. 7(5): 402-408.

Jeffree, C. 1996. Structure and ontogeny of plants cuticles. In: Kerstiens. G. (Ed.), Plant Cuticles. BIOS Scientific Publishers. 33-82.

Johan, S.; V. Lopes de Oliveira; M. Pizzolatti; J. Schripsema; R. Braz-Filho; A. Branco, et. al. 2007. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 102(6): 681-686.

Joublan, J. 2004. Partidura en cereza (cap. 4, pp. 61-70). En: *Joublan, J. y J. Claverie (Ed.)*. El cerezo: guía técnica. Chillán, Chile: Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía; Fundación para la Innovación Agraria (FIA). 336p.

Knoche, M.; S. Peschel; M. Hinz and M. Bukovac. 2000a. Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: II. Conductance of the cuticle in relation to fruit development. *Planta*. 213: 927-936.

Knoche, M.; S. Peschel; M. Hinz and M. Bukovac. 2000b. Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: Characterizing conductance of the cuticular membrane using pericarp segments. *Planta*. 212: 127-135.

Knoche, M and S. Peschel. 2002. Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: VI. Effect of hydrostatic pressure on water uptake. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 77:609-614.

Kunst, L. and A. Samuels. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*. 42: 51-80.

Martin, J. and B. Juniper. 1970. The Cuticle of Plants. London, England. Edward Arnold. 347p.

Mayes, R.; C. Lambs and P. Colgrove. 1986. The use of dosed and herbage *n*-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *Journal of Agricultural Science*. 107: 161-170.

Navarrete, J.; R. Jorquera; R. Soto; C. Rojas; A. Astorga y E. Guerra. 2010. Cerezas. [En línea] Centro de Competitividad del Maule. Talca, Chile. 29p. Recuperado en: <<http://www.centrodecompetitividaddelmaule.cl/files/Cereza.pdf>>

Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). [En línea]. Santiago, Chile. Frutales: superficie y producción. ODEPA. Recuperado en <<http://www.odepa.cl/articulos/MostrarDetalle.action?idcla=12&idcat=2&idn=1737>> Consultado el: 24 de enero del año 2013.

Peschel, S.; M. Beyer and M. Knoche. 2003. Surface characteristics of sweet cherry fruit: stomata-number, distribution, functionality and surface wetting. *Scientia Horticulturae*. 97:265–278.

Peschel, S.; R.Franke; L. Schreiber and M. Knoche. 2007. Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit. *Phytochemistry*. 68: 1017–1025.

Peschel, S. and M. Knoche. 2012. Studies on Water Transport through the Sweet Cherry Fruit Surface: XII. Variation in Cuticle Properties among Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 137(6):367–375.

Post-Beittenmiller, D. 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology*. 47: 405-430.

Riederer, J and M. Schönherr. 1995. Waxes—the transport barriers of plant cuticles. In: *Hamilton R. J., (ed.) Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. The Oily Press. 131-156p.

Ruzin, S. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press. New York, United States of America. 322p.

Sawada, E. 1931. Studies on the cracking of cherries. *Agriculture and Horticulture*. 6: 864-892.

Schönherr, J and M. Riederer. 1986. Plant cuticle sorb lipophylic compounds during enzymatic isolation. *Plant Cell Environ*. 9: 459-466.

Sekse, L. 1998. Fruit cracking mechanism in sweet cherries (*Prunus avium* L.) – A review. *Acta Horticulturae*. 468: 637-648.

Simon, G. 2003. The plantation in the rain and the birds caused by the damage. In: *Hrotkó, K. (ed.) Cseresnyeésmeggy*. MezôgazdaKiadó, Budapest. 338–348p.

Simon G. 2006. Review on rain induced fruit cracking of sweet cherries (*Prunus avium* L.), its causes and the possibilities of prevention. *International Journal of Horticultural Science*. 12 (3): 27–35.

Asakura, T.; K. Adashi and E. Schwartz. 1978. Stabilizing Effect of Various Organic Solvents on Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 253: 6423-6425.

Tucker, R. 1934. A varietal study of the susceptibility of sweet cherries to cracking. *University of Idaho Agriculture Experimental Station Bulletin*. 211: 1-15.

Valenzuela, L. 2007. Partidura en cereza: Causas y Prevención. *Revista Frutícola*, Copefrut. Santiago, Chile. 28(2): 54-64.

Verner, L. and E. Blodgett. 1931. Physiological studies of the cracking of sweet cherries. University of Idaho Agriculture Experimental Station Bulletin. 184: 1-15.

Webster, A. and J. Cline. 1994. Cherries-cracking the problem. *Grower*. 121(22): 14-15.

Xiang, T and B. Anderson. 1994. The relationship between permeant size and permeability in lipid bilayer membranes. *The Journal of Membrane Biology*. 140: 111-22.

Yuri, J.; A. Neira; O. Hernández; M. Fuentes; J. González y C. Torres. 2010. Partiduras en cerezas. Informativo Centro de Pomáceas, Universidad de Talca. Talca, Chile. 4p.

APÉNDICE

Apéndice I. Curvas de permeabilidad de cutículas.

