



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

Análisis de la senescencia postcosecha de brócoli - Efecto de la aplicación de tratamientos físicos

Tesis Doctoral – Febrero 2005

Lorenza Costa

Bioquímica
(lorenzacosta@quimica.unlp.edu.ar)

*TESIS
Nº 1061*

Directora: Dra.
Alicia R. Chaves

Co-director: Dr.
Gustavo A. Martínez



Lugar de trabajo: Centro de Investigación y
Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Fac.
Cs. Exactas, UNLP

DONACION.....
Fecha 07-04-05
Inv. N. Inv. 57587



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

TESIS
N.º 1061

Dedico este trabajo a dos personas
que son mis referentes en todos los aspectos de la vida,
porque siempre me mostraron absoluta coherencia entre
lo que sienten, lo que piensan y lo que hacen:

Santiago Chiusano (mi esposo) y Enrique Costa (mi padre)

DONACION.....
▲.....
Fecha 07-04-05
Inv. #..... Inv. # 57387

Mi más sincero agradecimiento a aquellas personas que me acompañaron durante la realización de este trabajo:

- ▶ A mi directora, Dra. Alicia Chaves, por permitirme realizar este trabajo brindándome su apoyo y confianza. Por permitirnos trabajar con responsabilidad y libertad. Por todas las orientaciones y apoyo que he recibido para concretar la tesis y para realizar trabajos, cursos, participación en congresos, eventos científicos y otras actividades que han ayudado a mi formación académica.
- ▶ A mi codirector Dr. Gustavo Martínez, porque me ayudó en todo momento para avanzar en mi trabajo, por la confianza que me otorgó para desenvolverme y por transmitirme su experiencia la que fue muy útil para mi trabajo.
- ▶ Al Dr. Marcos Civello, por confiar en mi capacidad y por valorar mi responsabilidad para el trabajo, lo que ha sido de gran ayuda en mi formación personal.
- ▶ A la UNLP, por permitirme realizar mi formación académica tanto de grado como de postgrado, por otorgarme las distintas becas con las que pude realizar la tesis.
- ▶ Al señor Ramiro Paulino, quien me proporcionó las muestras necesarias para realizar las investigaciones, por el buen trato y la buena predisposición con que siempre me recibió.
- ▶ A quienes fueron las autoridades del CIDCA durante los años en los que he realizado la tesis, Dra. Noemí Zaritzky, Dr. Rodolfo Mascheroni y Dra. Cristina Añón, por cuidar y mantener el Instituto en el que se han realizado y se seguirán realizando muchas tesis.
- ▶ A mis profesores en la carrera de Bioquímica, Dra. Cristina Añón y Dr. Antonio Lagares, quienes desde su función como docentes despertaron en mi el interés por dedicarme a la investigación.

- ▶ A mi amigo Ariel Vicente, por la infinita y muy generosa ayuda que he recibido durante las incontables horas de trabajo juntos, pero fundamentalmente le agradezco su particular entusiasmo por el trabajo que inevitablemente contagia.
- ▶ A mi amiga Analía Concellón, porque siempre estuvo presente, para brindarme desinteresadamente su experiencia, o para escucharme: festejó mis éxitos y compartió broncas y fracasos, y porque aunque no lo crea, todos sus “detalles” fueron de gran ayuda en este trabajo.
- ▶ A Sonia y a Mercedes, por las horas de trabajo compartidas entre mates y charlas, por su cariño y amistad.
- ▶ A todos los integrantes del grupo Vegetales, por permitirme trabajar en un ambiente de compañerismo, tranquilo y solidario.
- ▶ A Néstor y Mario, por su gran sentido del humor, porque siempre lograron cambiarme el ánimo por más triste o complicado que parezca el día, por el cariño con que siempre me trataron.
- ▶ A Alejandrita, Lili, Isa, Paula y Manuel, por todos los momentos en los que, mientras fuimos compartiendo mates, risas, salidas, confidencias (y también reactivos y equipos) fue creciendo nuestra amistad.
- ▶ A mi amiga Anita, y a Exequiel y Jerónimo quienes, mientras estuvieron presentes en el laboratorio, hicieron de él un lugar muy divertido en el que las horas de trabajo pasaban rápido entre bromas y risas.
- ▶ A las Dras. Silvana Petruceli y Alejandra García, porque siempre estuvieron dispuestas a ayudarme cuando he necesitado de su valiosa experiencia, y por sus numerosos consejos, los que pocas veces fueron dados como tales, sino que en su mayoría los he tomado del ejemplo que me dan a través de la manera humilde y perseverante con que trabajan todos los días.

- ▶ A todos los chicos de los laboratorios de Micro, Quesos, Proteínas, Aceites, los “chicos de Rody”, y Paula C., porque siempre me trataron muy bien cuando les he pedido reactivos, materiales o equipos prestados, para realizar los trabajos.
- ▶ Al Dr. Rodolfo Mascheroni, porque siempre me dio generosamente un lugar donde guardar las muestras y porque nos acompañó cuando en algunas ocasiones nos hemos quedado trabajando hasta el límite de desafiar la alarma
- ▶ A las conocidas como “chicas de recepción” (Natalia, Diana, Liliana, Ana Laura y Sara) quienes muchas veces agilizan nuestro trabajo.
- ▶ A todos mis compañeros del CIDCA, quienes me han ayudado en las distintas situaciones que se fueron presentando a lo largo de estos años.
- ▶ A mis compañeros de la cátedra de Análisis Químico de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, por los momentos compartidos: trabajo, festejos, mates y charlas. Por nuestro invaluable postpráctico, casi una terapia de grupo.....
- ▶ A las profesoras Hilda Castagnasso y Elisa Micelli, porque siempre acompañaron y respetaron mi trabajo, por la generosidad con que nos ayudan a progresar brindándonos todas las posibilidades de crecimiento y formación.
- ▶ A mis amigas incondicionales, Victoria Castuma, Yanina De Battista y Alicia Gómez, por su cariño y alegría cada vez que nos encontramos y principalmente porque siempre comprendieron y perdonaron mis ausencias !!
- ▶ A todos mis hermanos, cuñados y sobrinos, por su cariño y por todas las cosas que compartimos y que me mantienen en contacto con otra forma de vida, y en especial a mi hermana Alejandra por el cariño con que cuida a mis papás, lo que es para mí muy importante.

- ▶ A mis padres porque me dieron la posibilidad de estudiar y porque me enseñaron a vivir libremente y manejarme con respeto y responsabilidad, por su cariño, por su ejemplo.

- ▶ A Santiago, porque su amor me ayuda en todo momento, porque me contiene y me da felicidad, porque valora todo lo que hago, porque él me inculcó que las cosas que más nos enriquecen y se disfrutan en la vida son aquellas que logramos con esfuerzo y voluntad.

Durante el desarrollo del presente trabajo de tesis se realizaron las siguientes publicaciones y presentaciones en Congresos/Jornadas:

1- "Effect of ethephon and benzyl amino purine on chlorophyll degrading enzymes during postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.)"

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Postharvest Biol. and Technology, 2004, Vol. 35 (2), pg. 191-1999. Editorial ELSEVIER, Amsterdam, Holanda. ISSN:0925-5214.

2- "Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*Brassica oleracea* L. Var *italica*) heads."

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, en prensa. Editorial Wiley, SCI (Society of Chemical Industry), Oxford. ISSN: 0022-5142.

3- "UV-C treatments as a way of delaying postharvest senescence in broccoli florets."

Autores: Costa Lorenza, Vicente Ariel, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Postharvest Biol. and Technology, 2004, en revisión. Editorial ELSEVIER, Amsterdam, Holanda. ISSN:0925-5214.

4- "Effect of hot air treatment on chlorophyll catabolism during postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20° C."

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, en prensa. Editorial Wiley, SCI (Society of Chemical Industry), Oxford. ISSN: 0022-5142.

5- "Characterization of Mg-dechelatase activity obtained from *Fragaria* X *ananassa* fruit."

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Plant Physiol. Biochem., 2002, 40, pg. 111-118. Editorial ELSEVIER, París, Francia. ISSN: 0981-9428.

6- "Los tratamientos con luz UV-C retrasan la senescencia postcosecha de brócoli."

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

XXVII Congreso Argentino de Horticultura, Merlo (San Luis), Septiembre 2004.

Publicación de resumen y trabajo completo. Presentación oral.

Este trabajo recibió el **"Premio al mejor trabajo en la rama Horticultura"**

7- "Efecto de la radiación UV-C sobre la degradación de clorofilas durante la senescencia postcosecha de brócoli (Brassica Oleracea L.)"

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

XII Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal, Santa Rosa (La Pampa), Septiembre 2004. Publicación de resumen. Presentación de póster.

8- "Utilización de tratamientos UV-C en tecnología postcosecha de frutas y hortalizas".

Autores: Vicente Ariel, Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Segundas Jornadas de Fisiología y Tecnología de Postcosecha, IBB-INTECH, Chascomús, Agosto de 2004. Publicación de resumen, comunicación oral.

9-"Características de la actividad Mg-dequelatasa de brócoli."

Autores: Costa Lorenza, Hasperué Joaquín, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Segundas Jornadas de Fisiología y Tecnología de Postcosecha, IBB-INTECH, Chascomús, Agosto de 2004. Publicación de resumen, presentación de póster.

10- "Tratamiento térmico de Alta Temperatura: Efecto sobre la calidad postcosecha de brócoli."

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

XXVI Congreso Argentino de Horticultura, Paraná, Septiembre de 2003.

Publicación de resumen en acta de congreso y trabajo en revista. Presentación de póster.

11- "Degradación de clorofilas durante la senescencia postcosecha de brócoli: Efecto del tratamiento con citoquininas y con etileno".

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Primeras Jornadas de Fisiología y Tecnología de Postcosecha, CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Septiembre de 2003. Publicación de resumen. Presentación oral.

12- "Caracterización y purificación parcial de la actividad Mg-Dequelatasa (MDS) en frutillas."

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

Jornadas de Fisiología Vegetal 2003, realizadas en La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Abril de 2003. Presentación oral.

13- "Characterization and partial purification of Mg-Dechelatase activity from strawberry fruit".

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular, Carlos Paz, Noviembre de 2001. Publicación del trabajo en la revista del congreso. Presentación de poster.

14- "Efecto del tratamiento con citoquininas y con etileno sobre la degradación de clorofilas en brócoli"

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

XI Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal, Punta del Este, República Oriental del Uruguay, Octubre del 2002.

Publicación del trabajo completo en la revista del congreso y en CD. Presentación de poster.

15- "Tratamiento térmico de alta temperatura en brócoli. Efecto sobre la degradación de clorofilas"

Autores: Costa Lorenza, Civello Marcos, Martínez Gustavo, Chaves Alicia.

3^{er}. Congreso Iberoamericano de Tecnología Post-Cosecha y Agroexportaciones, Santiago de Chile, Diciembre de 2002.

Publicación en CD. Presentación de poster.

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	2
I. Senescencia	3
I.1 ¿Qué significa senescencia en plantas?	3
I.2 ¿Cuáles son las características principales de la senescencia?	5
I.3 ¿Cómo está regulada la senescencia ?	8
II. Degradación de clorofilas	12
II.1 Descripción de la clorofila y su ubicación dentro de la célula	12
II.2 Función de la clorofila: fotosíntesis	13
II.3 Mecanismo de degradación de clorofilas	17
III. Brócoli	25
III.1 Origen	25
III.2 Consumo y producción	25
III.3 Taxonomía y morfología	26
III.4 Generalidades del cultivo de brócoli	27
III.5 Valor nutritivo	30
III.6 Características postcosecha de brócoli	31
III.7 Manejo postcosecha de brócoli	33
OBJETIVOS	36
CAPÍTULO I “<i>Caracterización de la senescencia Postcosecha de brócoli variedad De Cicco, almacenado a 20° C.</i>”	37
I.1- Introducción	38
I.2- Objetivo	41
I.3- Materiales y métodos	42
I.3-1 Material vegetal	42
I.3-2 Medida de color superficial	42
I.3-3 Medida del contenido de pigmentos	42
I.3-4 Preparación del extracto enzimático	42
I.3-5 Preparación de los sustratos clorofilas y clorofilinas	43
I.3-6 Medida de la actividad clorofilasa	43
I.3-7 Medida de la actividad Mg-dequelatasa (MDS)	44
I.3-8 Medida de la actividad Peroxidasa	44
I.3-9 Medida del contenido de proteínas totales	44
I.3-10 Medida del contenido de proteínas solubles	45
I.3-11 Medida del poder antioxidante	45
I.3-12 Medida de TBARS	45
I.3-13 Análisis estadístico	46
I.4- Resultados y discusión	47
1- Medida del color superficial	47
2- Medida del contenido de pigmentos	49
3- Medida de la actividad de las enzimas que degradan clorofilas	52
4- Medida de otros parámetros de senescencia	53
Degradación de proteínas	53
Poder antioxidante	55
Peroxidación de lípidos	57
I.5- Conclusiones	60

CAPÍTULO II	<i>“Caracterización de la actividad Mg-dequelatasa de brócoli.”</i>	61
II.1- Introducción		62
II.2- Objetivo		64
	Secuencia utilizada para el aislamiento y purificación parcial de MDS	*64
II.3- Materiales y métodos		65
	II.3-1 Material vegetal	65
	II.3-2 Preparación del extracto para medir la actividad MDS	65
	II.3-3 Análisis de la capacidad de atravesar filtros y membranas	65
	II.3-4 Preparación del sustrato (clorofilina)	65
	II.3-5 Medida de la actividad MDS	66
	II.3-6 Medida de la actividad MDS en función del pH	66
	II.3-7 Medida de la actividad MDS en función de la Temperatura	66
	II.3-8 Medida de la actividad MDS en presencia de efectores	67
	II.3-9 Cromatografía de exclusión molecular	67
	II.3-10 Tratamiento con proteasas	67
	II.3-11 Determinación de proteínas.	68
	II.3-12 Diseño experimental	68
II.4- Resultados y discusión		69
	1- Medida de la actividad MDS en un extracto de brócoli	69
	2- Determinación de la temperatura óptima para la actividad MDS	73
	3- Determinación del pH óptimo para la actividad MDS	74
	4- Efecto de activadores e inhibidores sobre la actividad MDS	76
	5- Determinación de la masa molecular	77
	6- Tratamiento con proteasas	79
	7- Determinación del rendimiento y purificación de los pasos realizados	79
Anexo II.	<i>Caracterización de la actividad Mg.dequelatasa de frutilla</i>	81
	Objetivo	81
	Materiales y métodos	81
	Resultados y discusión	83
	Comparación de los resultados obtenidos para la actividad MDS de brócoli y frutillas.	90
II.5- Conclusiones		92
CAPÍTULO III	<i>“Efecto del tratamiento con citoquininas y con etileno sobre la degradación de clorofilas durante la senescencia postcosecha de brócoli.”</i>	93
III.1- Introducción		94
	Citoquininas	94
	Estructura química y biosíntesis	94
	Mecanismo de acción	95
	Efectos biológicos	95
	Etileno	97
	Estructura química y biosíntesis	97
	Mecanismo de acción	98
	Efectos biológicos	98
	Citoquininas y etileno: efectos sobre postcosecha de brócoli	100

III.2- Objetivo	102
III.3- Materiales y métodos	103
III.3-1 Material vegetal y aplicación de los tratamientos	103
III.3-2 Medida de color superficial	103
III.3-3 Medida del contenido de clorofilas y feofitinas	103
III.3-4 Preparación del extracto enzimático	104
III.3-5 Preparación de los sustratos de las enzimas	104
III.3-6 Medida de la actividad clorofilasa	104
III.3-7 Medida de la actividad Mg-dequelatasa	105
III.3-8 Medida de la actividad Peroxidasa	105
III.3-9 Análisis estadístico	105
III.4- Resultados y discusión	106
1. Observación visual y medida del color superficial	106
2. Medida del contenido de pigmentos	108
Clorofilas	108
Feofitinas	110
3. Medida de la actividad de las enzimas que degradan clorofilas	111
Clorofilasa	111
Mg-dequelatasa	113
Peroxidasa	114
III.5- Conclusiones	116
CAPÍTULO IV “Efecto del tratamiento térmico de alta temperatura sobre la senescencia postcosecha de brócoli.”	117
IV.1- Introducción	118
IV.2- Objetivos	121
IV.3- Materiales y métodos	122
IV.3-1 Material vegetal y tratamientos térmicos aplicados	122
IV.3-2 Medida de color superficial	122
IV.3-3 Medida del contenido de clorofilas y feofitinas	122
IV.3-4 Preparación del extracto enzimático	123
IV.3-5 Preparación de los sustratos de las enzimas	123
IV.3-6 Medida de la actividad clorofilasa	124
IV.3-7 Medida de la actividad MDS	124
IV.3-8 Medida de la actividad peroxidasa	124
IV.3-9 Medida de la velocidad de respiración	125
IV.3-10 Medida del contenido de azúcares totales	125
IV.3-11 Medida del contenido de proteínas totales	125
IV.3-12 Medida del contenido de proteínas solubles	126
IV.3-13 Medida del poder antioxidante	126
IV.3-14 Medida del contenido de TBARS	126
IV.3-15 Análisis estadístico	127
IV.4- Resultados y discusión	128
IV.4- A) Selección del tratamiento térmico	128
IV.4-B) Efecto del tratamiento seleccionado sobre la degradación de clorofilas	131
1. Medida del color superficial y observación visual de las muestras	131
2. Contenido de clorofilas y feofitinas	132
3. Medida de la actividad de las enzimas que degradan clorofilas	135

Clorofilasa	135
MDS	137
Peroxidasa	138
IV.4-C) Estudio del efecto del tratamiento seleccionado sobre otros parámetros de senescencia	140
1. Velocidad de respiración	140
2. Azúcares solubles	141
3. Contenido de proteínas totales y solubles	142
4. Contenido de antioxidantes y TBARS	144
IV.5- Conclusiones	147
CAPÍTULO V “Efecto del tratamiento con luz UV-C sobre la senescencia postcosecha de brócoli.”	148
V.1- Introducción	149
V.2- Objetivos	154
V.3- Materiales y métodos	155
V.3-1 Material vegetal y selección del tratamiento con luz UV-C	155
V.3-2 Medida de color superficial	155
V.3-3 Medida del contenido de clorofilas y feofitinas	156
V.3-4 Preparación del extracto enzimático	156
V.3-5 Preparación de los sustratos de las enzimas	156
V.3-6 Medida de la actividad clorofilasa	157
V.3-7 Medida de la actividad Mg-dequelatasa	157
V.3-8 Medida de la actividad Peroxidasa	157
V.3-9 Medida de la velocidad de respiración	158
V.3-10 Pérdida de electrolitos	158
V.3-11 Medida del poder antioxidante	158
V.3-12 Medida del contenido de compuestos fenólicos	159
V.3-13 Medida del contenido de flavonoides	159
V.3-14 Análisis estadístico	159
V.4- Resultados y discusión	160
V.4-A) Selección del tratamiento con luz UV-C	160
V.4-B) Efecto del tratamiento seleccionado sobre la degradación de clorofilas.	164
1. Medida del contenido de pigmentos durante el almacenamiento a 20° C	164
2. Efecto del tratamiento UV-C sobre las enzimas que degradan clorofilas	167
3. Efecto del tratamiento seleccionado sobre otros parámetros de senescencia	171
Capacidad antioxidante	171
Velocidad de producción de CO ₂ y pérdida de electrolitos	172
Efecto del tratamiento UV-C sobre el contenido de comp. fenólicos	174
V.5- Conclusiones	176
CONCLUSIONES GENERALES	177
<i>Conclusiones generales de la tesis</i>	178
BIBLIOGRAFÍA	182

Introducción General



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

Senescencia
Degradación de clorofilas
Brócoli



I- Senescencia



Algunas definiciones de senescencia.

“La senescencia consiste en una serie de eventos relacionados con la desorganización celular en las hojas y la movilización de los materiales liberados.”

Thomas y Stoddart, 1980

“Comenzar la senescencia significa una transición de las funciones de las hojas desde asimilación hacia removilización.”

Stoddart y Thomas, 1982

“El principal propósito de la senescencia en plantas es movilizar y reciclar nutrientes almacenados durante el crecimiento y desarrollo.”

Buchanan-Wollastron y col., 2003

I.1- ¿Qué significa senescencia de plantas?

El proceso de senescencia se puede considerar como un proceso fisiológico en el cual un tejido vegetal detecta una situación desfavorable que no es conveniente mantener y modifica su metabolismo siguiendo un patrón de eventos característico.