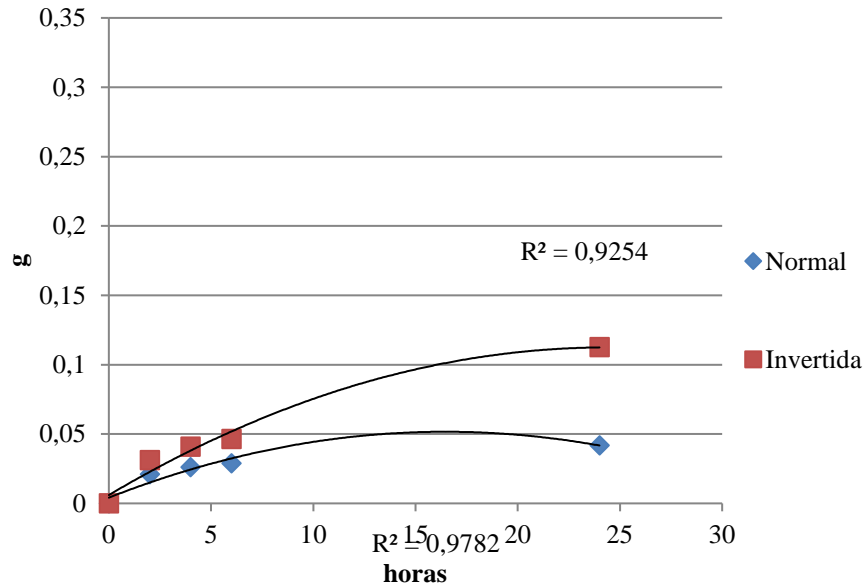


Figura 1. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Rainier bajo la condición testigo.

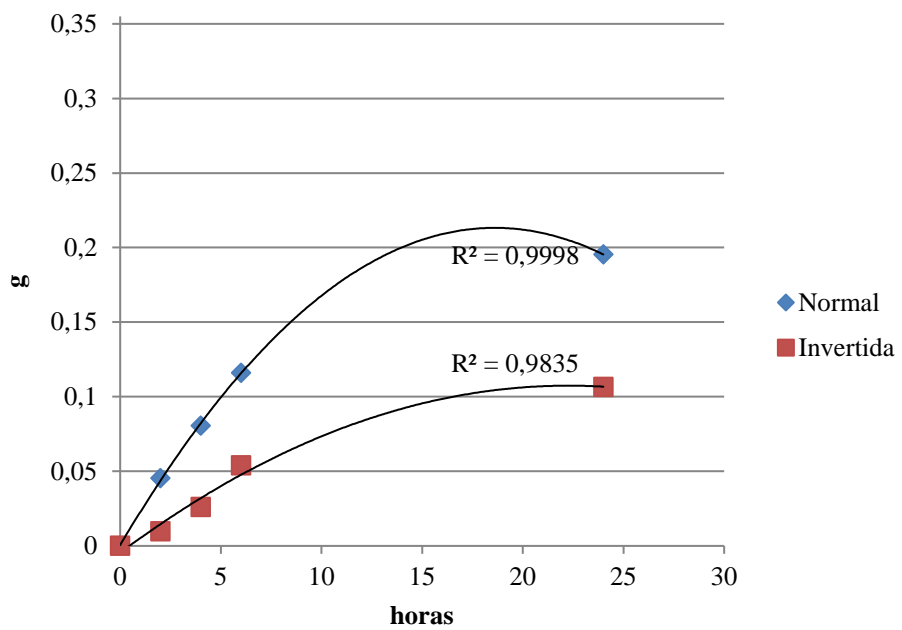


Figura 2. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Rainier, bajo la condición de extracción química de cera con cloroformo.

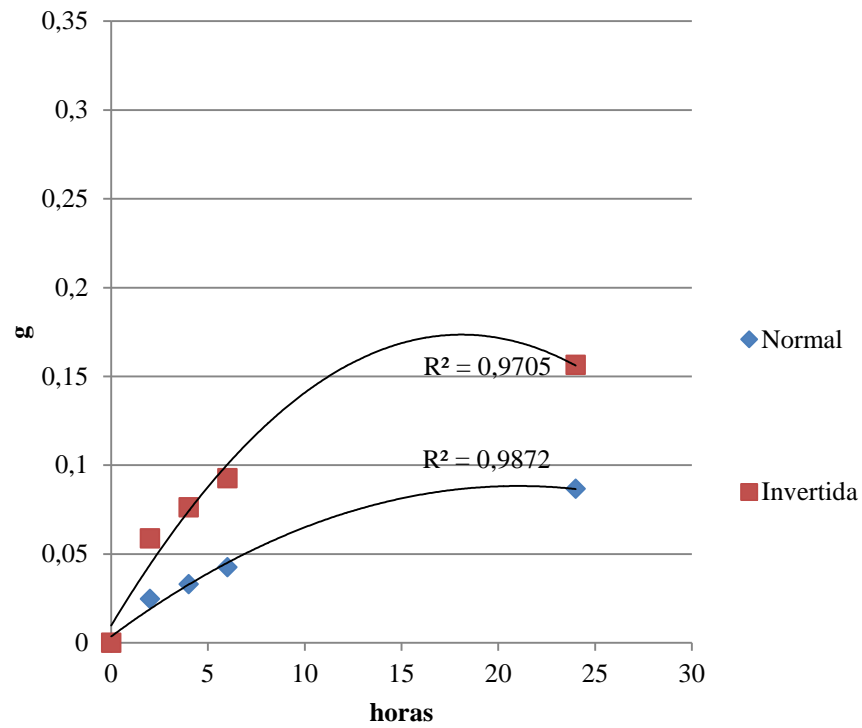


Figura 3. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Rainier, bajo la condición de extracción química de cera con hexano.