La senescencia puede darse en planta entera, en un órgano separado de la planta, y también en órganos unidos a la planta, y puede durar horas o días. Podríamos separar el proceso de senescencia en tres etapas pero teniendo en cuenta que son etapas que se continúan progresivamente:

1. Iniciación: Un estímulo hormonal y/o ambiental desencadena la senescencia y se produce un cambio a nivel genético que conduce a la activación de algunos genes e inactivación de otros, se produce un cambio en el estado redox de las células y se redirec-

ciona el metabolismo, hay rutas metabólicas que se aceleran y otras que dejan de funcionar.

2. Reorganización: Activación de rutas que generan movilización y reciclado de nutrientes. Desorganización de cloroplastos, no se genera energía a partir de la luz sino a partir de las reservas. Se produce la diferenciación reversible de organelas, una característica de senescencia es la transición de cloroplasto a gerontoplasto (cloroplasto envejecido).
3. Fase terminal: Liberación de radicales libres, pérdida irreversible de integridad y viabilidad de las células. El estrés originado por radicales libres estimula la generación de antibióticos y otros compuestos que actúan en defensa contra patógenos, siendo ésta una respuesta secundaria de la planta.

La mayoría de los trabajos acerca del metabolismo y fisiología de la senescencia se han realizado en hojas. La senescencia puede considerarse como una fase del desarrollo de plantas que precede a la muerte, o bien puede ser prematura inducida por estrés (Pyung Ok Lim y col., 2003). El síntoma más evidente de senescencia es el cambio de color que ocurre en los tejidos, pierden su color verde y aparecen colores amarillos, naranjas y muchas veces pardos. Este cambio tan evidente, se acompaña de cambios en el metabolismo activo que resultan en una movilización de la mayoría de los nutrientes almacenados en las hojas hacia otras partes de la planta. En el caso de árboles deciduos los nutrientes quedan almacenados en células especializadas del tronco mientras que en las plantas anuales son traslocados hacia las semillas. El proceso de senescencia es muy importante para la supervivencia de las especies (Buchanan-Wollaston, 2003).

Podemos decir que el propósito principal de la senescencia es movilizar y reciclar todos los nutrientes que fueron almacenados en las hojas durante su crecimiento y desarrollo, este proceso llevará finalmente a la muerte de las hojas, pero la muerte será retrasada activamente hasta que los nutrientes sean completamente removidos, esta etapa que precede a la muerte y que se dedica a movilizar y reciclar los nutrientes es la senescencia.

Se ha demostrado claramente que la senescencia en sus primeras etapas es reversible, hojas de tabaco completamente amarillas en las que la mayor parte de los nutrientes han sido reciclados pueden reverdecer (Zavaleta-Mancera y col., 1999). Los cloroplastos recuperan su estructura, se sintetizan proteínas cloroplásticas y se reinicia la fotosíntesis. Por lo tanto la senescencia está permanentemente regulada.

Se ha mencionado que la senescencia puede ser prematura cuando es inducida por algún tipo de estrés. Por ejemplo frente a algún factor ambiental desfavorable, la senescencia será uno de los mecanismos que se pondrá en marcha tratando de recuperar los nutrientes que estén almacenados en la parte afectada de la planta. Asimismo, frente a un estrés de tipo biótico tal como un ataque de un patógeno a una hoja, se desencadenará la senescencia en esa hoja permitiendo reciclar sus nutrientes hacia otra parte de la planta, antes de eliminar la hoja dañada. Otros factores ambientales que pueden desencadenar la senescencia son la deficiencia de agua, deficiencia de nutrientes y estrés oxidativo por exposición a exceso de luz UV-B y ozono. También se observa desarrollo de senescencia cuando hojas y otros tejidos verdes inmaduros, son separados de las plantas y almacenados (senescencia postcosecha).

I.2- ¿Cuáles son las características principales de la senescencia?

- ❖ **Degradación de clorofilas**
- ❖ **Modificaciones en el metabolismo de proteínas**
- ❖ **Degradación de lípidos y ácidos nucleicos**
- ❖ **Alteración de membranas**
- ❖ **Desorganización de los tejidos**

Degradación de clorofilas

El cambio más temprano y significativo que se produce durante la senescencia tiene lugar a nivel de cloroplastos, organela que contiene más del 70 % de las proteínas de las hojas: disminuye la velocidad de fotosíntesis (asimilación de carbono) y comienza la degradación de clorofilas. El amarillamiento de los tejidos como consecuencia de la degradación de clorofilas es el síntoma más evidente de senescencia. La degradación de clorofilas comienza con la desorganización de los complejos pigmento–proteína de los cloroplastos dejando en libertad moléculas de clorofilas, las que rápidamente son degradadas como un mecanismo de detoxificación (Matile y col., 1999). Las moléculas de clorofilas son muy fotoactivas y podrían generar radicales libres que ocasionarían daños en membranas y otras macromoléculas.

Modificaciones en el metabolismo de proteínas

Durante la senescencia se produce una importante degradación y movilización de proteínas de las cuales la mayor parte están localizadas dentro del cloroplasto. Aún no está claro cual es la señal que inicia este proceso, pero si está claro que se produce una disminución del contenido de proteínas y un aumento del contenido de amino ácidos libres. Se han publicado numerosos trabajos que muestran que durante la senescencia se produce la degradación de proteínas de estroma de cloroplastos, como RUBISCO (ribulosa bifosfato carboxilasa, que es la proteína más abundante) y glutamina sintetasa (Ishida y col., 2002; Roulin y Feller 1998). Las proteínas que forman parte de los complejos pigmento-proteínas, como por ejemplo LHCP II (sistema recolector de luz II) son degradadas por proteasas del cloroplasto una vez que los complejos se desorganizaron por remoción de las clorofilas y sus catabolitos (Thomas y Donnison, 2000).

Por otra parte, se detecta la síntesis de nuevas proteínas, particularmente proteasas que son direccionadas hacia vacuola y cloroplastos. También se ha demostrado que la actividad de muchas proteasas, peroxidasas, catalasas, peptidasas y polifenol oxidasas se incrementa durante la senescencia.

Podemos resumir diciendo que durante la senescencia se produce un redireccionamiento de la síntesis de proteínas. En las primeras etapas aumenta la expresión de Ubiquitina (marca a las proteínas que serán degradadas en citoplasma a través del proteosoma), proteasas, ribonucleasas y enzimas que participan de la vía del glioxilato y gluconeogénesis. Como resultado de esto se degradan proteínas que ya no se usarán más y se prepara la maquinaria necesaria para el cambio metabólico de senescencia. En las etapas más avanzadas se activan y expresan genes que codifican para enzimas que actúan frente a todo tipo de estrés: metalotioneínas, proteínas antifúngicas, etc.

Degradación de lípidos

Durante la senescencia se produce una alteración en la estructura y funcionalidad de las membranas debido a un metabolismo acelerado de los lípidos que las componen. Los genes que codifican enzimas como fosfolipasas, ácido fosfatídico fosfatasa y lipooxigenasas aumentan su expresión durante la senescencia sugiriendo que dichas enzimas podrían estar involucradas en el metabolismo acelerado de lípidos (Thompson y col., 1998).

Las membranas tilacoidales representan una fuente abundante de lípidos los que pueden mobilizarse para ser utilizados como fuente de carbono y energía.

Durante la senescencia se produce un aumento de la expresión de enzimas necesarias para la β -oxidación de lípidos y la vía del glioxilato, estas rutas metabólicas son importantes cuando el aporte de azúcares es escaso (Graham y Eastmond, 2002). A partir de la degradación de lípidos se generan moléculas de acetyl-CoA las que pueden utilizarse directamente para la respiración o bien ser utilizadas por la vía del glioxalato y gluconeogénesis para la síntesis de azúcares que podrían ser exportados. Se ha encontrado un aumento durante la senescencia en la expresión de dos genes involucrados en este metabolismo: uno codifica para la enzima piruvato ortofosfato diquinasa que participa en la gluconeogénesis (Buchanan-Wollaston y Ainsworth, 1997) y otro que codifica para un transportador de monosacáridos (Quirino y col., 2001).

Degradación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos representan una fuente importante de fósforo. Durante la senescencia aumenta la expresión de genes que codifican diferentes nucleasas (Taylor y col., 1993; Perez-Amador, 2000) las que posiblemente degradan ácidos nucleicos durante esta etapa. Los niveles de ARN disminuyen rápidamente a medida que se produce la senescencia, pero el ADN se mantiene hasta etapas muy avanzadas, lo que es lógico si entendemos que la senescencia implica un metabolismo activo. Se ha demostrado que durante la senescencia aumenta el metabolismo de guanosinas liberando CO_2 y reutilizando el NH_3 , lo que indicaría degradación de ácidos nucleicos.

Alteración de membranas y desorganización de los tejidos.

Durante la senescencia se producen cambios citológicos importantes: reducción en el número de ribosomas, transición de cloroplastos hacia gerontoplastos, desaparición de los gránulos de almidón, pérdida de densidad en los tilacoides, se forman plastoglobulos que contiene material lipídico, el retículo endoplásmico tubular se transforma en vesicular, posteriormente desaparecen el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y se desintegran las membranas vacuolares. Las mitocondrias muestran algunos cambios de tamaño y morfología en las primeras etapas, pero se mantienen funcionales hasta el final de la senescencia. Los núcleos también se mantienen estables durante la senescencia hasta la etapa final donde las membranas se alteran se llenan de vesículas y se pierde la cromatina (Gan y Amasino, 1997).

El proceso de senescencia está vinculado a cambios en el sistema de membranas que mantiene la compartimentalización de las células, y se cree que el inductor de senescencia estaría en citoplasma, desde allí desencadenaría la senescencia y a medida que avanza el proceso se va perdiendo la integridad de los tejidos.

Las membranas cambian su composición ya que hay un aumento de la actividad fosfolipasa lo que conduce a la degradación de fosfolípidos, las membranas aumentan su viscosidad, aumentan la permeabilidad, se pierde agua y por lo tanto se produce deshidratación.

I.3- ¿Cómo está regulada la senescencia?

El proceso de senescencia está bajo control estricto desde que se induce hasta las etapas finales, y dado que puede ser inducido de diferentes maneras (factores hormonales y ambientales), el mecanismo de regulación implica muchas vías diferentes, interconectadas. Existen numerosas evidencias que indican que el inicio y el ritmo con que se desarrolla la senescencia involucra la expresión de una batería de genes específicos del proceso (Gepstein 2004).

Factores que participan en la regulación de senescencia

1- Factores hormonales

Hormonas vegetales que regulan la senescencia: Citoquininas y Etileno

Existen muchas evidencias acerca del rol antagónico que cumplen las hormonas citoquininas y etileno en la regulación de senescencia.

Se ha demostrado que las citoquininas retrasan la senescencia. Plantas de tabaco transgénicas que expresan un gen que codifica para una enzima clave en la síntesis de citoquininas (*Agrobacterium ipt* gen) utilizando un promotor de senescencia (SAG12) se mantienen verdes y sin senescer por más tiempo que los controles sin transformar (Gan y Amasino, 1995). Todos los síntomas de senescencia (degradación de clorofilas, pérdida de proteínas y disminución de fotosíntesis) son retrasados en las hojas de tabaco transgénicas (Wingler y col., 1998). Por otro lado, se observó senescencia prematura en líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresan un gen *fps* (farnesil difosfato sintasa) que conduce a la disminución de un sustrato necesario para la síntesis de citoquininas (Masferrer y col.,

2002). Resultados similares se obtuvieron en petunias que sobreexpresan un gen, *Sbo*, similar a los genes *ipt* de *Arabidopsis*, que aparentemente codifica para la biosíntesis de citoquininas (Zubko y col., 2002).

Se ha demostrado que plantas expuestas a etileno presentan senescencia acelerada. Sin embargo, los estudios realizados indican que el etileno es un acelerador de la senescencia pero no es esencial para que el proceso ocurra. Se ha demostrado que diferentes líneas mutantes de *Arabidopsis* con defectos en las vías de señalización de etileno presentan senescencia retrasada (Oh y col., 1997). Plantas antisentido de tomate para el gen que codifica para una enzima importante de la síntesis de etileno, sintetizan bajos niveles de etileno y presentan senescencia retrasada en sus hojas (Picton y col., 1993).

2- Factores ambientales

Los mecanismos de respuesta frente a estrés aceleran la senescencia

La senescencia puede ser inducida por diversos factores bióticos y abióticos causantes de estrés: infección por patógenos, déficit de agua o nutrientes, estrés oxidativo inducido por ozono o por luz UV-B y oscuridad. Los estudios de las vías de señalización de respuesta a estrés, han mostrado que existen muchos genes involucrados en éste proceso que también están vinculados a senescencia. No está claro aún si el estrés puede ser una señal que desencadena la senescencia o si la senescencia por sí misma genera una situación de estrés y como tal induce las respuestas de estrés (Buchanan-Wollaston y col., 2003). Se ha observado que en el caso de arvejas sometidas a sequía se induce un patrón de expresión y síntomas similares a los de senescencia, es decir el estrés sería previo a la senescencia (Pic y col., 2002). Sin embargo, en la mayoría de los casos los mecanismos de respuesta frente a estrés aparecen luego de iniciada la senescencia, por lo que la expresión de éstos genes se activa porque la senescencia llevó a una situación de estrés.

Según Buchanan-Wollaston (2003) existirían numerosos mecanismos de señalización que controlan la expresión de genes en respuesta a situaciones de estrés y algunos de esos caminos están también involucrados en la senescencia de hojas.

Algunas de las moléculas “señales” que participan de los caminos de regulación de la expresión de genes involucrados en respuesta a patógenos y otras situaciones de estrés, son ácido Salicílico (SA), ácido Jasmónico (JA) y etileno (Turner y col., 2002; Wang y col., 2002).

Se ha demostrado que durante la senescencia de hojas la expresión de algunos de los genes involucrados es dependiente de la presencia de SA (Morris y col., 2000). Por otra parte se ha demostrado que la expresión de una cisteína proteasa exclusiva de senescencia (SAG12) requiere SA para aumentar la expresión durante senescencia pero no se expresa cuando hojas verdes son tratadas con SA, lo que indica que se requiere simultáneamente la presencia de SA y otro factor relacionado con la edad de la hoja (Morris y col., 2000).

El tratamiento exógeno con JA y metiljasmonato de hojas de cebada llevaron a la degradación de clorofilas y proteínas (RUBISCO particularmente) indicando la inducción de senescencia (Partier 1990). Recientemente se ha estudiado el rol del ácido jasmónico y sus moléculas relacionadas sobre la senescencia en *Arabidopsis* y se ha demostrado que el tratamiento con JA induce la aparición de síntomas de senescencia (He y col., 2002) mientras que esto no ocurre en mutantes insensibles a JA.. Sin embargo en plantas que son insensibles a JA o que producen bajos niveles de JA la senescencia ocurre de todos modos. Por lo tanto JA, al igual que etileno, sería acelerador de senescencia pero no sería esencial para que el proceso ocurra.

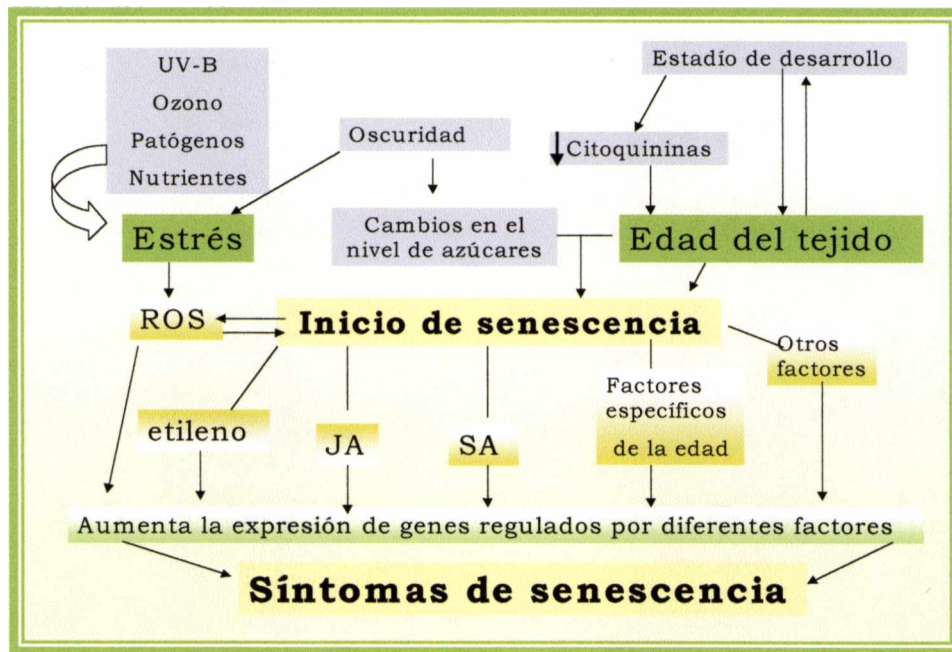
Otro factor que actúa como acelerador del proceso de senescencia es el estrés oxidativo. La degradación de macromoléculas que acompaña a la senescencia genera estrés oxidativo ya que se producen gran cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (Thompson y col., 1998; John y col., 2001). Cuando plantas de *Arabidopsis* son irradiadas con un exceso de luz UV-B se genera estrés oxidativo ya que aumentan las especies reactivas de oxígeno y esto lleva a una inducción de la senescencia (John y col., 2001), demostrando que los tratamientos con luz UV-B en exceso inducen la senescencia mediante un aumento de ROS.

3- Cambios en el nivel de azúcares. Senescencia inducida por oscuridad

El nivel de azúcares en los tejidos tiene un rol de control muy importante de todo el metabolismo y desarrollo de los organismos. La detección del nivel de azúcares se realiza a través de la enzima hexoquinasa y esto es clave para la regulación de muchos caminos de señalización para generar respuestas (Rolland y col., 2002). Plantas transgénicas que sobreexpresan hexoquinasa sufren senescencia prematura, lo que indicaría que el nivel de azúcares en el organismo juega un rol importante en la regulación de senescencia (Xiao y col., 2000).

La senescencia en plantas puede ser inducida por oscuridad, en esta situación se produce una disminución de la fotosíntesis y una consecuente disminución en los niveles de azúcares, induciendo la senescencia (Hensel y col., 1993). Se ha demostrado que la oscuridad induce la expresión de muchos genes relacionados con senescencia y que esto se revierte en presencia de glucosa (Fujiki y col., 2001). En hojas verdes bajos niveles de azúcares aceleran la fotosíntesis mientras que altos niveles inhiben la transcripción de genes fotosintéticos (Rolland y col., 2002). El nivel de azúcares estaría relacionado con la regulación de la expresión de algunos genes durante la senescencia pero se necesita además la participación de otros factores relacionados con la edad de la planta.

Como se mencionó previamente, la regulación de la senescencia es un proceso en el que participan muchos factores y mecanismos de señalización de respuestas, pero aún se está estudiando como están relacionados todos los factores involucrados y no se sabe cual es el factor desencadenante o determinante del proceso. Todos los mecanismos de regulación mencionados pueden resumirse en el siguiente esquema:



Por lo tanto, cualquiera de los factores inductores del proceso (oscuridad; estrés; hormonas) puede activar un conjunto de genes de senescencia que llevarán a la manifestación de los síntomas (He y col., 2001).