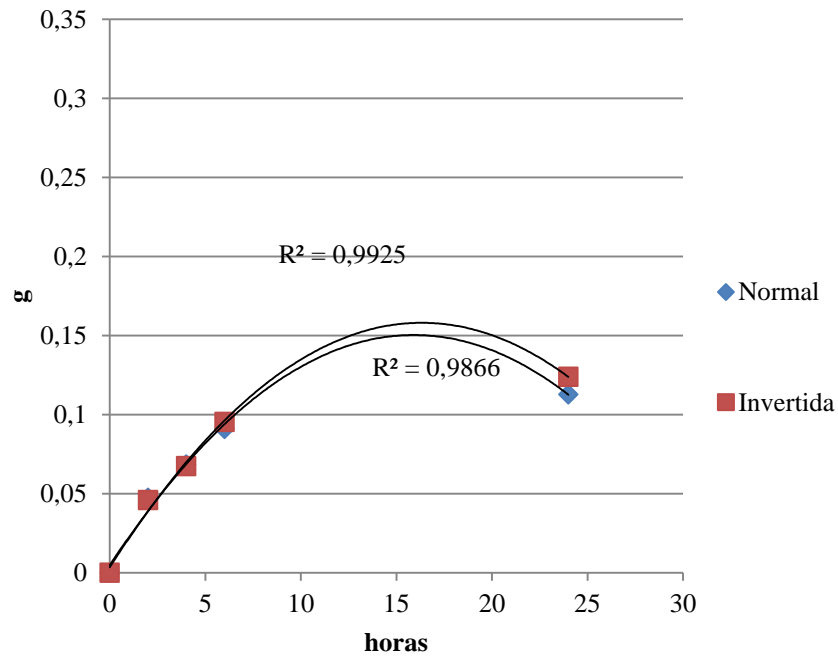


Figura 4. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Rainier, bajo la condición de extracción mecánica de cera con pañuelo.

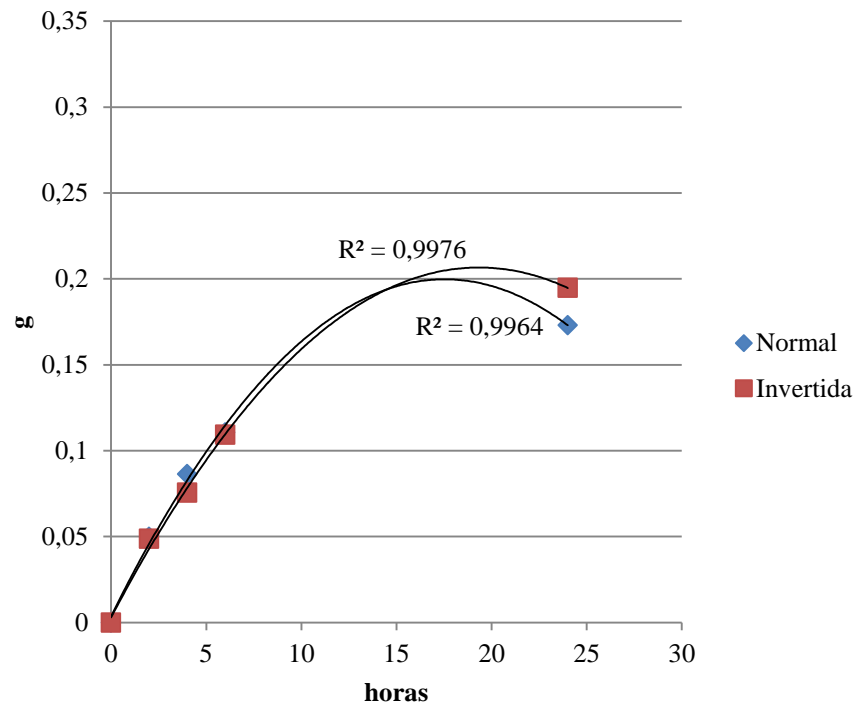


Figura 5. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Rainier, bajo la condición de extracción mecánica combinada con cloroformo.

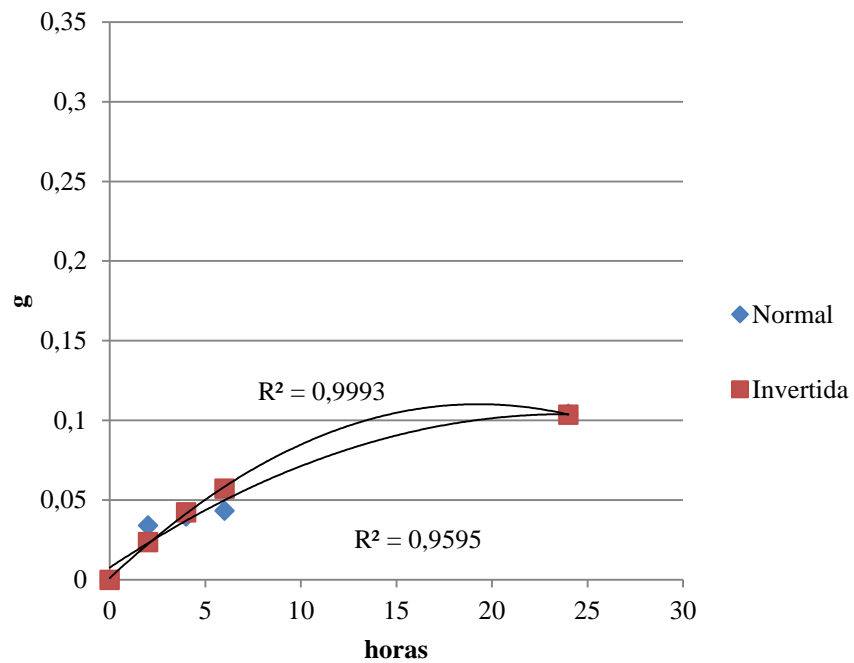


Figura 6. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Rainier, bajo la condición de extracción mecánica combinada con hexano.

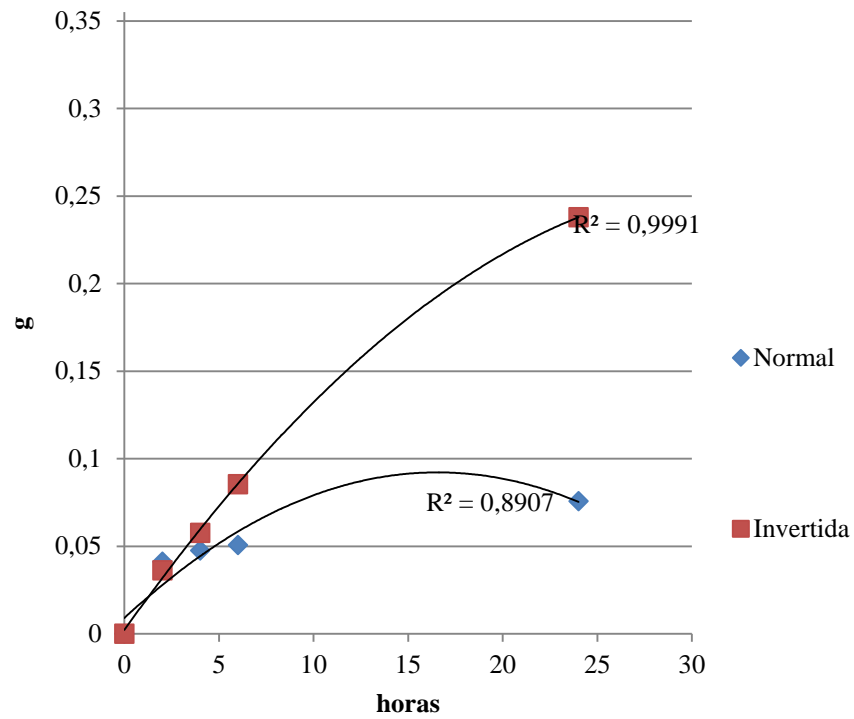


Figura 7. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Regina, bajo la condición testigo.

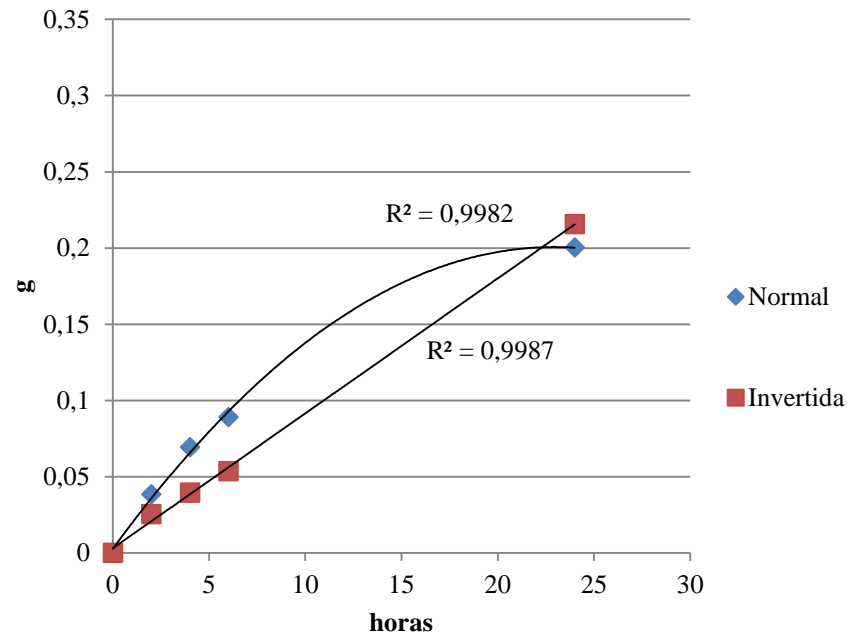


Figura 8. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Regina, bajo la condición de extracción química de cera con cloroformo.

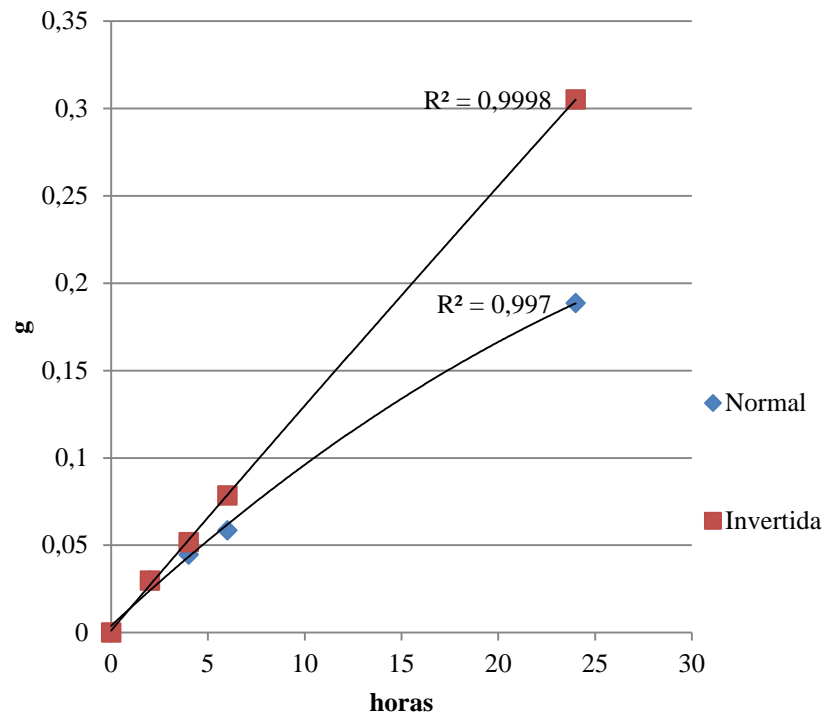


Figura 9. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Regina, bajo la condición de extracción química de cera con hexano.