II- Degradación de clorofilas:

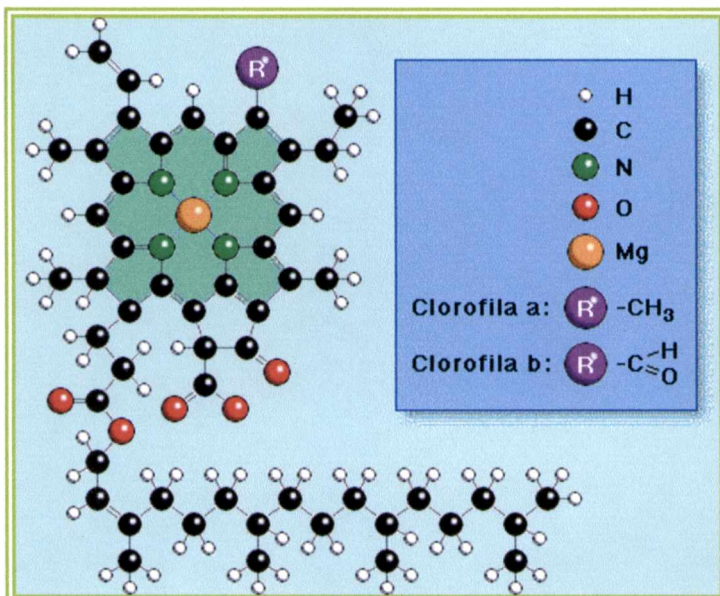
Síntoma más evidente de senescencia

II.1- Descripción de la clorofila y su ubicación dentro de la célula

Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos responsables del color verde de las hojas y tejidos vegetales. Son compuestos orgánicos complejos formados por un anillo tetrapirrólico (cuatro anillos pirrólicos A, B, C y D) que posee un átomo de Mg^{+2} coordinado en el centro. El anillo tetrapirrólico presenta un sistema de dobles enlaces conjugados que es el responsable del color. Una molécula de fitol está unida al pirrol D del anillo tetrapirrólico mediante una unión éster, otorgando el carácter hidrofóbico a la molécula de clorofila. Las plantas superiores presentan dos clases de clorofilas llamadas a y b. La diferencia entre ellas se encuentra en uno de los sustituyentes del anillo tetrapirrólico lo que les da una pequeña diferencia de color y solubilidad:

clorofilas a → grupo metilo, color verde.

clorofilas b → grupo carbonilo, color verde azulado.



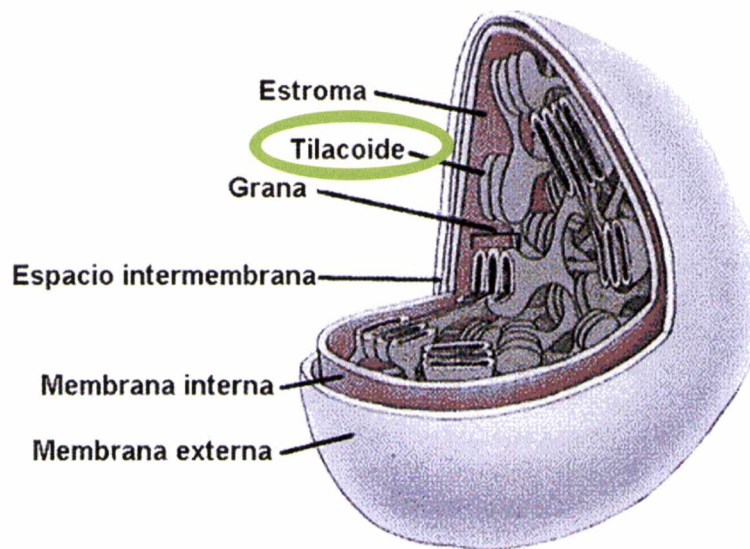
Esquema de la molécula de clorofila

Figura tomada de www.iris.cnice.mecd.es/contenidos8.

htm

El grupo fitol no polar es el que proporciona la base estructural para la integración de las moléculas de clorofila en la matriz lipoproteica de la membrana tilacoidal. La fotosíntesis permite que las células capturen la energía luminosa del sol y la transformen en energía química, la que será utilizada para la síntesis de moléculas o será almacenada en moléculas energéticas.

El proceso de transformación de energía del sol en energía química se realiza en los cloroplastos. Los pigmentos fotosintéticos se encuentran formando parte de los complejos recolectores de luz que se ubican en las membranas tilacoidales de los cloroplastos.



Estructura del cloroplasto

(dibujo tomado de <http://iris.cnice.mecd.es/contenidos8.htm>, con algunas modificaciones)

II.2- Función de la clorofila: fotosíntesis

“La clorofila es el pigmento más importante de la biósfera, ya que cumple una función vital que afecta directa o indirectamente a todos los seres vivos”

(Matile y col., 1996).

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas verdes convierten la energía lumínica en energía química, es decir se almacena la energía electromagnética como energía química en compuestos de carbono reducidos, desprendiendo simultáneamente oxígeno molecular. Este proceso suministra directa o indirectamente las sustancias nutritivas esenciales para la vida.

Los organismos fotosintéticos captan la luz solar formando ATP y NADH, que utilizan como fuente de energía para formar glucosa y otros componentes orgánicos a partir de CO₂ y H₂O, liberando oxígeno molecular. Mediante este proceso el CO₂ formado en la respiración de los organismos heterótrofos regresa a la atmósfera para volver a ser utilizado por los organismos fotosintéticos.

La capacidad de capturar la energía de la luz solar y convertirla en energía química es exclusiva de las plantas verdes debido a que poseen los pigmentos fotosintéticos. Los pigmentos más importantes que absorben luz en las membranas de los tilacoides son las clorofilas a (pigmento de color verde debido a que absorbe preferentemente la luz roja y azul). La absorción de luz por parte de las clorofilas es una función vital para los seres vivos (Taiz y Zeiger, 1998).

La fotosíntesis se lleva a cabo dentro de los cloroplastos y es un proceso que requiere dos fases o etapas durante las que se produce la siguiente reacción:



Fase lumínica

La luz incide sobre la clorofila y excita un electrón pasándolo a un nivel energético superior. En una serie de reacciones que involucran una cadena de transporte de electrones, la energía se convierte en ATP y NADPH. El agua se descompone en el proceso liberando oxígeno como producto secundario de la reacción. El ATP y el NADPH se utilizan para fabricar los enlaces C-C en la etapa oscura.

Los fotosistemas son empaquetamientos altamente organizados de moléculas de clorofilas y otros pigmentos junto con proteínas ubicados en los tilacoides. En el "corazón" del fotosistema se encuentra la clorofila cuyo electrón se excita.

Existen en la naturaleza dos tipos de fotosistemas: Fotosistema I y Fotosistema II. La mayoría de los procariotas poseen sólo el fotosistema II mientras que los eucariotas usan el fotosistema II y el fotosistema I.

El fotosistema I usa la clorofila a en una forma denominada P700. El Fotosistema II usa una forma de clorofila a conocida como P680. La diferencia entre ambos fotosistemas se debe al tipo de proteínas que forman parte de los complejos pigmentos-proteínas en cada fotosistema.

La fotofosforilación es el proceso de conversión de la energía del electrón excitado por la luz, ocurre en la membrana tilacoidal y está asociada a la síntesis quimiosmótica del ATP. La energía de la luz causa la activación de una molécula de P680 que es parte del Fotosistema II. En este estado excitado, P680 libera un electrón, el cual es transferido a una molécula aceptora (aceptor primario), y pasa luego al Fotosistema I a través de una cadena transportadora de electrones. La P680 queda cargada positivamente, por lo que requiere un electrón que es tomado del agua generando iones H^+ y O_2 que se libera a la atmósfera.

A su vez, la luz también actúa sobre P700 del Fotosistema I, produciendo de forma similar un estado excitado de la molécula de clorofila. En el estado excitado se desprende un electrón que es aceptado por un aceptor primario (diferente del asociado al Fotosistema II). El electrón pasa nuevamente por una serie de reacciones rédox, y finalmente se combina con $NADP^+$ e H^+ para formar NADPH, un portador de H necesario en la fase independiente de la luz. El electrón proveniente del Fotosistema II reemplaza al electrón excitado de la molécula P700. Existe por lo tanto un continuo flujo de electrones (no cíclico) desde el agua al NADPH, el cual es usado para la fijación del carbono (fig. 1).

La energía liberada durante el transporte de los electrones es utilizada para generar un gradiente de protones entre el interior y el exterior del tilacoide, en forma similar al transporte quimiosmótico de electrones que ocurre en la mitocondria (Taiz y Zeiger, 1998; www.biología.edu.ar/plantas/fotosint.html, 2004).

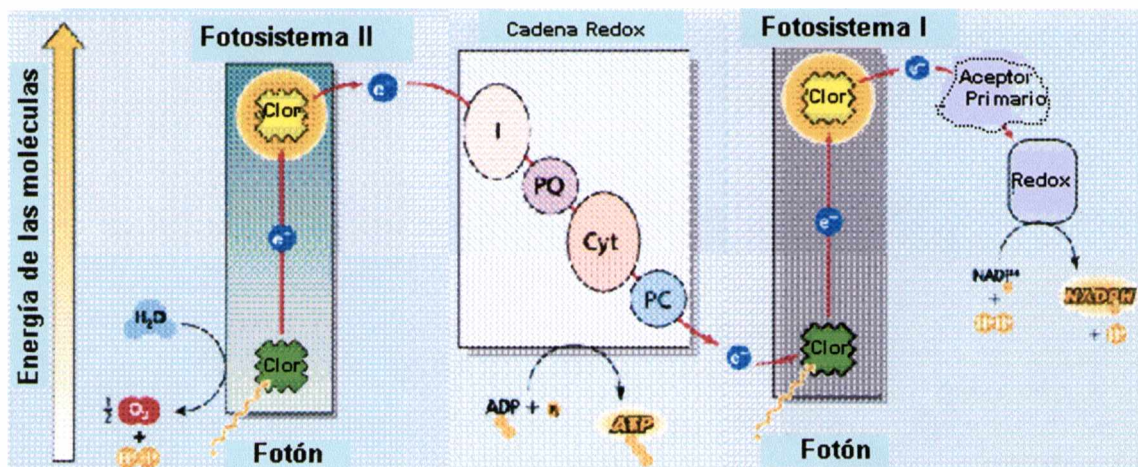


Fig. 1- Flujo de electrones entre los dos fotosistemas asociado a la síntesis de ATP.

Dicho proceso ocurre en la membrana tilacoidal.

Dibujo publicado en la página de la Universidad de Minnesota:

<http://genbiol.cbs.umn.edu/Multimedia/examples.html>

En algunos eucariotas y en bacterias fotosintéticas, ocurre un flujo cíclico de electrones durante el cual sólo se produce un gradiente de protones sin producción de NADPH. Esto también ocurre cuando la célula requiere ATP adicional, o cuando no hay NADP^+ para reducirlo a NADPH.

El gradiente de protones es utilizado finalmente por el complejo ATP sintasa convirtiendo $\text{ADP} + \text{P}$ en ATP (**fig. 2**).

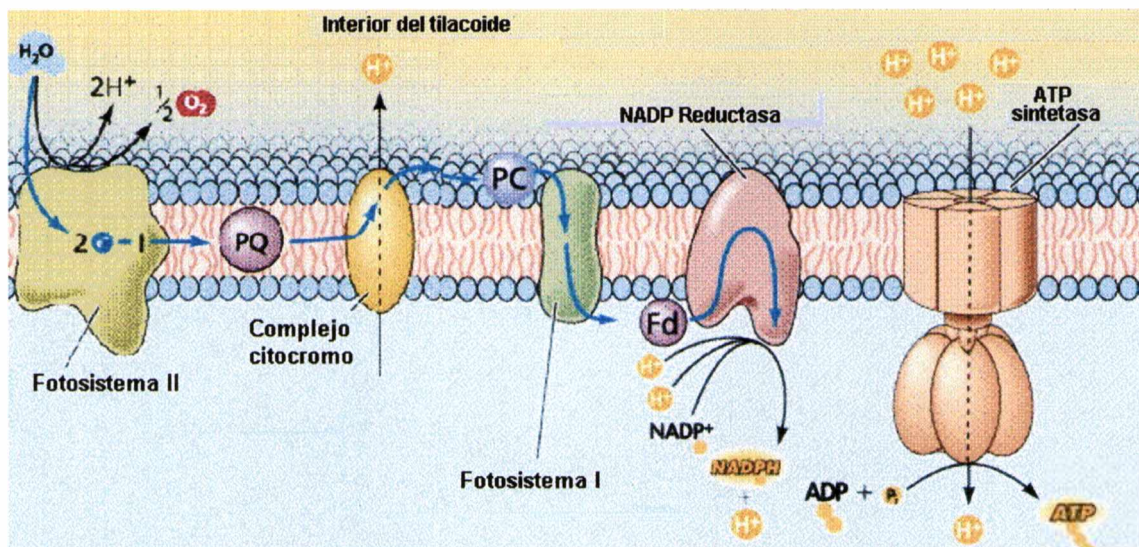


Fig. 2- Representación de la fotofosforilación asociada a la síntesis de ATP, dicho proceso ocurre en la membrana tilacoideal.

Dibujo publicado en la página Web de la Universidad de Minnesota:

<http://genbiol.cbs.umn.edu/Multimedia/examples.html>

Fase oscura

El anhídrido carbónico de la atmósfera es captado por las plantas a través de los estomas y se transforma en compuestos orgánicos: fijación del Carbono. La energía generada en la fase lumínica es utilizada por las plantas para obtener compuestos orgánicos que serán trasladados al resto de la planta y utilizados como fuente de energía para los procesos metabólicos.

La fijación del C se realiza a través del ciclo de Calvin que se desarrolla en el estroma de los cloroplastos. Seis moléculas de anhídrido carbónico entran en el Ciclo de Calvin y, eventualmente, producen una molécula de glucosa (**fig. 3**).

Globalmente: 6 moléculas de RuBP (ribulosa bifosfato, 5 carbonos) se combinan con 6 de anhídrido carbónico y dan 12 de 3-fosfoglicérico (3-PGA), compuesto de 3

carbonos. La enzima que cataliza esta reacción es la RuBP carboxilasa (RUBISCO), y se encuentra en la superficie de las membranas tilacoidales. La energía del ATP y el NADPH generados por los fotosistemas se usan para fosforilar al 3-PGA y reducirlo a fosfogliceraldehido (PGAL), también de tres carbonos.

Del total de 12 moléculas transformadas, dos moléculas de 3-PGAL salen del ciclo para convertirse en glucosa (6 carbonos). Las moléculas restantes de PGAL son convertidas por medio del ATP en 6 moléculas de RuBP (5 carbonos), que recomienzan el ciclo. Al igual que en el ciclo de Krebs cada reacción es catalizada por una enzima específica (Taiz y Zeiger, 1998; www.biología.edu.ar/plantas/fotosint.html, 2004).

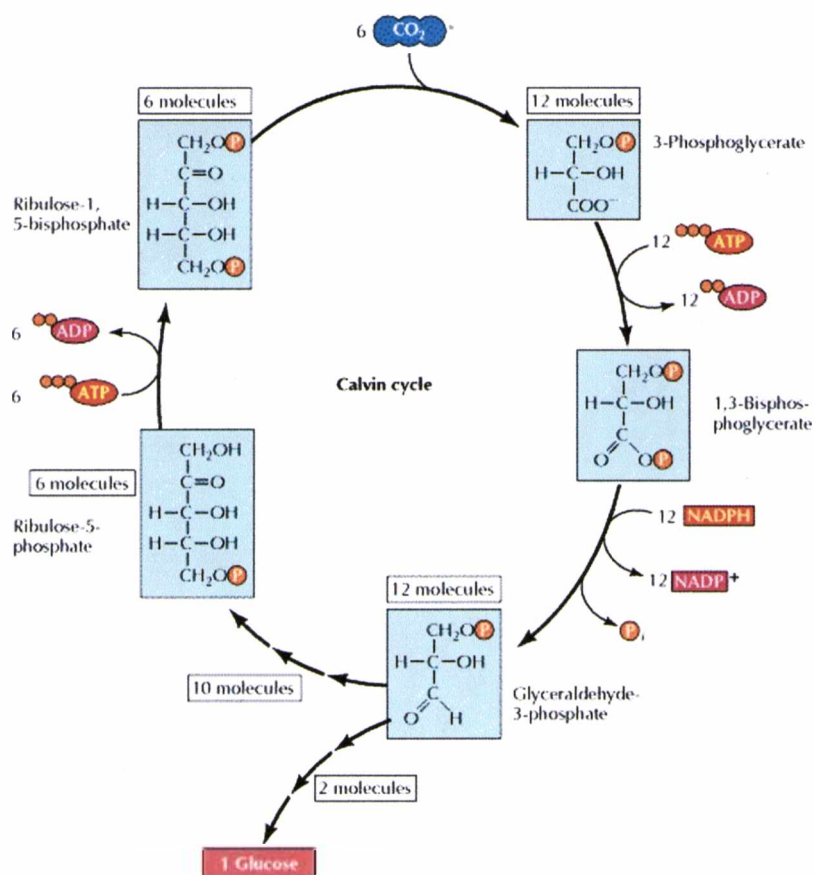


Fig. 3- Ciclo de Calvin.

Imagen de www.ncbi.nlm.nih.gov

II.3- Mecanismo de degradación de clorofilas

La degradación de clorofilas ocurre en gran magnitud durante dos procesos fisiológicos importantes: maduración de frutos y senescencia de tejidos.

Las clorofilas están ubicadas en los tilacoides, por lo que el proceso de degradación comienza en los cloroplastos con la desorganización de los complejos pigmentos proteína, quedando en libertad las moléculas de clorofilas. Estas moléculas son altamente fotoactivas, pudiendo generar radicales libres y reacciones en cadena que causarían daños a los tejidos. Por tal razón las moléculas de clorofilas liberadas deben ser rápidamente degradadas como un mecanismo de detoxificación (Matile y col., 1999). Simultáneo a la degradación de clorofilas los cloroplastos se transforman en gerontoplastos, plástidos en los que el metabolismo es sólo catabólico. El desarrollo de gerontoplastos se produce a lo largo de toda la senescencia, los plástidos pierden volumen y densidad como consecuencia de una gran pérdida de sus componentes del estroma y de los tilacoides, simultáneamente aumenta el número y tamaño de plastoglóbulos lipofílicos. Cuando los gerontoplastos se han desarrollado por completo consisten en una membrana que envuelve un gran número de plastoglóbulos. El desarrollo de los gerontoplastos está bajo control nuclear y la expresión de los genes codificados en los plástidos juega un rol poco importante en este desarrollo (Matile y col, 1999). En hojas de arroz se ha demostrado que el ADN de transferencia de los cloroplastos se degrada completamente antes de la transición de cloroplastos a gerontoplastos (Sodmergen y col., 1991). Por otra parte la senescencia de hojas en muchas especies es reversible (Venkatrayappa y col., 1984) lo que sugiere que se mantiene información genética en el núcleo, necesaria para reverdecer y reorganizar la estructura de los cloroplastos durante las primeras etapas de senescencia.

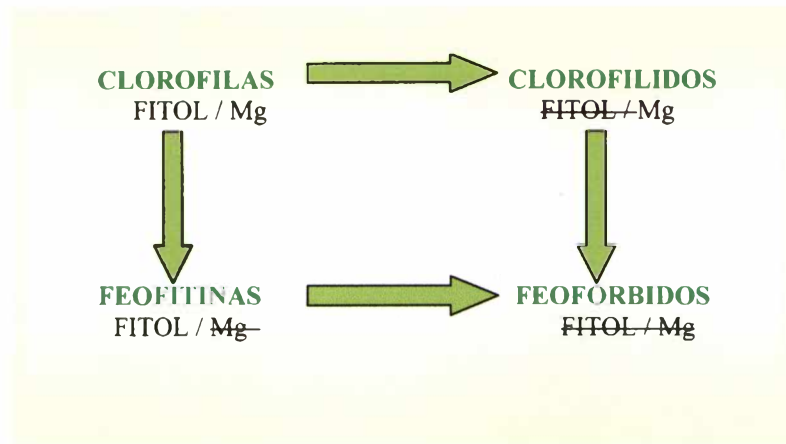
Como productos derivados de la degradación de clorofilas podemos mencionar tres tipos de compuestos:

1) Fitol y sus derivados isoprenoides

A medida que se degrada la clorofila cantidades sustanciales de fitol aparecen esterificadas con ácidos grasos y con ácido acético. En hojas senescentes de cebada se obtienen formas esterificadas y libres de fitol ubicadas dentro de los plastoglóbulos de los gerontoplastos (Bortlik K.1990). La pérdida del contenido de fitol durante la senescencia de cebada se debe a la conversión de los mismos en derivados isoprenoides.

2) Derivados verdes de clorofilas

Son aquellos compuestos que derivan de clorofilas pero que conservan el anillo tetrapirrólico con dobles enlaces conjugados, y por lo tanto tienen color: feofitinas, clorofilidos, feofórbidos y 13²-hidroxiclorofila. En el siguiente esquema se representan las diferencias en la estructura de las moléculas de estos compuestos:



3) Catabolitos tetrapirrólicos lineales:

Estos derivados no presentan color verde debido a que el anillo tetrapirrólico se rompe y se pierde el sistema de dobles enlaces conjugados responsable del color. Dentro de estos compuestos están los catabolitos fluorescentes de clorofilas (FCC) y los catabolitos no fluorescentes de clorofilas (NCC).

Estructura química de los derivados de clorofilas.

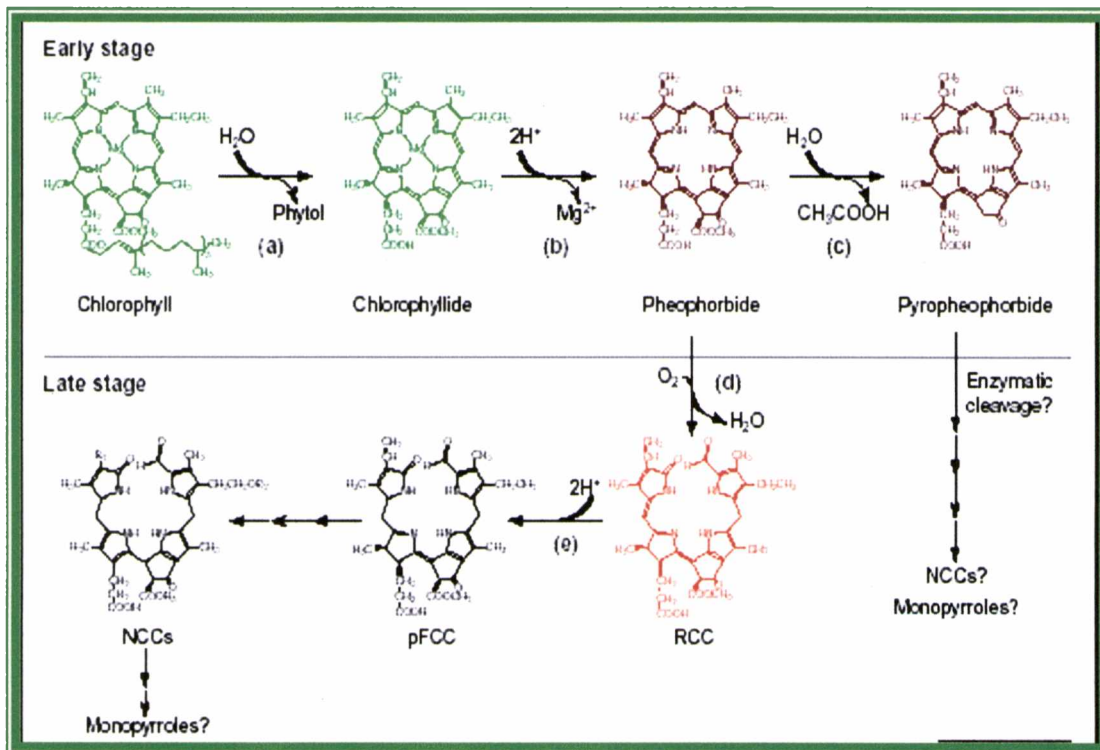


Figura tomada de una publicación de la revista *Trends in Plant Science, Reviews*, Takamiya y col., Octubre 2000, Vo 5.

Chlorophyll: clorofila

Pheophorbide: feofórbido

Chlorophyllide: clorofilido

Pyropheophorbide: pirofeofórbido

pFCC: catabolitos fluorescentes de clorofila

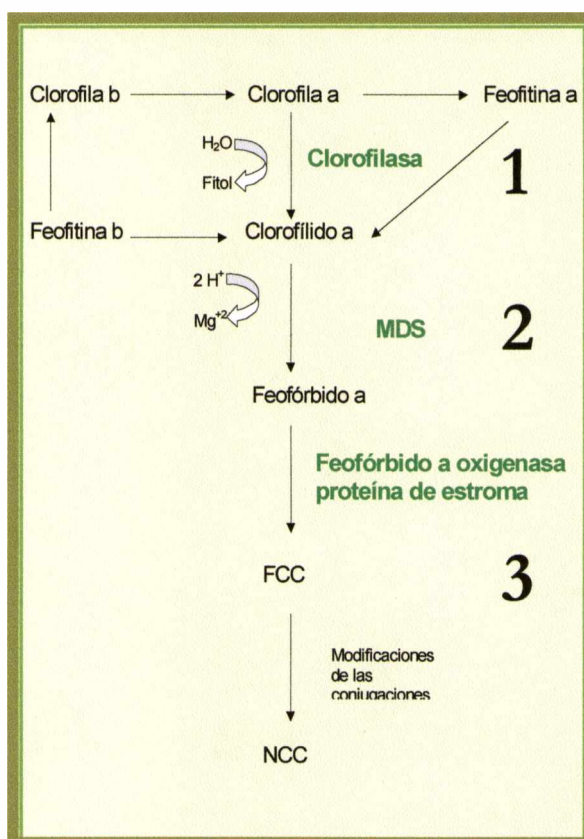
RCC: catabolitos rojos de clorofila

NCC: catabolitos no fluorescentes de clorofila

Ruta metabólica de degradación de clorofilas

Matile y col. (1999) proponen el siguiente mecanismo de degradación de clorofilas:

1. En la primera etapa la enzima clorofilasa hidroliza la unión éster entre el anillo tetrapirrónico y el fitol dando como resultado la formación de clorofilidos a y b.
2. En la segunda etapa la actividad Mg-dequelatasa, elimina el átomo de Mg^{+2} central del anillo tetrapirrónico de clorofilido a y se forma feofórbido a.
3. En la tercera etapa se produce el clivaje oxidativo del anillo tetrapirrónico dando origen a los FCC (catabolitos fluorescentes de clorofilas). Hasta esta etapa, todo ocurre en el cloroplasto. Posteriormente, los FCC modifican sus enlaces conjugados y se transforman en NCC (catabolitos no fluorescentes de clorofilas), esto ocurre en vacuolas.



Esquema del mecanismo de degradación de clorofilas propuesto por Matile y col., 1999.

El primer catabolito de clorofilas que presenta el anillo tetrapirrónico abierto ha sido caracterizado en cotiledones de colza como FCC (Mühlecker y col., 1996). Dicho catabolito resulta de la adición de dos átomos de oxígeno y 4 átomos de hidrógeno a la

molécula de feofórbido a nivel del enlace entre el C4 y C5, seguido de una reducción que satura la unión entre los C10 y C20.

La etapa 1 está catalizada por la enzima clorofilasa ó clorofila-clorofilido hidrolasa (Clasa). La actividad clorofilasa ha sido estudiada desde hace aproximadamente 90 años (Matile y col., 1999) y se ha definido que esta actividad está presente en plantas superiores, diatomeas y *Chlorella*. Clasa ha sido purificada a partir de varias especies y se ha descrito como una glicoproteína asociada a membranas (Schellenberg y Matile, 1995; Brandis y col., 1996; Matile y col., 1997; Tsuchiya y col., 1996), con un rango de masas moleculares determinadas mediante electroforesis desnaturalizante (con SDS) que va desde 27 kD (cítricos) a 46 kD (*Phaeodactylum tricornutum*) (Tsuchiya y col., 1999). No está claro aún si las diferencias en la masa molecular se deben a diferencias entre especies o a diferentes isoenzimas. Clasa es considerada como una enzima cloroplástica que está asociada a membranas. Inicialmente se suponía que estaba en los tilacoides pero, recientemente se ha descrito que se encuentra en la membrana que envuelve a los cloroplastos (Brandis y col., 1996; Matile y col., 1997). Los niveles de clorofilasa se ven afectados por numerosos factores internos y externos. Se ha demostrado que existe una correlación entre el aumento de actividad clorofilasa y la disminución del contenido de clorofilas en hojas senescentes como así también se ha demostrado que la actividad Clasa responde a la acción del etileno durante la maduración de frutos (Benedetti y Arruda, 2002). La actividad de la enzima es modificada por el ácido jasmónico y metiljasmónico quienes estimulan la expresión de esta enzima (Benedetti y col., 1998; Tsuchiya y col., 1999). La actividad clorofilasa ha sido detectada no sólo en hojas senescentes, sino también en hojas presenescentes, tejidos verdes y también en períodos en los que hay síntesis neta de clorofilas, lo que sugiere que esta enzima participa del recambio de clorofilas (Matile y col., 1996; Minguéz-Mosquera y Gallardo-Guerrero 1996). Se ha propuesto que la actividad clorofilasa se encuentra latente, dicha latencia se debe a una separación espacial entre los complejos pigmento proteínas ubicados en los tilacoides y la enzima localizada en la membrana que envuelve a los cloroplastos. La actividad Clasa necesita que se produzca la desorganización de la estructura de los cloroplastos para actuar sobre su sustrato (Matile y col., 1997; Benedetti y Arruda 2002). Se ha propuesto la existencia de una proteína soluble que actuaría como transportador de clorofilas desde los complejos tilacoidales hasta la membrana que envuelve a los cloroplastos donde estaría ubicada Clasa (Matile y col., 1997). Esta hipótesis ha sido reafirmada a través del clonado, secuenciado y la expresión de un ADNc de coli-

flor, llamado WSCP, que corresponde a una proteína soluble, posiblemente de localización cloroplástica y que tiene la capacidad de extraer clorofilas de los complejos pigmento – proteínas (Satoh y col., 1998).

La etapa 2 en la degradación de clorofilas de acuerdo al modelo propuesto previamente, es catalizada por la enzima Mg- dequelatasa (MDS). A diferencia de clorofilasa, se conoce muy poco de la actividad MDS ya que los trabajos publicados son escasos y los resultados son contradictorios y muchas veces sorprendentes. Se analizará particularmente esta enzima en el capítulo II de la tesis.

La etapa 3 es catalizada por la enzima feofórbido a oxigenasa cuya actividad se ha detectado sólo en gerontoplastos, encontrándose asociada a la membrana de la organela. Se trata de una monooxigenasa que contiene Fe en su estructura, que requiere O₂ como sustrato y que es dependiente de ferredoxina reducida (Ginsburg y col., 1994; Hörtensteiner y col., 1995). Se ha demostrado que para la acción de la enzima se requiere además de los cofactores: NADPH, glucosa 6-P, y glucosa 6-P deshidrogenasa para mantener reducida a la Ferredoxina (Hörtensteiner y col., 1995). Otra característica de esta enzima es que posee especificidad de sustrato, se ha demostrado que feofórbido b actuaría como un inhibidor competitivo (Hörtensteiner y col., 1995). La actividad de la enzima requiere la presencia de una proteína de estroma soluble, cuya función no está clara todavía pero se sabe que es una reductasa dependiente de NADPH responsable de la reducción de los dobles enlaces conjugados del anillo tetrapirrólico y se denomina RCC reductasa. La actividad de esta enzima se ha detectado sólo en hojas senescentes a diferencia de las otras enzimas (clorofilasa y MDS) que se han detectado en hojas senescentes y no senescentes (Ginsburg y col., 1994; Hörtensteiner y col., 1995), por lo que se había propuesto como un paso clave en la regulación de la degradación de clorofilas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la supresión de la actividad del gen que codifica para la feofórbido a oxigenasa lleva a una acumulación de feofórbido y no a una disminución de la velocidad de degradación de clorofilas (Tanaka y col., 2003). Los autores proponen que como el primer paso irreversible de este modelo de degradación es la eliminación del Mg⁺² sería posiblemente éste el paso más importante de regulación.

Todos los catabolitos de degradación de clorofila que han sido aislados en la naturaleza derivan de clorofila a (Curty y col., 1996; Ginsburg y Matile 1993), es por ello que de acuerdo al modelo que propone Matile las clorofilas b y los clorofilidos b se transforman

en sus respectivos derivados a por medio de la acción de la clorofila b reductasa (Ito y col., 1996).

Además del mecanismo de degradación propuesto por Matile, se han propuesto otras enzimas oxidativas que podrían participar del blanqueo de clorofilas, actuando directamente sobre el anillo tetrapirrólico. Se ha demostrado que la enzima peroxidasa cataliza la oxidación de clorofilas por el H_2O_2 in vitro y que requiere la presencia de monofenoles para su acción (Huff, 1982; Yamahuchi y col., 1997; Yamahuchi y col., 1999; Martínez y col, 2001; Funamoto y col.,2002).

Compartimentalización celular de la degradación de clorofilas

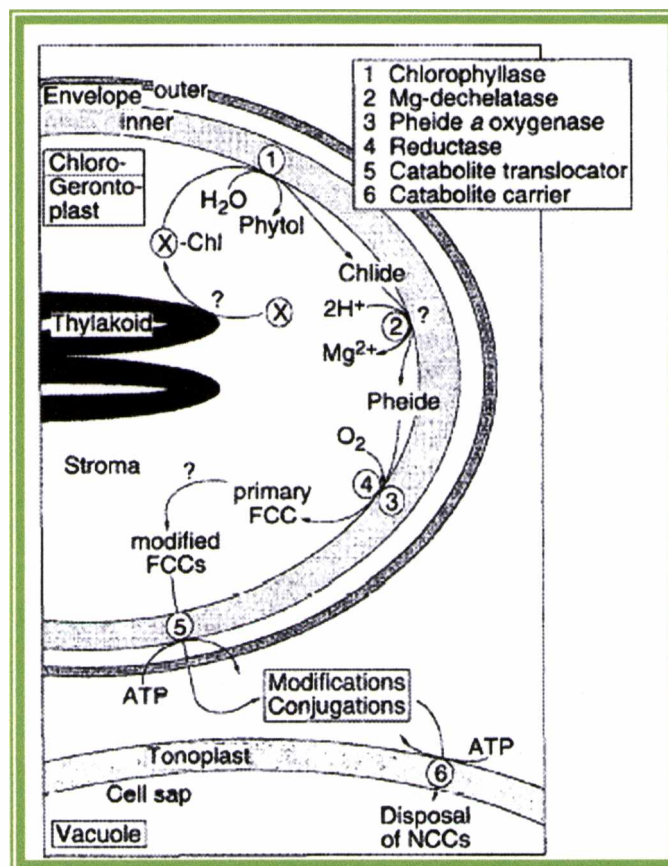
Según el modelo de Matile la degradación de clorofilas comienza en el cloroplasto, no se sabe cual es la señal que da inicio al proceso pero es claro que se necesita la desorganización de la estructura del cloroplasto para que actúe Clasa y a continuación MDS y Feofórbido a oxigenasa. Las tres enzimas tienen ubicación en el cloroplasto, por lo tanto la conversión de clorofilas en FCC ocurre dentro de esta organela. Los FCC salen del cloroplasto, proceso que requiere gasto de ATP (Hinder y col., 1996) y completan la degradación en vacuolas.

Durante la degradación de clorofilas se generan gran cantidad de plastoglóbulos que contienen acetil-esteres de fitol (Bortlik, 1990).

Ubicación espacial de la degradación de clorofilas en cloroplastos senescentes.

Figura tomada de Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol., 1999. (Matile, Hörtensteiner y Thomas)

- 1 Clorofilasa
- 2 Mg-dequelatasa
- 3 Feofórbido a oxigenasa
- 4 RCC Reductasa
- 5 y 6 Transportadores a través de membrana.



Un modelo alternativo de la compartimentalización de la degradación de clorofilas fue propuesto por Takamiya y col. (2000). Estos autores, basándose en la existencia de clorofilasas de ubicación extra-cloroplástica, tal como lo revelan los genes clonados de *Arabidopsis*, (AtCLH2) y de citrus (CHLASE 1), proponen que moléculas intactas de clorofilas abandonan los cloroplastos dentro de los plastoglobulos y toman contacto con clorofilasas que se ubican en otros plástidos celulares, posiblemente en vacuolas, y allí ocurriría la degradación de clorofilas a través del mismo mecanismo propuesto por Matile. Estudios citológicos de gerontoplastos de soja han revelado que durante la senescencia gran número de plastoglobulos que contienen clorofilas intactas o derivados fitilados de clorofilas abandonan los cloroplastos a través de la membrana hacia el citosol (Guamet y col., 1999). Los plastoglobulos tendrían como destino final las vacuolas.

III- Brócoli



III-1- Origen

El brócoli es una hortaliza originaria de Asia Occidental y de la región mediterránea de Europa (desde Grecia hasta Siria). Su nombre deriva de la expresión italiana *brocco*, que quiere decir brazo con ramas, siendo *broccolo* el diminutivo de esa palabra y brócoli el plural. Los romanos ya cultivaban esta planta, pero hace aproximadamente unos 20 años que su cultivo y consumo comenzaron a difundirse en diferentes países (www.vric.ucdavis.edu/veginfo/comodity/broccoli, 2003).

III-2- Consumo y producción

El principal país productor y consumidor de brócoli actualmente es Estados Unidos (www.agrocadenas.gov.co/home.htm, anónimo, 2004).

El consumo de brócoli en Argentina expresado como kilogramo de hortaliza por persona y por año fue de aproximadamente 0,05 en el año 1997 (Baron y col, 2001). Este valor a aumentado en los últimos años pero de todos modos sigue siendo bajo, quizás por razones de hábito alimentario, falta de difusión y poco conocimiento de sus cualidades nutricionales. En Estados Unidos el consumo de brócoli fresco por persona es de aproximadamente 2,8 kilogramos al año (durante el año 2000), tres veces mayor que en la década de los 80 (www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/brocoli.htm, 2003).

La producción y el comercio mundial de brócoli han aumentado a lo largo de las dos últimas décadas, impulsados posiblemente por dos características de esta hortaliza : su alto valor nutricional y su capacidad de prevenir enfermedades. Estas características sumadas a la tendencia actual de comer sano, han dado como resultado un mayor consumo de brócoli a nivel mundial.

En latinoamérica los países que se perfilan como importantes productores y proveedores de este producto son México, Guatemala y Ecuador. Estos países exportan grandes cantidades de este producto a Estados Unidos y la Unión Europea.

Por otra parte los países del Mediterráneo también abastecen a Europa (www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/brocoli.htm, anónimo, 2003).

En Argentina, el 99 % de brócoli que ingresa al Mercado Central de Buenos Aires proviene de la Provincia de Buenos Aires. Los mayores ingresos corresponden al período que comprende desde Abril hasta Agosto (Baron y col., 2001).

III-3- Taxonomía y morfología

El brócoli pertenece a la familia de las Crucíferas (*Cruciferae*) y su nombre botánico es *Brassica oleracea* L., var. *italica* Plenck. Es una planta de hojas grandes pero más estrechas y más erguidas comparadas con otras de la familia (por ejemplo coliflor), con peciolo generalmente desnudos, con los bordes más ondulados y nervaduras más marcadas y blancas. La superficie foliar está



cubierta por ceras epicuticulares que son responsables del escurrimiento del agua al mojarlas y del color verde azulado y opaco característico de estas hojas. El tallo principal de la planta termina en una malla globulosa de yemas hipertrofiadas. Las inflorescencias hipertrofiadas son de color verde, con un grado de compactación menor que en el caso de coliflor y además son inflorescencias de menor tamaño y superficie más granulada (Bianco, 1990; www.sica.gov.ec/agronegocios/productosparainvertir/hortalizas/brocoli/corpei.pdf, anónimo, 2004). Las unidades elementales de las inflorescencias son fisiológica y morfológicamente estadios preflorales.

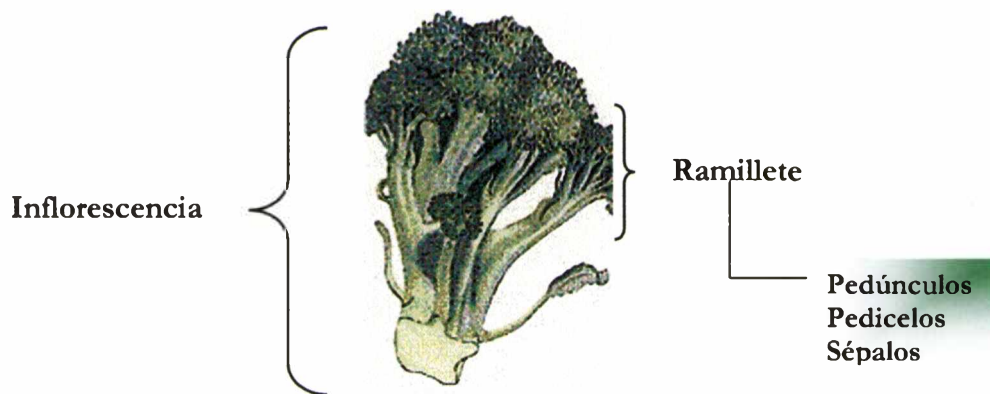
Otra característica importante de esta planta es la posible aparición de brotes laterales a diferencia de lo que ocurre en coliflor. La raíz de la planta es pivotante con raíces secundarias y superficiales. Las flores del brócoli son pequeñas, en forma de cruz de color amarillo y el fruto es una silicua cilíndrica de valvas ligeramente convexas con un solo nervio longitudinal. Produce abundantes semillas redondas y de color rosáceo.