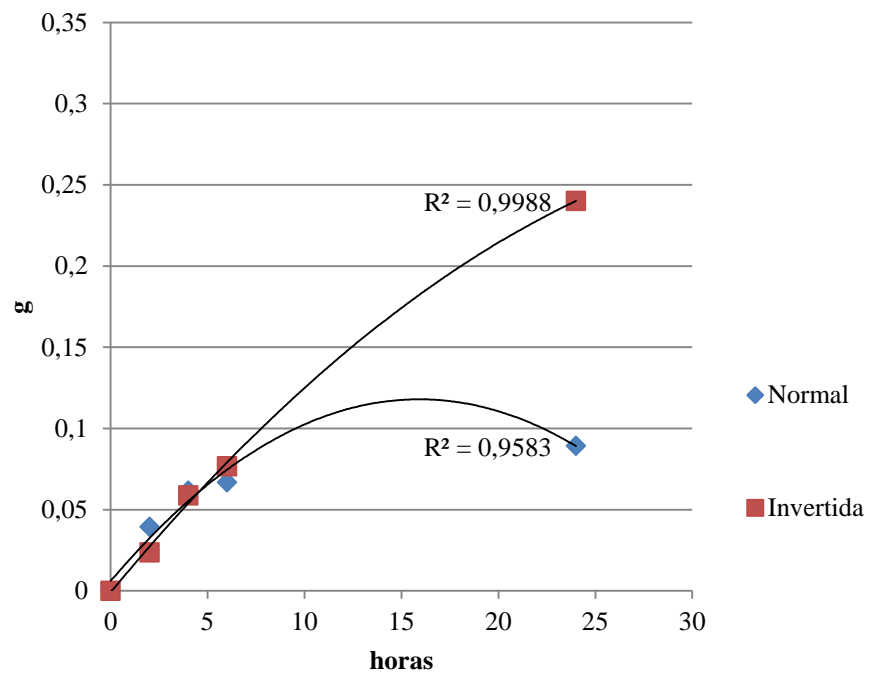


Figura 10. Curva de comportamiento de permeabilidad variedad Regina, bajo la condición de extracción mecánica de cera con pañuelo.

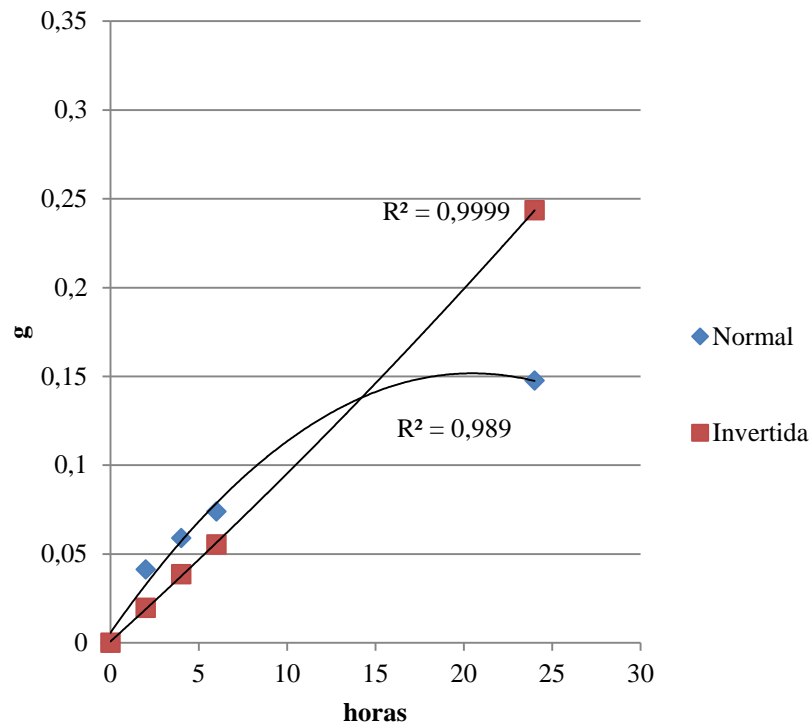


Figura 11. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Regina, bajo la condición de extracción de cera mecánica combinada con cloroformo.

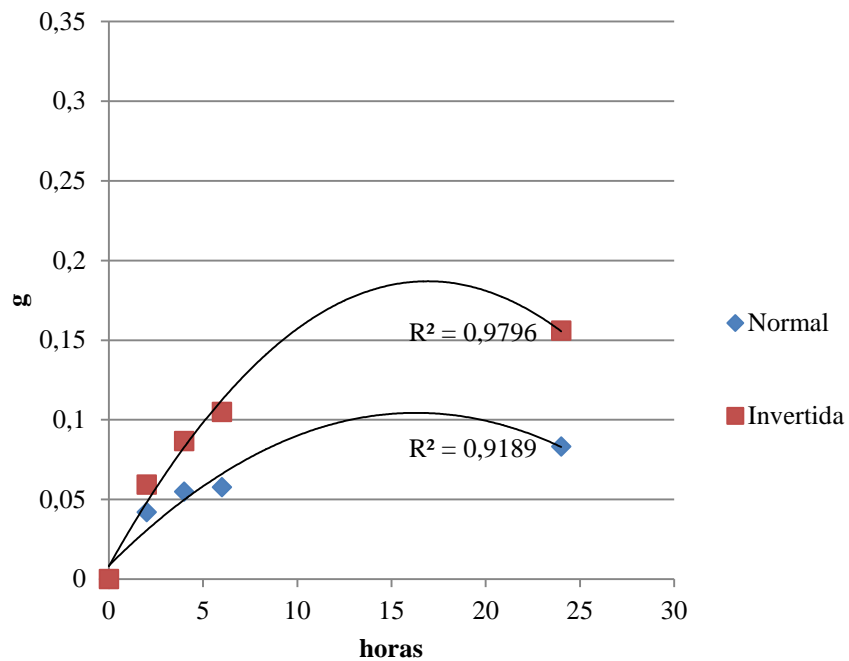


Figura 12. Curva de comportamiento de permeabilidad para la variedad Regina, bajo la condición de extracción de cera mecánica combinada con hexano.