Brassica oleracea : variedades botánicas y sus nombres vulgares

<i>Brassica oleracea L. var.acephala dc.</i>	<i>Col crespá</i>
<i>Brassica oleracea L. var.botrytis L.</i>	<i>Coliflor</i>
<i>Brassica oleracea L. var.capitata L.</i>	<i>Repollo</i>
<i>Brassica oleracea L. var.cemmifera zenker</i>	<i>Repollito de Bruselas</i>
<i>Brassica oleracea L. var.gongylodes L.</i>	<i>Colirábano</i>
<i>Brassica oleracea L. var.itálica plenk</i>	<i>Brócoli</i>

Esquema de la inflorescencia de brócoli

Inflorescencia desarrollada en el extremo del tallo central: Cabeza central



III-4- Generalidades del cultivo de brócoli

Fases de cultivo

Durante el desarrollo de brócoli podemos considerar las siguientes fases:

- 1- Crecimiento: la planta desarrolla solamente hojas.
- 2- Inducción floral: después de haber pasado un número determinado de días con temperaturas bajas la planta inicia la formación de la flor; al mismo tiempo que está ocurriendo esto, la planta sigue brotando hojas de tamaño más pequeño que en la fase de crecimiento.
- 3- Formación de inflorescencias: la planta en la yema terminal desarrolla una inflorescencia y, al mismo tiempo, en las yemas axilares de las hojas está ocurriendo la fase de inducción

floral con la formación de nuevas inflorescencias, que serán bastante más pequeñas que la principal (brotes laterales).

4- Floración: los tallos que sustentan las partes de la pella inician un crecimiento en longitud, con apertura de las flores.

5- Fructificación: se forman los frutos (silicuas) y semillas.

(infoagro.com, 2004).

Condiciones de suelo y clima adecuados

Es un cultivo cuyo desarrollo adecuado se produce durante otoño e invierno. Para el desarrollo normal de la planta es necesario clima frío y húmedo, la temperatura óptima promedio está entre los 12 y 16° C, con mínimas promedio de 5° C. Para iniciar la fase de inducción floral necesita entre 10 y 15°C durante varias horas del día. Las temperaturas extremas resultan perjudiciales para el cultivo ya que por un lado temperaturas por encima de 20° C causan inflorescencias heterogéneas y menos compactas, siendo estos factores determinantes de la calidad de esta hortaliza. Por otra parte temperaturas cercanas a 0°C detienen el crecimiento de la planta. En zonas donde las temperaturas bajan excesivamente, se cultivan variedades tardías, de recolección a finales de invierno o principios de primavera. La humedad relativa óptima oscila entre 60 y 75% (www.abcagro.com/hortalizas/brocoli2.asp, anónimo, 2004).

Como todas las crucíferas prefiere suelos con tendencia a la acidez y no a la alcalinidad, el pH entre 6,5 y 7. Requiere suelos de textura media. El cultivo es sensible a la salinidad excesiva del suelo y al exceso de riego, requiere además un alto nivel de materia orgánica. En cuanto a minerales, el cultivo es muy exigente en K y B, y en suelos en los que el Mg es escaso conviene hacer aporte de este elemento (Lazcano-Ferrat, 1996).

Variedades

Existe gran diversidad de brócolis, tanto variedades como híbridos, los que se diferencian básicamente por el período de tiempo que transcurre desde la plantación hasta la cosecha. Existen ejemplares tempranos, cuyos ciclos necesitan 45 días, y tardíos, cuyos ciclos duran 150 días. Entre los dos extremos encontramos ciclos intermedios que dependen no sólo del ejemplar sino también de la época del año en que se cultivan (Krarup y Alvarez, 1997).

Teniendo en cuenta el ciclo de formación de la inflorescencia desde siembra a madurez, se dividen las variedades en tempranas, de media estación y tardías (Seymour, 1995).

De acuerdo al calendario europeo, las variedades tempranas se siembran a finales de junio, en clima continental y se recolectan durante los meses de octubre, noviembre y diciembre. Las de media estación se siembran en la misma fecha y se recolectan en enero y febrero. Las variedades tardías se cosechan durante los meses de marzo, abril y mayo.

De acuerdo al clima de nuestra zona, las variedades se siembran en Marzo y se cosechan en Mayo y Junio, las variedades tempranas, las de media estación en Julio y Agosto, mientras que las tardías se cosechan durante Octubre y Noviembre (Paulino, comunicación personal).

Los principales materiales que cultivan los productores de la zona de La Plata (Prov. Buenos Aires) son:

De Cicco (45 días)

Pinnacle (60-80 días)

Shogun (120 días)

Marathon (115 días)

Packman (60-75 días)

Emperor (90 días)

Nota: las variedades que figuran en negrita corresponden a aquellas variedades que cultivan los productores de la zona de La Plata con los que hemos trabajado.

Cosecha

Para el consumo de brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras, por lo tanto el proceso fisiológico que se desarrolla durante la postcosecha de brócoli será senescencia.

La recolección de las inflorescencias comienza cuando la longitud del tallo alcanza 5 ó 6 cm, posteriormente se van recolectando a medida que se van produciendo los rebrotes de inflorescencias laterales. Se recomienda cosechar las cabezas de brócoli con algunas de las hojas que las rodean para que queden protegidas. La cosecha se realiza a mano y la selección de las cabezas la realiza el cosechador. La recolección se debe realizar en las primeras horas de la mañana, para evitar la deshidratación y luego de la cosecha se deben mantener en condiciones de alta humedad y bajas temperaturas ya que se trata de una hortaliza con alta velocidad de respiración lo que reduce su vida útil. Es muy conveniente

el uso de algún sistema de preenfriado para este producto (Toivonen, 1997) sin embargo en nuestro país esta práctica no es de uso general. En otros países se utiliza hidrogenofriado o directamente hielo para realizar un rápido enfriamiento antes de almacenar a la temperatura adecuada.

Una cabeza central de brócoli de buena calidad debe tener las inflorescencias cerradas y de color verde oscuro (grisáceo o azulado) brillante, debe ser compacta (firme a la presión de la mano) y el tallo bien cortado y de la longitud requerida. La cabeza principal puede llegar a medir en promedio 10 cm de diámetro, y pesar 300 g, mientras que los brotes laterales llegan a 2,5-3 cm de diámetro y 30 g de peso.

Las producciones varían según la variedad pero pueden estimarse rendimientos normales entre 15.000 y 25.000 kg/ha.

(www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/brocoli.htm, anónimo, 2004).

III-5- Valor nutritivo

El brócoli ha sido clasificado como la hortaliza de mayor valor nutritivo por gramo de tejido para consumo. La calidad nutricional de esta hortaliza está dada por varios componentes (ver tabla de valor nutricional de brócoli). Es muy rico en fibras, 1.67 mg cada 100 g de tejido comestible, es una fuente importante de vitaminas A y C. Una porción de inflorescencias de brócoli de aproximadamente 155 g proporciona el 68 % de las necesidades diarias de vitamina A y más de dos veces los requerimientos diarios de ácido ascórbico (vitamina C) para un adulto. Es además una fuente rica de minerales (hierro y potasio), y aporta muy pocas calorías (26 calorías cada 100 g) (www.puc.cl/sw-educ/hort0498/HTML/p160.html, 2004).

Desde el punto de vista nutricional el brócoli se destaca al igual que el resto de las crucíferas por su alto contenido de antioxidantes y glucosinolatos, por lo que se considera a esta hortaliza como un alimento funcional. Los glucosinolatos están formados por una molécula de glucosa unida a un derivado de amino ácidos azufrados, estos compuestos tienen la propiedad de ser anticancerígenos, por lo que se los considera componentes bioactivos (Jeferry y col, 2000). Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo de crucíferas disminuye el riesgo de cáncer por su alto contenido de antioxidantes y glucosinolatos. En brócoli el antioxidante más abundante es el ácido ascórbico (aproximadamente 100 mg/g), y el glucosinalato más importante es glucorafanina

(aproximadamente 20 $\mu\text{mol/g}$). Las crucíferas poseen la enzima Mirosinasa que hidroliza a los glucosinolatos para dar glucosa y el compuesto azufrado que posee la característica de ser bioactivo. En el caso de glucorafanina el compuesto activo que se origina es isotiocianato (Jefery y col, 2000).

Valor nutricional del brócoli por 100 g de producto comestible	
Proteínas (g)	5.45
Lípidos (g)	0.3
Glúcidos (g)	4.86
Vitamina A (U.I.)	3.500
Vitamina B ₁ (mg)	100
Vitamina B ₂ (mg)	210
Vitamina C (mg)	118
Calcio (mg)	130
Fósforo (mg)	76
Hierro (mg)	1.3
Calorías (cal)	42-32

Adaptado de Gebhardt y Matthews, 1988.

III-6- Características postcosecha de brócoli

Tasa de Respiración y de producción de etileno

Las cabezas de brócoli tienen tasas de respiración relativamente altas:

Temperatura	/ 0°C (32°F)	/ 5°C (41°F)	/ 10°C (50°F)	/ 15°C (59°F)	/ 20°C (68°F)
mL CO ₂ /kg·h	/ 10-11	/ 16-18	/ 38-43	/ 80-90	/ 140-160

La tasa de respiración de los ramilletes es ligeramente superior al doble de la tasa de respiración de las cabezas intactas por unidad de peso. La tasa de producción de etileno de brócoli es muy baja, 0,1 $\mu\text{L/kg}\cdot\text{h}$ a 20°C.

(www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html, Cantwell y Suslow, 2002).

Sensibilidad al Etileno

El brócoli es extremadamente sensible al etileno presente en el ambiente postcosecha. Como se ha mencionado anteriormente es una hormona aceleradora de la

senescencia y justamente es éste el proceso fisiológico que se produce durante la postcosecha de brócoli. El amarillamiento de las inflorescencias es el síntoma más evidente del contacto con etileno. El contacto con 2 ppm de etileno a 10°C reduce la vida de anaquel en 50%, por lo tanto es muy importante considerar la sensibilidad al etileno durante el manejo postcosecha de este producto. (www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html. Cantwell y Suslow, 2002).

Fisiopatías (desórdenes fisiológicos)

Tallo hueco: Se forma una cavidad en la parte central del tallo de la base de la inflorescencia. La superficie de corte en el pedúnculo tiende a volverse parda. El desarrollo de esta fisiopatía depende del cultivar y de las condiciones durante la producción, no se conoce cual es la causa.

Amarillamiento de las inflorescencias: El amarillamiento de las inflorescencias puede deberse a sobremadurez en el momento de la cosecha, temperaturas altas de almacenamiento y/o contacto con etileno. En todos estos casos la causa fisiológica es la senescencia de las inflorescencias (Cantwell y Suslow, 2002). El amarillamiento por senescencia es diferente al color verde-amarillento que presentan las áreas de tejidos que no estuvieron expuestas a la luz durante el crecimiento, algunas veces llamado "amarillamiento marginal".

Pardeamiento de los florets: Es una fisiopatía en la que ciertas áreas del tejido no se desarrollan correctamente, mueren y se tornan pardas. Posiblemente la causa de esta alteración sería un déficit nutricional de la planta

(www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html. Cantwell y Suslow, 2002).

Daño Físico

El manejo descuidado durante la cosecha puede causar daño en las inflorescencias e incrementar las pudriciones, por lo tanto se debe cosechar con cuidado, manualmente y colocar en cajones con mucho cuidado y buena ventilación. Se aconseja cosecha algunas hojas junto con las cabezas centrales de brócoli ya que actuarían como protección

(www.mercanet.cnp.go.cr/Calidad/Poscosecha/Investigaciones/Hort%C3%.../Brocoli.ht, Saborío-Argüello, 2002).

Enfermedades

Pudrición Bacteriana: Hay varias bacterias causantes de pudriciones blandas (Erwinia, Pseudomonas) que pueden reducir la vida postcosecha de brócoli. Generalmente, las pudriciones debidas a estos microorganismos se asocian con daño físico.

Enfermedades causadas por hongos: Aunque no tan comunes como las pudriciones bacterianas, las pudriciones por moho gris (gray mold, Botrytis cinerea) y moho negro (black mold, Alternaria spp.) pueden infectar las cabezas de brócoli cuando durante su crecimiento se presentan condiciones lluviosas o muy frías.

De todos modos generalmente el desarrollo de estas enfermedades durante la postcosecha son posteriores al amarillamiento de las inflorescencias (www.postharvest.uvdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html. Cantwell y Trevor, 2002).

Consideraciones especiales

La vida de almacenamiento varía considerablemente entre cultivares de brócoli. La vida útil (amarillamiento de las inflorescencias) puede variar de 12 a >25 días dependiendo de la variedad. Se clasifican en tres categorías de acuerdo al tiempo de vida útil almacenados a 5°C y 95% HR:

Corta (<20 días): Baccus, Brigadier, Cruiser, **De Cicco**, Mariner, Zeus ; **Media (20 a 25 días):** Embassy, Emperor, Galaxy, Gem, Green Lady, Green Valiant, **Pinnacle** y **Larga (>25 días):** Greenbelt, **Marathon**, Packman, Pirate, , **Shogun**, Skiff

Nota: las variedades que figuran en negrita corresponden a aquellas variedades que cultivan los productores de la zona de La Plata con los que hemos trabajado.

III-7- Manejo postcosecha de brócoli

Temperatura y Humedad Relativa

La refrigeración es extremadamente importante para lograr mantener el producto con mejor calidad durante más tiempo de almacenamiento. Se requiere una temperatura de 0°C y una HR >95% para optimizar la vida de almacenamiento (21-28 días). Cuando se almacena brócoli a 5°C puede alcanzar una vida útil de 14 días, pero si se almacena a 10° C será sólo 5 días (www.postharvest.uvdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html. Cantwell y Suslow, 2002).

Generalmente, se recomienda el enfriamiento rápido inmediatamente después de la cosecha con el fin de disminuir el “calor de campo”, antes del almacenamiento a la temperatura adecuada (Toivonen, 1996). Para el enfriamiento se utilizan las técnicas de hidrogenfriado (mezcla hielo-agua) y enfriamiento con aire forzado, sin embargo estas prácticas no se realizan en nuestro país, donde generalmente el producto se cosecha, se envía al mercado y se trata de comercializar en el transcurso de 2 o 3 días.

El manejo de la temperatura durante la distribución y comercialización del producto es lo más crítico para evitar la pérdida de calidad de brócoli.

Daño por Congelación

Puede ocurrir si se agrega sal a la mezcla hielo-agua o cuando el brócoli sin hielo se almacena a una temperatura inferior a -1°C . Las áreas dañadas (congeladas y después descongeladas) resultan de color verde oscuro y apariencia translúcida, pudiendo tornarse pardas y volverse muy susceptibles a la pudrición bacteriana

(www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html. Cantwell y Suslow, 2002).

Efecto de las Atmósferas Controladas (AC)

Las tecnologías postcosecha que se aplican a brócoli apuntan a retrasar el amarillamiento de las inflorescencias ya que este es principal problema que lleva a perder la calidad del producto. Por ejemplo, se puede aumentar el tiempo de almacenamiento utilizando atmósferas conteniendo 1-2 % O_2 con 5-10 % CO_2 en un intervalo de temperatura de $0-5^{\circ}\text{C}$ (Cantwell y Suslow, 2002). Se ha demostrado que a muy bajas concentraciones de O_2 (1-2 %) se generan compuestos volátiles azufrados de olor desagradable (Ballantyne y col., 1988). Las atmósferas muy pobres en O_2 (0.5 %) promueven la generación de muchos compuestos azufrados y no azufrados, que causan olores desagradables: metanetiol, etanol, etilacetato y metiltiocianato (Hansen y col., 1992). La mayoría de las películas diseñadas para ser utilizadas como atmósfera modificada (MAP) en brócoli están diseñadas para mantener tanto el O_2 como el CO_2 a concentraciones cercanas a 10% para evitar el desarrollo de estos volátiles de olores indeseables.

Objetivos



Objetivo general de la tesis:

Estudiar la degradación de clorofilas durante la senescencia postcosecha de brócoli y aplicar tratamientos físicos para retrasar dicho proceso.

Objetivos específicos:

- I.** Estudiar la degradación de clorofilas y la modificación de otros parámetros durante la senescencia postcosecha de brócoli.

CAPÍTULO I

- II.** Avanzar en el conocimiento de una de las enzimas que participa en el mecanismo de degradación de clorofilas y que hasta el momento ha sido poco estudiada: actividad MDS.

CAPÍTULO II

- III.** Estudiar el efecto sobre algunas de las enzimas que degradan clorofilas, del tratamiento con las hormonas que regulan la senescencia (etileno y citoquininas) durante la postcosecha de brócoli.

CAPÍTULO III

- IV.** Utilizar los tratamientos térmicos de alta temperatura como una estrategia para retrasar la degradación de clorofilas durante la postcosecha de brócoli y analizar que efecto tienen sobre las enzimas que degradan clorofilas y sobre otros parámetros de senescencia.

CAPÍTULO IV

- V.** Utilizar los tratamientos con luz UV-C como una estrategia para retrasar la degradación de clorofilas durante la postcosecha de brócoli y analizar que efecto tienen sobre las enzimas que degradan clorofilas y sobre otros parámetros de senescencia.

CAPÍTULO V

Capítulo I

Caracterización de la senescencia
postcosecha de brócoli, var. De Cicco



I.1- INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito previamente, durante la senescencia de plantas se produce una serie de eventos complejos y altamente regulados que incluyen disminución de la actividad fotosintética, desorganización de cloroplastos, degradación de clorofilas y macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y movilización de nutrientes hacia otras partes de la planta (Buchanan-Wollaston y col., 1997). En los últimos años mediante la utilización de técnicas de biología molecular, se han obtenido avances importantes en el conocimiento de senescencia en hojas. Se han identificado muchos genes que aumentan su expresión durante este proceso a los que se denomina SAG (genes activados en senescencia). La caracterización de estos genes ha sido muy útil para comprender procesos metabólicos asociados a la senescencia (Buchanan- Wollaston y col., 2003).

Muchos de los cambios que se observan durante la senescencia postcosecha de tejidos inmaduros son similares a aquellos que se producen durante la senescencia de hojas. Los vegetales que se cosechan inmaduros, sufren un severo estrés ya que drásticamente pierden los aportes de energía, nutrientes, minerales, y hormonas. Esto desencadena rápidamente el proceso de senescencia, por lo que el tiempo de vida postcosecha para estos vegetales es muy corto (King y Morris, 1994).

Para el consumo de brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras las cuales sufren una senescencia acelerada, lo que determina que el producto sea altamente perecedero con una vida útil de sólo 3 a 4 semanas almacenados en aire y a 0° C ó de aproximadamente 3 a 4 días almacenados en aire a 20° C (King y Morris, 1994).

Se han caracterizado los cambios tempranos que se producen durante la postcosecha de brócoli. Dentro de las 12 h después de la cosecha se producen grandes pérdidas de azúcares, ácidos orgánicos y proteínas. Aumenta el pool de amino ácidos libres, especialmente asparagina y glutamina, y se acumula amonio en las inflorescencias (King y Morris, 1994). Durante el almacenamiento a 20° C se produce una disminución del contenido de ácidos grasos y un aumento de la peroxidación de lípidos que se correlacionan con el deterioro que se produce durante la postcosecha (Zhuang y col., 1997). El síntoma más evidente de senescencia postcosecha de brócoli es sin dudas, la pérdida de color verde de las inflorescencias (Clarke y col., 1994).

Se ha demostrado que luego de dos horas de la cosecha se expresan genes asociados a senescencia (Pogson y col., 1995; Downs y Somerfield, 1997). En el año 2001, Page y col.

publicaron una caracterización molecular y bioquímica de la senescencia postcosecha de brócoli de la variedad Maraton. En ese trabajo se estudió el patrón de expresión de genes que acompaña a la senescencia postcosecha de las inflorescencias. Se han identificado muchos genes que aumentan su expresión durante este período y a muchos de ellos se les ha asignado una función determinada, ya sea porque son genes identificados y caracterizados o bien por comparación de la secuencia con el genoma de *Arabidopsis*. Las modificaciones en el patrón de expresión de genes son tempranas y se detectan antes que algún síntoma de deterioro sea evidente (Page y col., 2001).

Genes identificados que aumentan su expresión durante la senescencia postcosecha de brócoli

LSC54, gen que codifica para una metalotioneína (Buchanon-Wollaston, 1994), aumenta la expresión luego de 2 días de almacenamiento a 20° C.

LSC650, gen que codifica para una catalasa (Buchanon-Wollaston 1997), aumenta la expresión dos días después de la cosecha y alcanza un máximo a los 4-5 días.

LSC7, gen que codifica para una cisteína proteasa (Buchanan-Wollaston 1997), aumenta la expresión hasta el día 3 y luego disminuye.

LSC30, gen que codifica para ferritina; LSC790, gen que codifica para cisteína proteasa; LSC460, gen que codifica para glutamina sintetasa; LSC222, gen que codifica para quitinasa; LSC213, gen que codifica para piruvato ortofosfato diquinasa. Todos estos genes aumentan la expresión 1 día después de la cosecha .

Genes identificados que comienzan a expresarse durante la senescencia postcosecha de brócoli

LSC807, gen que codifica para aspártico proteasa (Buchanan-Wollaston y Ainsworth, 1997).

LSC803, gen que codifica para una peroxidada (fosfolípido hidroperóxido dependiente de glutatión) que protege contra estrés oxidativo.

LSC833, gen que codifica para una cisteína proteasa vacuolar similar a SAG23 de *Arabidopsis* (Quirino y col, 1999) y a See2 de maíz (Smart y col., 1995). Esta enzima activa a las enzimas hidrolíticas almacenadas en vacuolas. En el año 2003, Coupe y col.,

identificaron cisteínas proteasas que responden a la deshidratación, durante la senescencia postcosecha de brócoli.

Otro gen característico de senescencia que aumenta su expresión en brócoli durante el almacenamiento a 20° C es SAG12, gen que fue identificado inicialmente en *Arabidopsis* y que codifica para una cisteína proteasa específica de tejidos amarillos (Noh y Amasino 1999). Este gen se induce más tarde que los LSC, ya que durante la senescencia se detecta luego de 4 días de almacenamiento cuando los síntomas de amarillamiento son evidentes (Page y col., 2001), mientras que la mayoría de los LSC se detectan dentro de los 3 días luego de la cosecha.

Cambios bioquímicos durante la senescencia postcosecha de brócoli

Los cambios bioquímicos y fisiológicos que se producen durante la senescencia postcosecha de brócoli (variedad Maraton) han sido bien caracterizados (Page y col., 2001).

Se observan:

1. Modificaciones en el metabolismo de lípidos
2. Modificaciones en el metabolismo de proteínas
3. Degradación de clorofilas (modificación del color)
4. Disminución del contenido de ácido ascórbico (Barth y Zhuang 1996; Nishikawa y col.2003)

I.2- OBJETIVO

“Caracterizar la senescencia postcosecha de Brócoli, cabeza central (variedad De Cicco).”

Actividades propuestas para cumplir este objetivo:

A) Almacenar brócoli recién cosechado a 20° C para observar el desarrollo de la senescencia, y realizar la medida de color superficial.

B) Analizar la degradación de clorofilas durante la senescencia postcosecha de brócoli, a través de la medida del contenido de pigmentos y de la actividad de algunas enzimas que intervienen en su catabolismo (Clorofilasa, Mg-dequelatasa y Peroxidasas).

C) Analizar cómo varían otros parámetros que se relacionan con el proceso de senescencia:

Proteínas

Lípidos

Antioxidantes

I.3- MATERIALES Y MÉTODOS

I.3-1 Material vegetal

Se trabajó con cabeza central de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. italica, cv De Cicco) cultivadas a campo en la zona de Arana, La Plata, Provincia de Buenos Aires. Inmediatamente después de la cosecha las muestras fueron llevadas al laboratorio para ser utilizadas en las experiencias. Se colocaron las muestras en bandejas de plástico (dos cabezas por bandeja), se cubrieron con PVC y se almacenaron a 20° C durante 4 días. Se analizaron las muestras luego de 0, 1, 2, 3 y 4 días de almacenamiento.

I.3-2 Medida del color superficial

Para la medida del color superficial se utilizaron los parámetros L*, a*, y b* los que se obtuvieron mediante un colorímetro (Minolta CR300, Osaka, Japón). Se calculó el valor del ángulo hue (h°). Para cada tiempo de almacenamiento se realizaron las medidas sobre 50 cabezas de brócoli y en cada cabeza se midieron 3 posiciones diferentes.

I.3-3 Medida del contenido de clorofilas y feofitinas

Se trituraron inflorescencias de brócoli congeladas utilizando un molinillo y aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido fueron colocados en 5 ml de acetona, se agitaron para favorecer la extracción de los pigmentos y se centrifugaron a 6000xg durante 15 min. El sobrenadante fue utilizado para determinar el contenido de clorofilas por espectrofotometría según el método de Lichtenthaler (1987). Los valores se expresaron como µg de pigmento por g de tejido.

Para la medida del contenido de feofitinas (Pheo) se utilizó el extracto de clorofilas obtenido. Todas las clorofilas presentes en el extracto fueron transformadas en Pheo mediante el agregado de una gota de HCl 25% v/v cada 5 ml de sobrenadante. La cantidad de Pheo iniciales se obtuvo por diferencia entre la cantidad de feofitinas obtenidas luego de agregar el ácido y la cantidad de clorofilas iniciales de cada extracto, de acuerdo al método de Lichtenthaler (1987). Para cada tiempo de almacenamiento se prepararon dos extractos y las medidas se realizaron por duplicado. Los valores se expresaron como µg de feofitinas por g de tejido

I.3-4 Preparación del extracto enzimático

Aproximadamente 3 g de tejido congelado fue homogeneizado en un Omnimixer a máxima velocidad durante 3 minutos a 4°C en presencia de 20 ml de buffer de extracción de la siguiente composición: $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}/\text{NaPO}_4\text{H}_2$ 0,1 M, pH 6, Triton X-100 0,1% v/v, PVPP 1% p/v, cisteína 1 mM. El homogenato se agitó durante 1 hora a 4°C y luego se centrifugó a 10000xg durante 20 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante se filtró por vacío a través de papel. El extracto así obtenido se centrifugó a 14000xg y se utilizó para realizar las medidas de actividad. Se prepararon dos homogenatos para cada muestra y las medidas de actividad se realizaron por duplicado en cada homogenato.

I.3-5 Preparación de los sustratos de las enzimas

Aproximadamente 6 g de hojas de acelga (*Beta vulgaris var. cicla* L.) se homogeneizaron con 60 ml de una mezcla acetona/agua (80/20) en Omnimixer. La suspensión obtenida se filtró a través de papel utilizando vacío. Al filtrado se le adicionaron 40 ml de éter de petróleo para extraer las clorofilas.

Para obtener las clorofilas que se usaron como sustrato de clorofilasa y peroxidasa, se eliminó el éter de petróleo por evaporación con N_2 y las clorofilas se disolvieron en acetona.

Para obtener la clorofilina, sustrato de Magnesio dequelatasa (MDS), la fase etérea se trató con KOH 30% p/v en metanol, se dejó precipitando en oscuridad por 4 horas y se centrifugó a 10000xg. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado de clorofilina se disolvió en tricina 1 M, pH 9. Ambos sustratos se conservaron a -20°C.

I.3-6 Medida de la actividad clorofilasa

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo: buffer $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}/\text{NaPO}_4\text{H}_2$ 0.1 M pH 7, Triton X-100 0,15% v/v, clorofilas aproximadamente 10 mM de modo de lograr una DO inicial a 663 nm de 0,45 y acetona 16% v/v, siendo el volumen final de la mezcla de reacción de 13 ml. A esta mezcla se agregaron 2 ml del extracto enzimático preparado de acuerdo a I.3-4 y se incubó a 40°C. Luego de 0, 1, 2, 4, 8 y 18 horas se tomó 1 ml de la mezcla de reacción y se agregó sobre 3 ml de una mezcla hexano/acetona (70/30) previamente enfriada a 0°C. Se agitó vigorosamente hasta la formación de una emulsión y finalmente se centrifugó a 9000xg durante 10 min a 4°C para separar las fases. Se midió espectrofotométricamente a 663 nm la desaparición de clorofila en la fase superior y la aparición de clorofilidos en la fase inferior. Las mezclas de reacción se mantuvieron

durante la medida al resguardo de la luz. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de aparición de clorofilo en la fase acuosa por gramo de tejido: $\delta A_{663\text{ nm}}, \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

I.3-7 Medida de la actividad Mg-dequelatasa (MDS)

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por buffer Tris/tricina 0,1 M pH 9, 50 μl clorofilina ($\text{DO}_{687\text{ nm}} = 0,3$), 150 μl extracto enzimático preparado de acuerdo a I.3-4 en un volumen final de 500 μl . Se incubó a 37°C determinándose la producción del derivado sin Mg^{+2} de la clorofilina mediante la medida de la absorbancia a 687 nm durante 10 min. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de formación de feoforbido por gramo de tejido: $\delta A_{687\text{ nm}}, \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

I.3-8 Medida de la actividad peroxidasa

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por buffer $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}/\text{NaPO}_4\text{H}_2$ 0,2 M, pH 5, tritón X-100 0,2 % v/v, ácido p-cumárico 5 mM, H_2O_2 60 mM, 25 μl de extracto enzimático preparado de acuerdo a I.3-4 y 10 μl de clorofila (de modo que la $\text{DO}_{648\text{ nm}}$ inicial sea cercana a 0,8). Se midió el descenso de DO a 648 nm, lo que indica la disminución de clorofilas. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de desaparición de clorofilas por gramo de tejido: $\delta A_{659\text{ nm}}, \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

I.3-9 Medida del contenido de proteínas totales

Se trituraron ramilletes de brócoli congelados con un molinillo y aproximadamente 0.2 g del polvo resultante fueron homogeneizados con 10 ml de NaOH 0,1 M y dodecyl sulfato de sodio (SDS) 1 % (p/v), colocados en un baño de agua a 100° C durante 10 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10000xg durante 20 min a 4°C. Desde el sobrenadante las proteínas fueron precipitadas mediante el agregado de 2 ml de 25 % (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). Las muestras fueron colocadas en un baño de hielo-agua durante 1 hora y luego centrifugadas a 15000xg durante 10 min a 4 °C. El precipitado fue resuspendido en 0,2 ml NaOH 0,1 M, con SDS 1 % (p/v) y las proteínas fueron medidas utilizando el método de Lowry (1951). Se utilizó seroalbúmina bovina como patrón. Se prepararon dos extractos para cada tiempo de almacenamiento y las medidas fueron realizadas por duplicado en cada extracto. Los valores fueron expresados como mg de proteínas por g de tejido (mg/g).

I.3-10 Medida del contenido de proteínas solubles

Se trituraron ramilletes de brócoli congelados utilizando un molinillo, aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido se homogeneizaron con 1,5 ml de buffer 50 mM Tris (tris hidroximetil aminometano)-HCl, 0,04 % v/v mercaptoetanol, 2 mM EDTA; pH 7,5. Las muestras fueron centrifugadas a 10000xg durante 20 min a 4°C, y las proteínas se determinaron en el sobrenadante de acuerdo al método de Bradford (1976). Se utilizó seroalbúmina bovina como patrón. Se prepararon dos extractos para cada tiempo de almacenamiento y las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Los resultados fueron expresados como mg de proteínas por g de tejido (mg/g).

I.3-11 Medida del poder antioxidante

El poder antioxidante de las muestras de brócoli fue determinado mediante el procedimiento descrito por Brand-Williams y col. (1995). Se trituraron ramilletes de brócoli congelado utilizando un molinillo, aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido se colocaron en 6 ml de etanol. La mezcla homogeneizada fue centrifugada a 9000 xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se llevó a un volumen final de 100 ml con agua. Alícuotas del extracto etanólico (5, 10, 20, 40, 80 y 120 µL) fueron agregadas a tubos que contenían 3,9 ml de 0,025 g L⁻¹ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en metanol recién preparado. Se midió la absorbancia a 515 nm luego del tiempo de reacción necesario para que todos los tubos alcancen un estado estacionario de la reacción (90 min). El porcentaje de DPPH remanente para cada alícuota de extracto etanólico fue utilizado para determinar la cantidad de muestra necesaria para disminuir la absorbancia inicial de DPPH en un 50%, lo que se define como EC₅₀. El poder antioxidante fue expresado como EC₅₀⁻¹. Se prepararon dos extractos para cada tiempo de almacenamiento y cada medida se realizó por duplicado en cada extracto.

I.3-12 Medida del contenido de TBARS

Las sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS) se midieron de acuerdo a Page y col. (2001). Se trituraron ramilletes de brócoli congelado utilizando un molinillo y aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido se homogeneizaron con 1 ml de ácido tricloroacético 10 % p/v, se lavó 4 veces con 10 ml de acetona y se centrifugó a 1300 xg durante 15 min. El precipitado fue lavado bajo N₂ e incubado a 100°C durante 30 min

con 3 ml de H_3PO_4 1% p/v y 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0.6 % p/v. Para frenar la reacción se colocaron las muestras rápidamente en un baño de hielo y se agregó 3 ml de 1-butanol. Se agitaron las muestras vigorosamente para lograr una emulsión y luego se centrifugaron para separar las fases. Se midió la Abs a 530 nm en la fase acuosa. Se prepararon dos extractos para cada tiempo de almacenamiento y las medidas se realizaron por duplicado en cada extracto. Los resultados fueron expresados como Abs_{530nm} por g de tejido.

I.3-13 Análisis estadístico

La experiencia fue realizada tres veces y las tendencias encontradas fueron similares. Los resultados que se presentan corresponden a una de las experiencias completa. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de ANOVA, las medias fueron comparadas mediante un test de LSD a un nivel de significancia de 0,05.

I.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1- Medida del color superficial

Se ha mencionado que durante el almacenamiento postcosecha de brócoli, se desarrolla rápidamente el proceso de senescencia inducido por el estrés que ocasiona la cosecha de un tejido inmaduro. Asimismo se ha mencionado que la degradación de clorofilas es el síntoma más evidente de senescencia. La principal causa de pérdida de calidad en brócoli es el amarillamiento de sus inflorescencias, por lo tanto la medida de color superficial será un aspecto muy importante, que debe ser considerado particularmente cuando estudiamos la vida postcosecha de brócoli.

La medida de color se realizó por medio de un colorímetro que utiliza un sistema triestímulo. Estos instrumentos de medida se basan en que el color puede describirse matemáticamente como la combinación de la intensidad de tres colores primarios (Gnanasekharan y col., 1992). Se ilumina la muestra cuyo color se desea medir, y las señales de reflexión o transmisión se calculan directamente en unidades relacionadas con la manera en que el ojo humano percibe el color. Podemos definir el color como el impacto de todas las longitudes de onda de la luz visible (390-760 nm) sobre la retina humana. En la retina se encuentran dos tipos de células sensibles a la luz: bastones (sensibles a negro y blanco) y conos (sensibles a rojo, verde y azul) (Francis, 1995).

La medida de color se basa en la respuesta de tres receptores (rojo, verde y azul) por lo que resulta un punto en el espacio tridimensional.

Una de las escalas de color más difundidas es la escala CIE que utiliza los parámetros L^* , a^* y b^* y a partir de ellos se puede calcular el ángulo hue.

L^* : luminosidad o brillo

a^* : cantidad de rojo

b^* : cantidad de azul

$\text{Hue} = \tan^{-1}(b/a)$, cuando a y b son positivos

$\text{Hue} = 180 - \tan^{-1}(b/a)$, cuando a es negativo y b es positivo

Para analizar el cambio de color superficial durante la senescencia postcosecha de brócoli, se midieron los parámetros L^* , a^* y b^* luego de 0, 1, 2, 3 y 4 días de almacenamiento a 20° C. Utilizando los parámetros a^* y b^* se obtuvieron los respectivos valores de hue (**Figura I-1**).

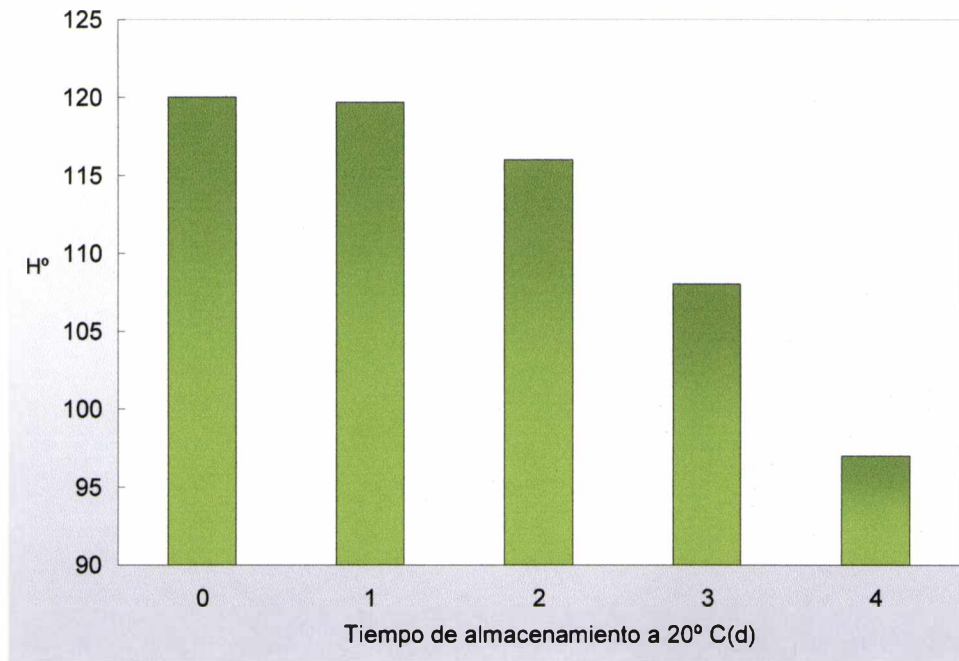


Figura I.1.- Cambios del valor de hue durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20°C en oscuridad. LSD: 0.20

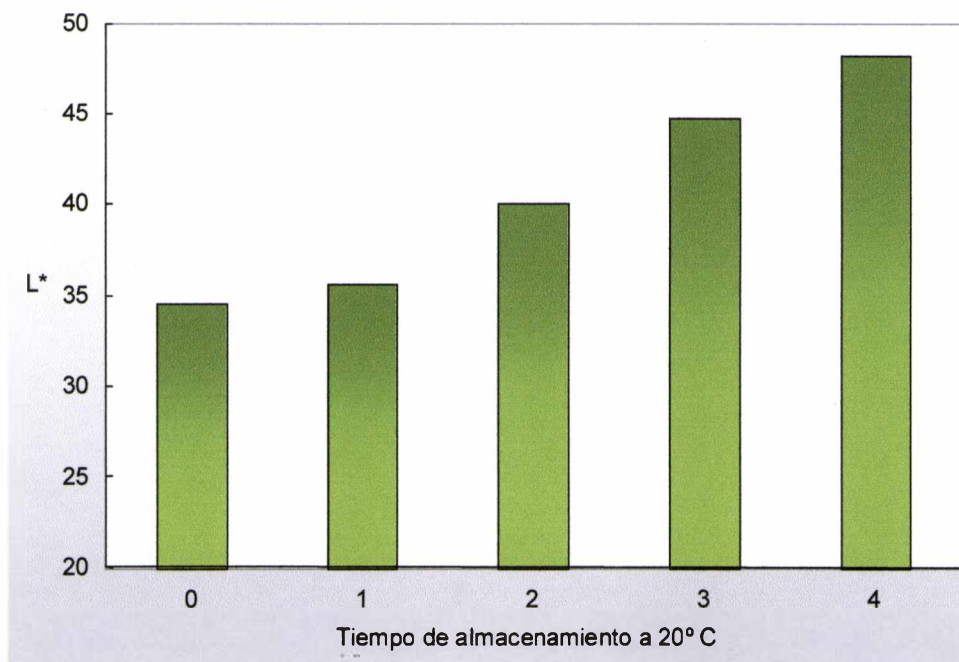


Figura I.2.- Cambios en el valor de L* durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad. LSD: 0.3

Durante la senescencia postcosecha de brócoli se produce un cambio característico de color superficial ya que se produce el amarillamiento de las inflorescencias.

De todos los parámetros de color que se analizaron los que describen mejor este cambio de color son el ángulo hue y el valor de L*. En el caso de brócoli variedad De Cicco, cabeza central, se observó que los valores de hue comenzaron a disminuir luego de dos días de almacenamiento a 20° C alcanzando un valor cercano a 90 luego de 4 días. Con respecto al valor de L* (**Figura I-2**), se encontró un aumento de este valor durante el almacenamiento a 20° C, también a partir del día 2, indicando el cambio de verde a amarillo que es un color más luminoso.

2- Medida del contenido de pigmentos.