Apéndice II. Resultados del ensayo partidura *in vitro* en el tiempo

Cuadro 1. Resultados del ensayo de partidura *in vitro* para las variedades Rainier y Regina a las 4 horas, expresados en porcentaje de fruta partida.

| Tratamientos de extracción de cera | Rainier (%) | Regina ¹ (%) |
|------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Testigo (T1) | 85 ± 37 c ¹ | 5 ± 22 ns ² |
| Químico con cloroformo (T2) | 30 ± 47 b ¹ | 5 ± 22 |
| Químico con n-Hexano (T3) | 5 ± 22 a | 0 ± 0 |
| Mecánico con pañuelo (T4) | 85 ± 37 c ¹ | 0 ± 0 |
| Mecánico más cloroformo (T5) | 35 ± 49 b ¹ | 0 ± 0 |
| Mecánico más n-Hexano (T6) | 10 ± 31 a | 0 ± 0 |

Letras diferentes evidencian diferencias significativas ($p \leq 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

¹Evidencian diferencias significativas (5%) entre las variedades para un mismo tratamiento de extracción.

²No evidenciaron diferencias significativas en los tratamientos para 'Regina'.

Cuadro 2. Resultados del ensayo de partidura *in vitro* para las variedades Rainier y Regina a las 6 horas, expresados en porcentaje de fruta partida.

| Tratamientos de extracción de cera | Rainier (%) | Regina (%) |
|------------------------------------|------------------------|---------------|
| Testigo (T1) | 90 ± 31 d ¹ | 20 ± 41 b |
| Químico con cloroformo (T2) | 35 ± 49 b ¹ | 5 ± 22 a |
| Químico con n-Hexano (T3) | 20 ± 41 a | 10 ± 31 a |
| Mecánico con pañuelo (T4) | 95 ± 22 d ¹ | 25 ± 44 b |
| Mecánico más cloroformo (T5) | 55 ± 51 c ¹ | 25 ± 44 b |
| Mecánico más n-Hexano (T6) | 25 ± 44 a | 10 ± 31 a |

Letras diferentes en sentido vertical evidencian diferencias significativas ($p \leq 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

¹Evidencian diferencias significativas (5%) entre las variedades para un mismo tratamiento de extracción.

Cuadro 3. Resultados del ensayo de partidura *in vitro* para las variedades Rainier y Regina a las 8 horas, expresados en porcentaje de fruta partida.

| Tratamientos de extracción de cera | Rainier ¹ (%) | Regina (%) |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| Testigo (T1) | 90 + 31 c | 35 ± 48 cd |
| Químico con cloroformo (T2) | 45 ± 51 a | 5 + 22 a |
| Químico con n-Hexano (T3) | 40 ± 50 a | 10 ± 31 a |
| Mecánico con pañuelo (T4) | 100 ± 0 d | 40 ± 50 d |
| Mecánico más cloroformo (T5) | 70 ± 47 b | 30 ± 47 bc |
| Mecánico más n-Hexano (T6) | 45 ± 51 a | 25 ± 44 b |

Letras diferentes en sentido vertical evidencian diferencias significativas ($p \leq 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

¹Representa a la variedad con mayor diferencia significativa en todos los tratamientos.

Cuadro 4. Resultados del ensayo de partidura *in vitro* para las variedades Rainier y Regina a las 10 horas, expresados en porcentaje de fruta partida.

| Tratamientos de extracción de cera | Rainier (%) | Regina (%) |
|------------------------------------|------------------------|---------------|
| Testigo (T1) | 100 ± 0 d ¹ | 55 ± 51 c |
| Químico con cloroformo (T2) | 55 ± 51 a ¹ | 10 ± 31 a |
| Químico con n-Hexano (T3) | 65 ± 49 b ¹ | 10 ± 31 a |
| Mecánico con pañuelo (T4) | 100 ± 0 d ¹ | 50 ± 51 c |
| Mecánico más cloroformo (T5) | 90 + 31 c ¹ | 40 ± 50 b |
| Mecánico más n-Hexano (T6) | 55 ± 51 a | 55 ± 51 c |

Letras diferentes en sentido vertical evidencian diferencias significativas ($p \leq 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

¹Evidencian diferencias significativas (5%) entre las variedades para un mismo tratamiento de extracción.

Cuadro 5. Resultados del ensayo de partidura *in vitro* para las variedades Rainier y Regina a las 12 horas, expresados en porcentaje de fruta partida.

| Tratamientos de extracción de cera | Rainier (%) | Regina (%) |
|------------------------------------|------------------------|---------------|
| Testigo (T1) | 100 ± 0 d ¹ | 70 ± 47 c |
| Químico con cloroformo (T2) | 65 ± 49 b ¹ | 15 ± 37 a |
| Químico con n-Hexano (T3) | 75 ± 44 c ¹ | 10 ± 31 a |
| Mecánico con pañuelo (T4) | 100 ± 0 d ¹ | 75 ± 44 c |
| Mecánico más cloroformo (T5) | 95 ± 22 d ¹ | 55 ± 51 b |
| Mecánico más n-Hexano (T6) | 55 ± 51 a | 60 ± 50 b |

Letras diferentes en sentido vertical evidencian diferencias significativas ($p \leq 0,05$), test de Kruskal-Wallis.