Se analizó el cambio del contenido de pigmentos, clorofilas y feofitinas, durante el período de senescencia postcosecha. Se observó que durante el almacenamiento a 20° C el contenido de clorofilas totales disminuyó aproximadamente un 10 % luego de 1 día de almacenamiento ($p < 0,05$), alcanzando un valor aproximadamente 50% menor respecto al valor inicial luego de 4 días (**Figura I-3**).

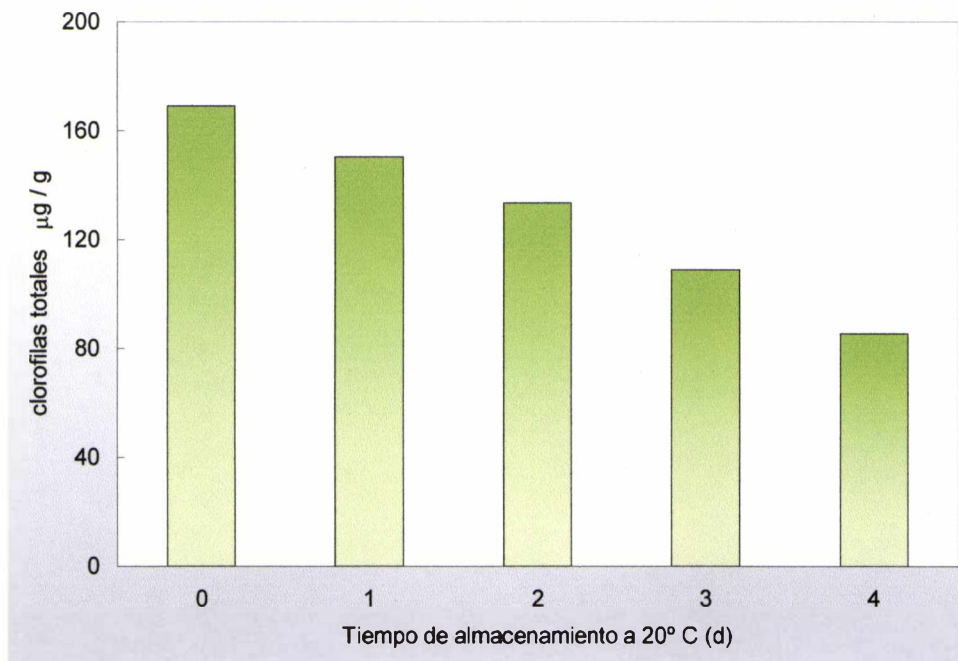
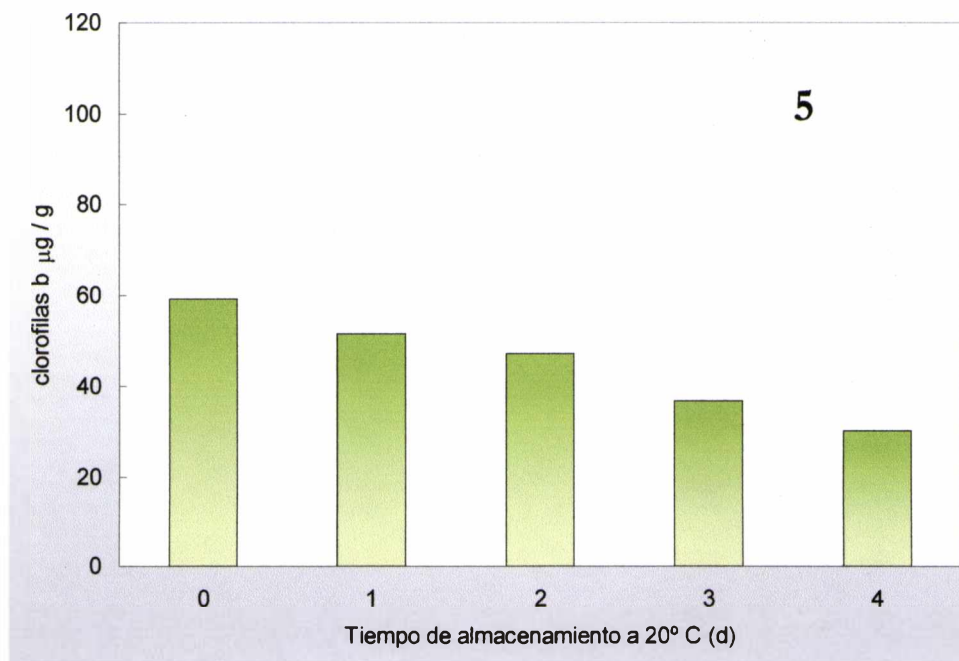
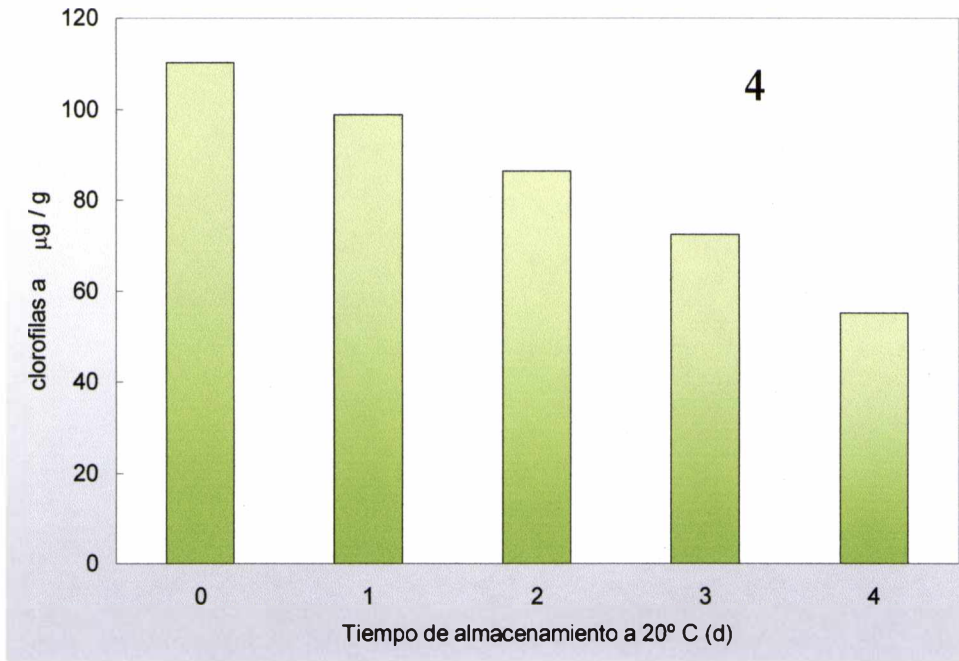


Figura I.3- Cambios en el contenido de clorofilas totales durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad. LSD: 7.3

Se midió el contenido de clorofilas a y b, inicialmente el contenido de clorofilas b fue 50% menor que el de clorofilas a. Cuando se analizaron los cambios en el contenido de

clorofilas a y b por separado (**Figuras I- 4 y 5**), se encontró que la velocidad de degradación de clorofilas a fue mayor que la de clorofilas b, siendo las velocidades correspondientes de aproximadamente 13,77 y 7,21 $\mu\text{g}/\text{día}$ respectivamente. Este resultado es coincidente con lo que habitualmente ocurre en otros sistemas (Kura- Hotta y col., 1987).



Figuras I.4 y 5- Cambios en el contenido de clorofilas a (4) y b (5) durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad. LSD: Cl.a: 8.2 y Cl.b: 8.3

El color verde de las inflorescencias de brócoli se debe al alto contenido de clorofilas que tienen los sépalos y pedicelos que las componen. El cambio de color producido durante la senescencia puede relacionarse directamente con la degradación de clorofilas, pero se debe mencionar que la disminución del contenido de clorofilas se observó a partir del día 1 mientras que los cambios del color superficial se observaron desde el día 2.

Se analizó el contenido de feofitinas, utilizando el método espectrofotométrico desarrollado por Linchtertaler (1987). Las feofitinas son derivados de clorofilas que mantienen la molécula de fitol pero han perdido el átomo de Mg^{+2} que ocupa el centro del anillo tetrapirrólico. Esta modificación de la molécula hace que estos pigmentos posean color verde pardo. La formación de feofitinas a partir de clorofilas puede ocurrir inespecíficamente mediante la acidificación del entorno de los pigmentos o bien por medio de la actividad específica de alguna enzima tal como Mg-dequelatasa.

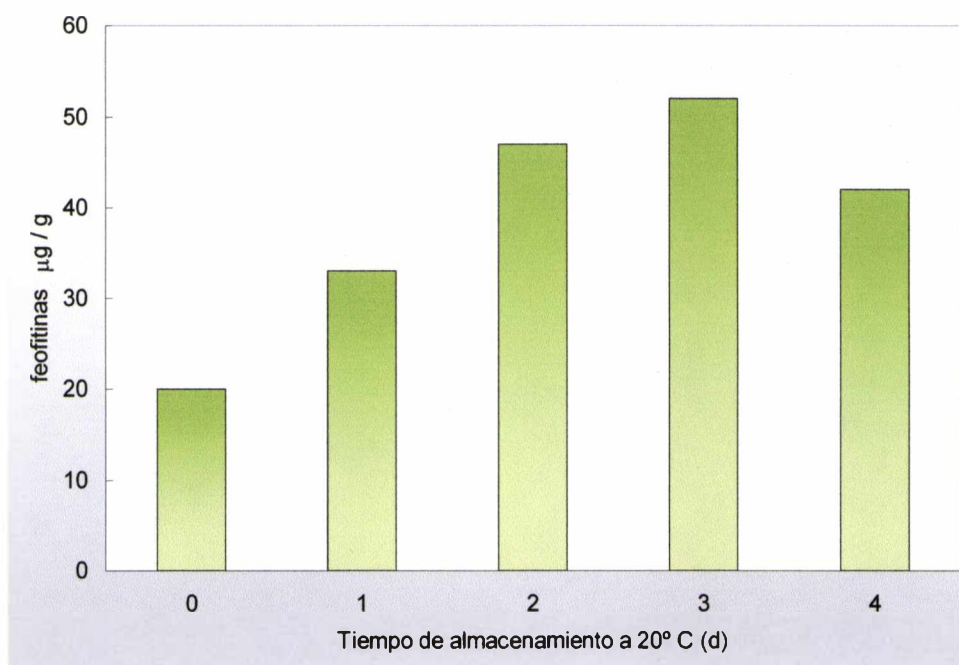


Figura I.6- Cambios en el contenido de feofitinas durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad. LSD: 8.6

Se halló una acumulación transitoria de feofitinas durante los primeros días de almacenamiento a 20° C (**Figura I.6**). La acumulación de este pigmento ha sido descrita durante la senescencia de otros sistemas tales como hojas de perejil (Amir Shapira y col., 1987) y hojas de Ginkgo biloba (Tang y col., 2000).

3- Medida de las enzimas que degradan clorofilas

Se analizó la variación de la actividad de las enzimas clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasa. Estas enzimas, tal como se ha detallado en la introducción, participan en mecanismos de degradación de clorofilas.

Se observó que la actividad de las tres enzimas aumentó durante el almacenamiento a 20° C, pero los perfiles fueron diferentes (**Figura I-7**). Las actividades clorofilasa y Mg dequelatasa, aumentaron significativamente a partir del día 2 y 1 respectivamente, mientras que la actividad peroxidasa aumentó más tarde, luego de 3 días de almacenamiento. Estos resultados sugieren que durante la senescencia postcosecha de brócoli la degradación de clorofilas se produciría al menos por dos mecanismos de degradación: posiblemente primero actuaría el mecanismo propuesto por Matile (1999) en el que participan las enzimas clorofilasa y MDS y posteriormente tendrían importancia otras enzimas oxidativas como las peroxidasas.

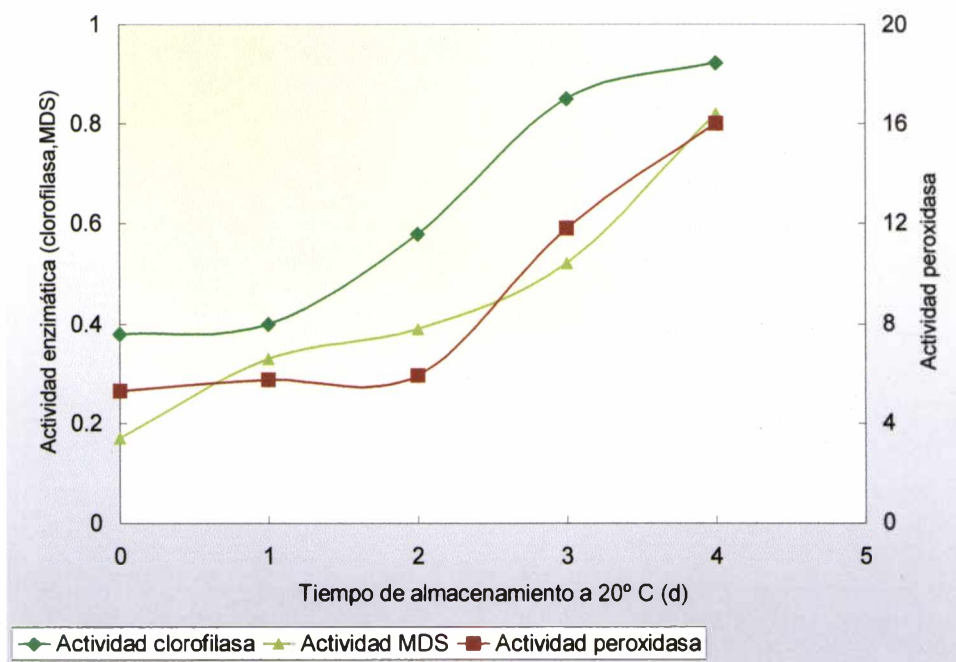


Figura I.7- Cambios en la actividad de las enzimas que degradan clorofilas durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad.

Actividad clorofilasa: $\delta DO_{663nm} \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$; LSD: 0,08

Actividad MDS: $\delta DO_{687nm} \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$; LSD: 0,09

Actividad peroxidasa: $\delta DO_{649nm} \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$; LSD: 2,5

Cuando se compararon los resultados obtenidos en las **Figuras I.3; I.6 y I.7** se encontró que la disminución del contenido de clorofilas inicialmente coincide con una acumulación transitoria de feofitinas y un leve aumento de la actividad clorofilasa y MDS (días 0, 1, 2 y 3). Posteriormente se observó un aumento importante de la actividad

clorofilasa y MDS que se corresponde con la disminución de feofitinas (día 4). La actividad MDS aumentó en el día 1 mientras que la actividad clorofilasa aumentó en el día 2, esto sugiere que al menos es posible que MDS tenga participación en la acumulación transitoria de feofitinas.

Por otra parte al aumento de la actividad de las enzimas clorofilasa y MDS hacia el final de la experiencia se le adicionó un aumento notable de la actividad peroxidasa. La velocidad de degradación de clorofilas fue constante a lo largo de la experiencia, por lo que se sugiere que actuaron los dos mecanismos mencionados.

Funamoto y col. (2002) trabajando con brócoli variedad Haitzu y almacenamiento a 15° C encontraron que la degradación de clorofilas se relacionaría con la actividad de enzimas oxidativas antes que con la actividad clorofilasa, sin embargo los resultados hallados en este trabajo sugieren que las enzimas que participan del mecanismo propuesto por Matile (1999) tendrían participación en la degradación de clorofilas que se produce durante la senescencia postcosecha de brócoli.

4- Medida de otros parámetros de senescencia

Degradación de proteínas

Se ha mencionado que durante la senescencia se produce una modificación importante en el metabolismo de proteínas que llevaría finalmente a una disminución de su contenido. Durante la senescencia postcosecha de brócoli se produce una rápida disminución del contenido de proteínas (Page y col. 2001) acompañado de un aumento del nivel de amino ácidos libres y amonio (King y Morris, 1994). Se ha mencionado anteriormente, que aumenta la expresión de genes que codifican para diversas proteasas: cisteína proteasa, aspártico proteasa, enzimas de vacuolas, glutamina (Gln) sintetasa citoplasmática que transforma a los amino ácidos libres en glutamina para ser transportados a través de membranas (Page y col., 2001). Se han identificado cisteínas proteasas que aumentan su actividad durante la senescencia postcosecha de brócoli (Coupe y col., 2003). Atendiendo a todos estos antecedentes se realizó la medida del contenido de proteínas totales y de proteínas solubles.

Los resultados indicaron que durante la senescencia postcosecha de brócoli var. De Cicco se produce una disminución del contenido de proteínas totales (**Figura I.8 B**), este resultado es coincidente con lo que se ha observado en otros sistemas. Cuando se analizó el

contenido de proteínas solubles se observó un ligero aumento de las mismas ($p < 0,05$) (Figura I.8 A).

El contenido de proteínas solubles es un parámetro que se asocia generalmente con

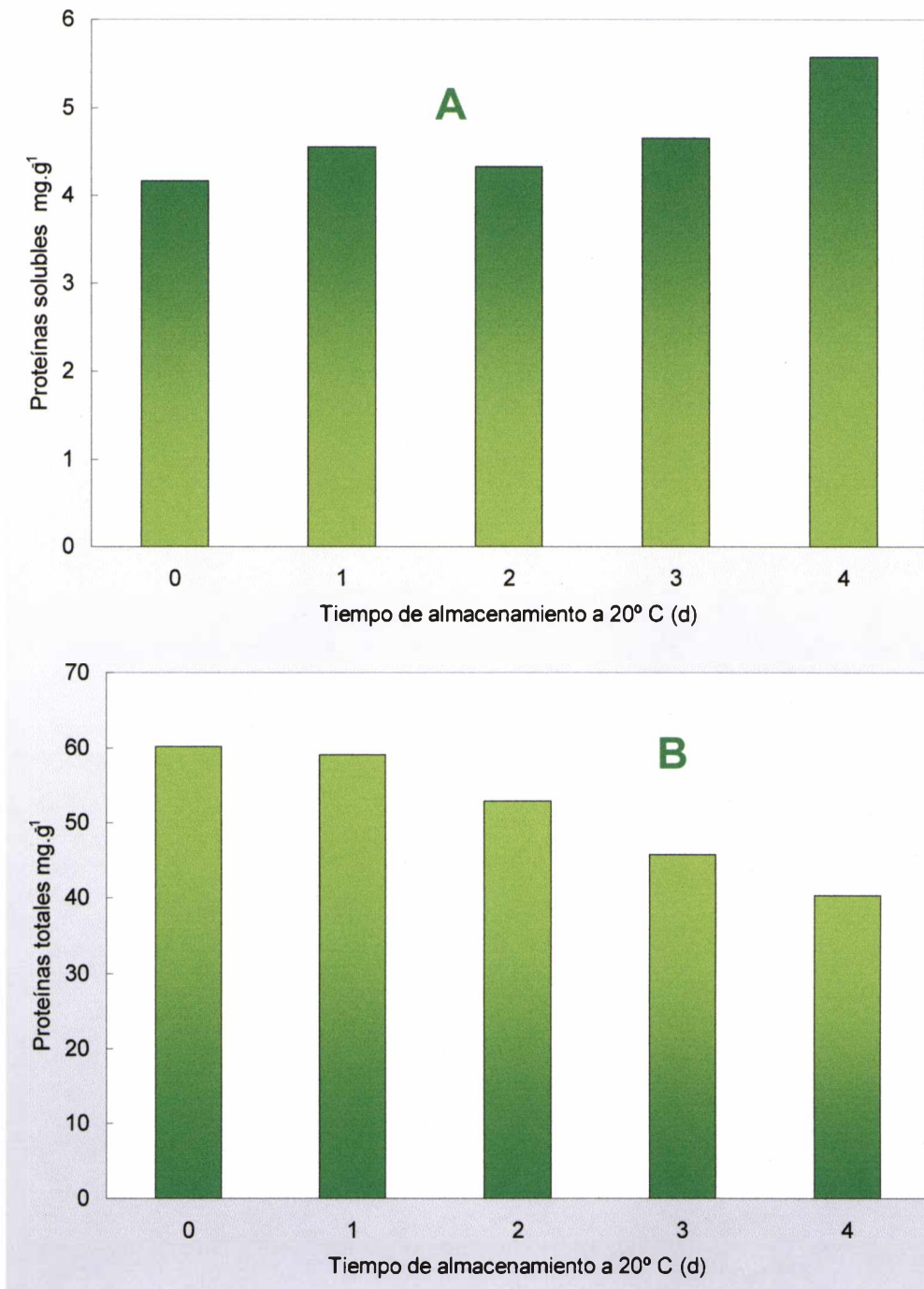


Figura I.8- Cambios en el contenido de proteínas solubles (A) y totales (B) durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad. Los valores de LSD fueron 0.44 y 0.87 respectivamente.

daño de tejidos ya que se produciría la pérdida de compartimentalización de las células y esto permitiría la liberación y solubilización de proteínas. Se analizó el porcentaje de

proteínas solubles respecto al contenido de proteínas totales* (**Figura I.9**) y se encontró que este parámetro aumentó marcadamente durante el almacenamiento, indicando que durante la senescencia postcosecha de brócoli los tejidos se dañaron.