¹Evidencian diferencias significativas (5%) entre las variedades para un mismo tratamiento de extracción.

Apéndice III. Variación de peso en ensayo de partidura *in vitro*.

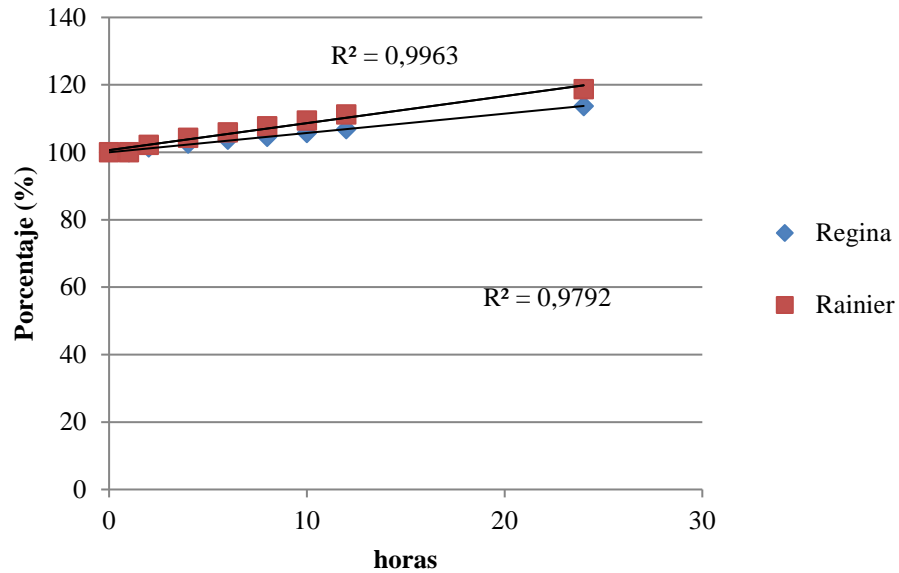


Figura 1. Variación de peso en ensayo de partidura *in vitro* en tratamiento testigo para las variedades Regina y Rainier.

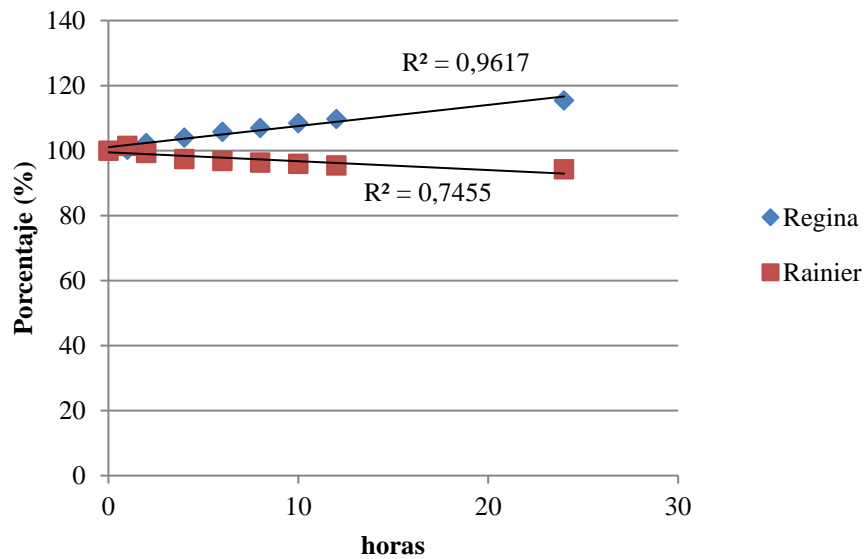


Figura 2. Variación de peso en ensayo de partidura *in vitro* en tratamiento de extracción de cera química con cloroformo para las variedades Regina y Rainier.

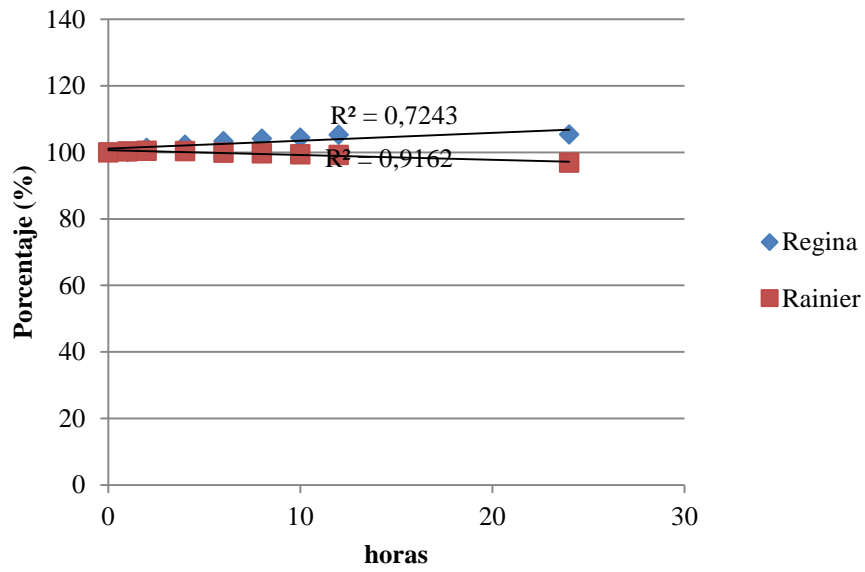


Figura 3. Variación de peso en ensayo de partidura *in vitro* en tratamiento de extracción de cera química con hexano para las variedades Regina y Rainier.

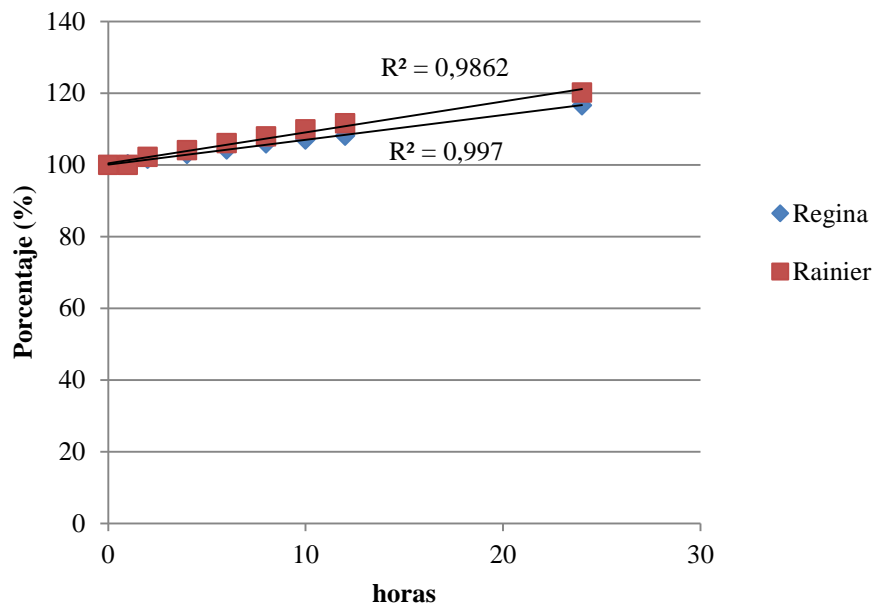


Figura 4. Variación de peso en ensayo de partidura *in vitro* en tratamiento de extracción de cera mecánico con pañuelo para las variedades Regina y Rainier.

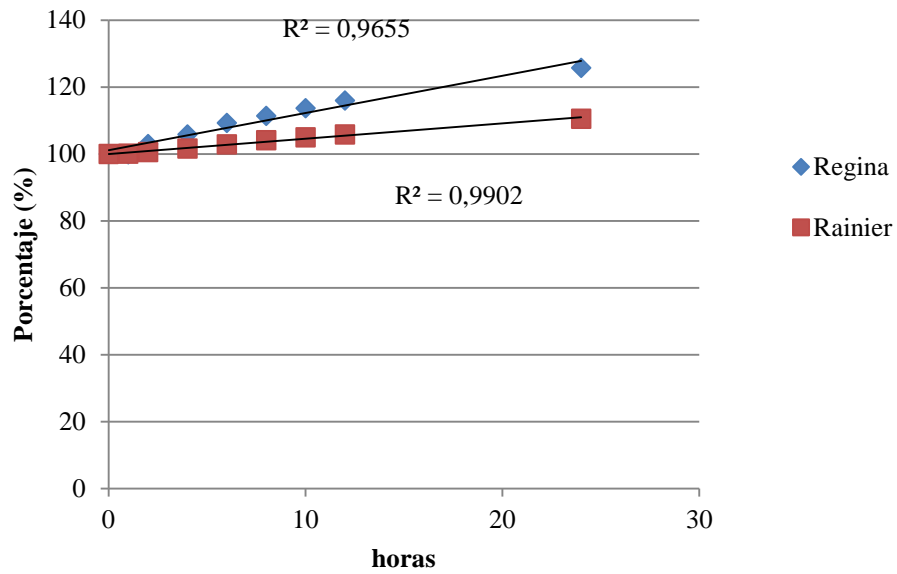


Figura 5. Variación de peso en ensayo de partidura *in vitro* en tratamiento de extracción de cera mecánico combinado con cloroformo para las variedades Regina y Rainier.

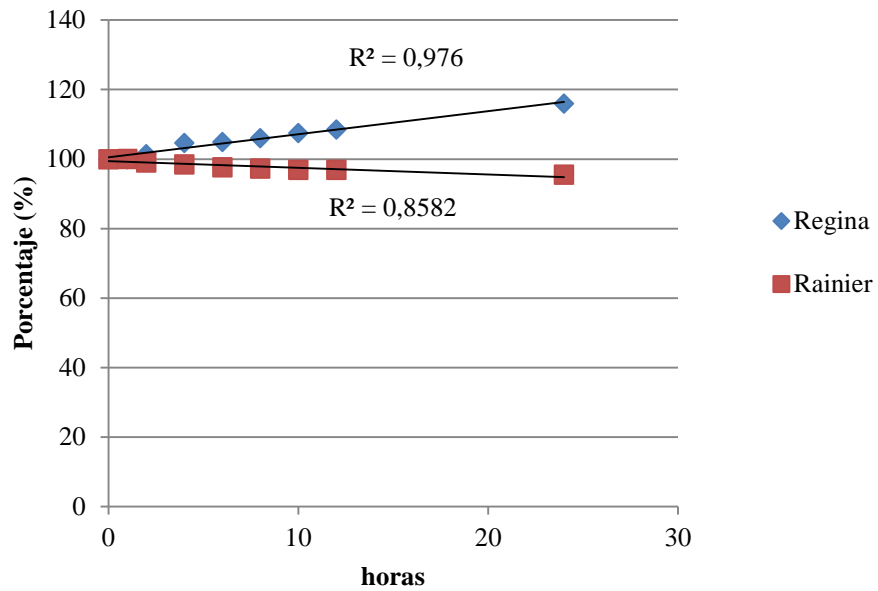


Figura 6. Variación de peso en ensayo de partidura *in vitro* en tratamiento de extracción de cera mecánico combinado con hexano para las variedades Regina y Rainier.