*Nota: El porcentaje de proteínas solubles respecto a las totales, se tomó sólo como una comparación durante el período de almacenamiento. No debe tomarse este parámetro como un resultado absoluto, ya que las determinaciones fueron realizadas, tal como se indicó en Materiales y Métodos sobre distintos extractos y con distinta técnica para la determinación de proteínas.

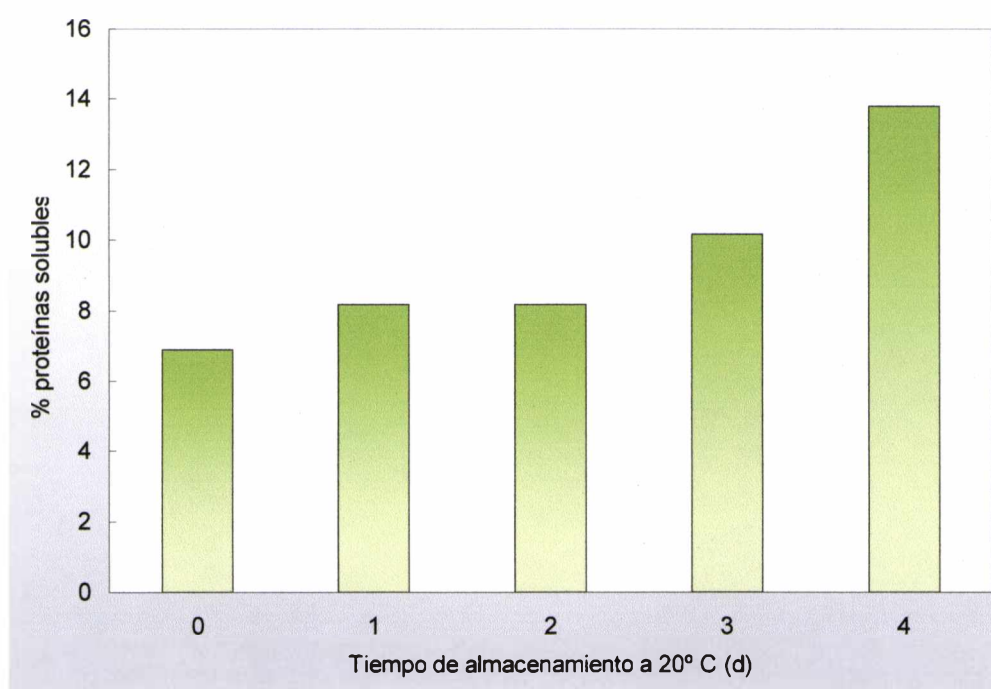


Figura I.9- Cambios en el porcentaje de proteínas solubles respecto al contenido de proteínas totales, durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad.

Poder antioxidante

Se analizó el poder antioxidante durante la senescencia postcosecha de brócoli var. De Cicco, almacenado a 20° C (**Figura I.10**). Se observó una disminución del poder antioxidante de brócoli a medida que se produce la senescencia. El método utilizado da una medida global de todos los antioxidantes presentes en el tejido. En el caso de brócoli el antioxidante más abundante es el ácido ascórbico. Trabajos anteriores han demostrado que el contenido de ácido ascórbico disminuye rápidamente luego de la cosecha (Nishikawa y col.2003). Barth y Zhuang (1996) trabajando con brócoli de la variedad Iron Duke encontraron una disminución del 80% de ácido ascórbico luego de 6 días de

almacenamiento a 5° C. Se debe tener en cuenta que otros compuestos como los fenoles y flavonoides poseen la capacidad de ser antioxidantes y su contenido aumenta durante la senescencia de los tejidos sin embargo el contenido de ácido ascórbico en brócoli es aproximadamente 3 veces superior a los niveles de fenoles.

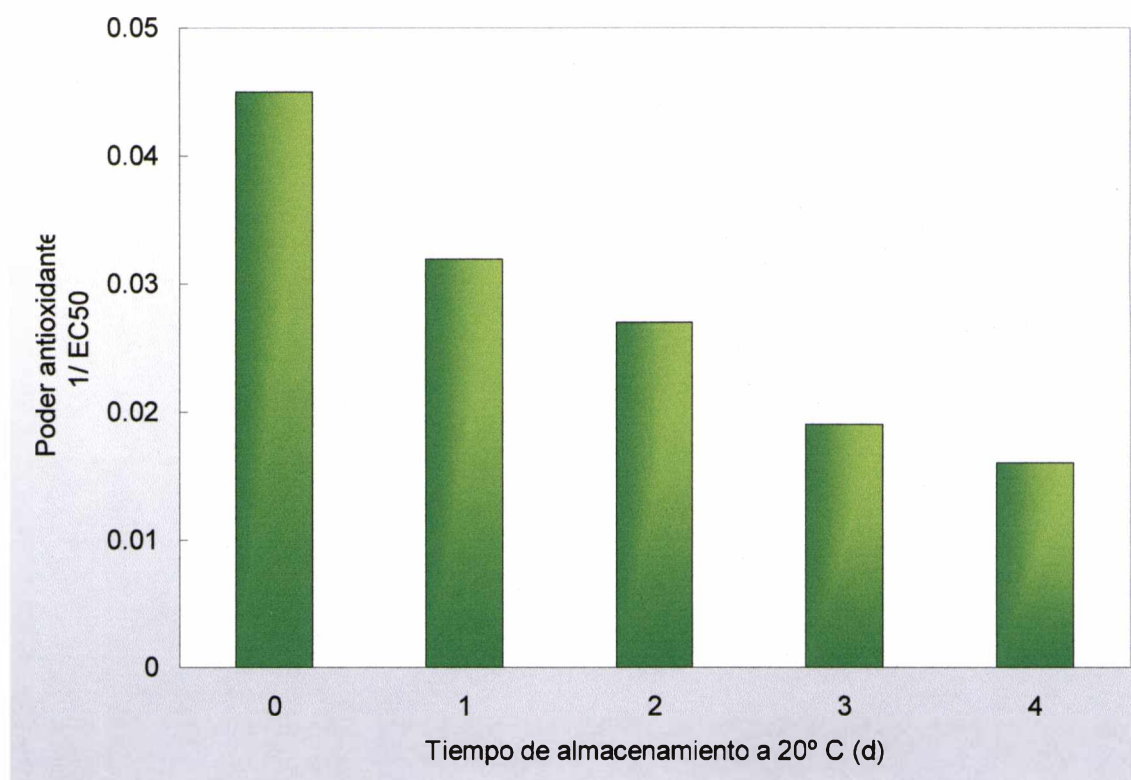


Figura I.10- Cambios del poder antioxidante durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad. El poder antioxidante se expresó como EC50-1. LSD: 0.003.

De acuerdo al método desarrollado por Brand Williams (1998) para la medida de poder antioxidante, las cinéticas de reacción de los antioxidantes con el reactivo DPPH presentan perfiles diferentes en el caso de fenoles y de ácido ascórbico. En nuestro caso la cinética de disminución de la absorbancia a 515 nm de los extractos de brócoli obtenidos mostró un perfil de comportamiento similar al del ácido ascórbico (**Figura I.11**). Sin embargo a medida que se desarrolla la senescencia (por ejemplo luego de 4 días de almacenamiento a 20° C) el perfil de las cinéticas fue similar al de fenoles.

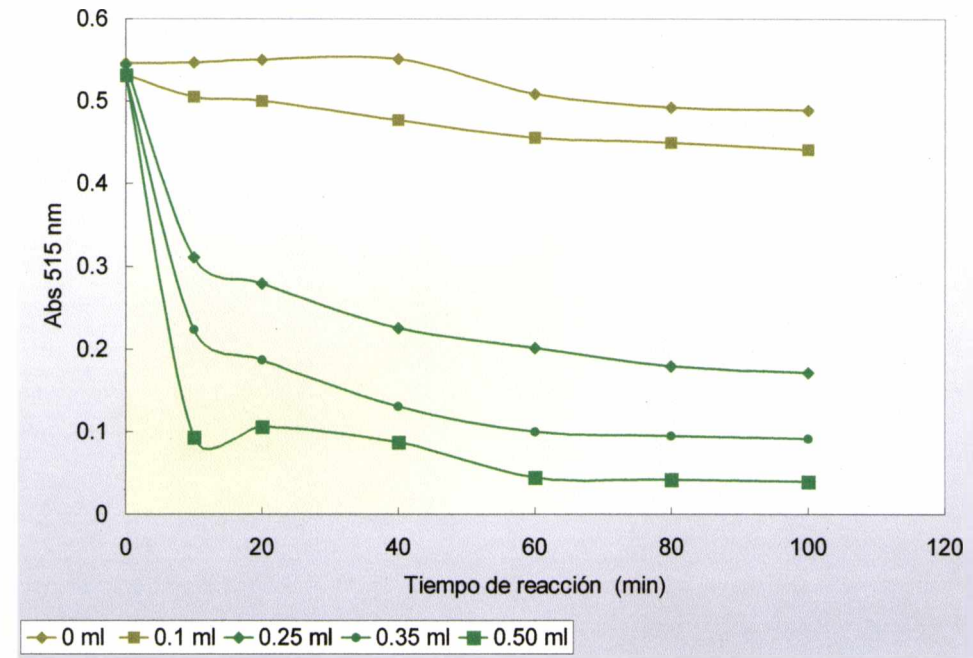


Figura I.11- Cinéticas de la reacción con DPPH para las distintas cantidades de extracto de brócoli. Los perfiles obtenidos se corresponden al comportamiento tipo ácido ascórbico (Brand-Williams 1998).

Peroxidación de lípidos

Se ha sugerido que la degradación y peroxidación de lípidos son eventos tempranos de la senescencia postcosecha de brócoli. (Zhuang y col., 1997). Como productos finales y relativamente estables de la oxidación de lípidos y otras macromoléculas se produce la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Los ácidos grasos más abundantes en brócoli fresco son :

ácido α -linolénico (C18:3, $\Delta^{9,12,15}$): 53 % v/v

ácido linoleico (C18:2, $\Delta^{9,12}$): 18 % v/v

ácido palmítico (C16:0): 16 % v/v

pequeñas cantidades de otros insaturados (C18:1; C16:1, C16:2 y C16:3)

pequeñas cantidades de ácido esteárico (C18:0)

Cuando se almacena brócoli fresco a temperatura ambiente los niveles de ácidos grasos totales disminuyen un 50 % luego de tres días, mientras que cuando se almacena a 4° C la disminución del 50 % de ácidos grasos totales se produce aproximadamente a los 16 días (Page y col., 2001). Resultados similares han obtenido otros autores comparando temperaturas de almacenamiento de 5 y 20° C (Zhuang y col., 1995). Por otro lado, los niveles de peróxidos de ácidos grasos aumentan durante la senescencia, siendo el

porcentaje inicial de 1,7 y alcanza un valor de 4,5 % luego de 3 días de almacenamiento a 20° C (Page y col., 2001).

La medida de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) permanece constante durante el almacenamiento a 20° C, mientras que a 4° C se observó un aumento de 3 veces el valor inicial (Page y col., 2001), sin embargo otros autores encontraron un aumento del contenido de TBARS durante el almacenamiento postcosecha de brócoli tanto a 5 como a 20° C (Zhuang y col., 1997).

Los ácidos grasos (C18:2 y C18:3) pueden ser utilizados como sustratos para la β -oxidación y convertirse en acetyl-coA, por lo que podrían ser utilizados tanto para respiración como para gluconeogénesis. Los intermediarios de β -oxidación no son detectados en las medidas de peroxidación de lípidos ni en TBARS. En el presente trabajo se utilizó un ensayo que mide sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como un índice general de peroxidación de lípidos (Hodges y col., 1999). En este ensayo se estima la cantidad de malondialdehído (MDA) formado, que es un producto secundario de la oxidación de ácidos grasos principalmente poli-insaturados, pero se debe tener presente que la oxidación y degradación de otras macromoléculas pueden producir también MDA.

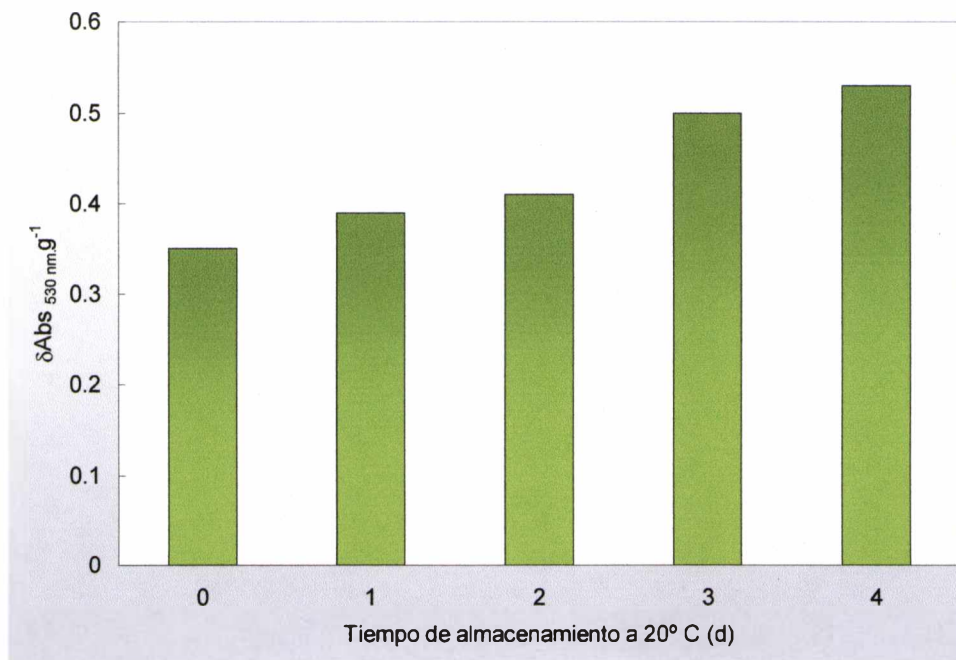


Figura I.12- Cambios en el contenido de TBARS durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad. LSD: 0.01

En el caso de brócoli variedad De Cicco, se observó un aumento del valor de TBARS durante la senescencia postcosecha (**Figura I. 12**) a partir del día 2, similar a lo descrito por otros autores (Zhuang y col., 1997).

El aumento de TBARS observado se correspondió con la disminución del poder antioxidante, por lo que se podría sugerir la existencia de daño oxidativo durante la senescencia postcosecha de brócoli.

I. 5- CONCLUSIONES

Durante la senescencia postcosecha a 20° C de brócoli variedad De cicco se producen los siguientes cambios:

- ❖ Modificaciones del color superficial: aumento de Luminosidad y disminución del valor de hue, parámetros que describen el cambio de color verde a amarillo.
- ❖ Disminución del contenido de clorofilas a y b y aumento de la actividad de las enzimas clorofilasa, MDS y Peroxidasas.
- ❖ Acumulación transitoria de feofitinas.
- ❖ Disminución del contenido de proteínas totales y aumento de proteínas solubles.
- ❖ Disminución del poder antioxidante, posiblemente se debe a la disminución del contenido de ácido ascórbico.
- ❖ Aumento de peroxidación de lípidos.

Por otra parte, el análisis temporal de todas estas características permitió concluir que la degradación de clorofilas y el consecuente amarillamiento de las inflorescencias es el síntoma más evidente de la senescencia postcosecha de brócoli, pero es un síntoma más tardío que otros cambios metabólicos tales como la degradación de proteínas, clorofilas, la acumulación transitoria de feofitinas y la disminución de poder antioxidante y la oxidación de lípidos.

Capítulo II

Caracterización de la actividad Mg-dequelatasa de brócoli

Anexo Capítulo II:
Caracterización de la actividad Mg-dequelatasa de frutillas



II.1- INTRODUCCIÓN

Según Brown y col. (1991) las reacciones de degradación de clorofilas pueden dividirse en dos tipos. Las reacciones de tipo I corresponden a la pérdida de fitol, pérdida de Mg^{+2} y modificaciones en las cadenas laterales del anillo tetrapirrólico, pero sin ruptura del mismo. Las reacciones de tipo II involucran la apertura del anillo tetrapirrólico, lo que conduce al blanqueo de la clorofila, que en algunos casos puede consumir O_2 .

Como se ha mencionado en la introducción general de ésta tesis Matile y col. (1999) han propuesto un mecanismo de degradación de clorofilas que involucra en las primeras etapas la acción consecutiva de clorofilasa, Mg-dequelatasa y Feofórbido a oxigenasa. Las enzimas clorofilasa y feofórbido a oxigenasa han sido bien caracterizadas, pero poco se ha estudiado acerca de la actividad MDS y los resultados publicados sobre esta enzima son contradictorios.

En numerosos sistemas, tanto de plantas superiores como algas y bacterias fotosintéticas, se ha detectado la acumulación de feofórbido durante la degradación de clorofilas en diferentes sistemas tales como: extractos crudos de *Chenopodium album* (Shio y col., 1991), células de tabaco (Schoch y Vielwerth, 1983), cotiledones de colza (Langmeier y col., 1993), células de *Chlorella fusca* (Ziegler y col., 1988) y células de *Rhodobacter sphaeroides* (Haidl y col., 1985).

El hecho de que en muchos sistemas se acumulan derivados de clorofila libres de Mg^{+2} y que la enzima feofórbido a oxigenasa utiliza como sustrato derivados sin Mg^{+2} (Matile y col., 1999), sugieren que la remoción de Mg^{+2} es un paso importante y necesario durante la degradación de clorofilas.

De acuerdo con el mecanismo de degradación propuesto por Matile (1999) feofórbido es el producto de la reacción catalizada por Mg-dequelatasa, en la que se reemplaza el átomo de Mg^{+2} central por iones H^+ .

La actividad MDS ha sido detectada en algunas especies de fitoplancton marino (Owens y Falkowski, 1982), *Chlorella fusca* (Ziegler y col., 1988) y plantas superiores (Shioi y col., 1991 y 1995; Langmeier y col., 1993).

Vicentini y col. (1995) han desarrollado un método para medir la actividad MDS utilizando clorofilina (derivado estable de la clorofila que conserva el átomo de Mg^{+2}) como sustrato. Estos autores trabajaron con cotiledones de colza y mostraron que la actividad MDS se encuentra en los tilacoides, en forma latente, principalmente en cloroplastos

presenescentes. Los autores proponen que la actividad MDS es de naturaleza proteica, pero no realizaron estudios para confirmarlo.

Posteriormente Shioi y col.(1995) demostraron la presencia de actividad MDS en extractos crudos de *Chenopodium album* . Asimismo, estos autores demostraron que la actividad MDS es capaz de atravesar un filtro de corte en 5000 Da. La actividad MDS de *Chenopodium album* no precipitó en la fracción 35-75% de sulfato de amonio y fue inhibida aproximadamente un 50% en presencia de $MgCl_2$ 10 mM. También se halló que la actividad MDS de un extracto crudo de *Chenopodium album* se inactiva completamente por calentamiento a 95° C durante 5 min, mientras que la fracción de masa molecular menor que 5000 Da mantuvo la actividad MDS luego del calentamiento a 95° C aún luego de 1 h de tratamiento. En base a estos resultados, Matile y col.(1999) sugieren que el compuesto estable al calor podría ser un grupo prostético que formaría parte de la enzima y que se podría disociar muy fácilmente de la porción proteica.

Otro sistema donde se ha detectado la actividad MDS es en bananas (Janave y col., 1997). Se detectó actividad MDS en un extracto de enzimas solubles y se demostró que la actividad se inhibe un 30% en presencia de $MgCl_2$ 5 mM.

Dado que se conoce muy poco sobre la actividad MDS y que los resultados que se han publicado en referencia a la misma son escasos y en algunos puntos sorprendentes, se planteó el estudio y caracterización de esta actividad en brócoli.

II.2- OBJETIVO

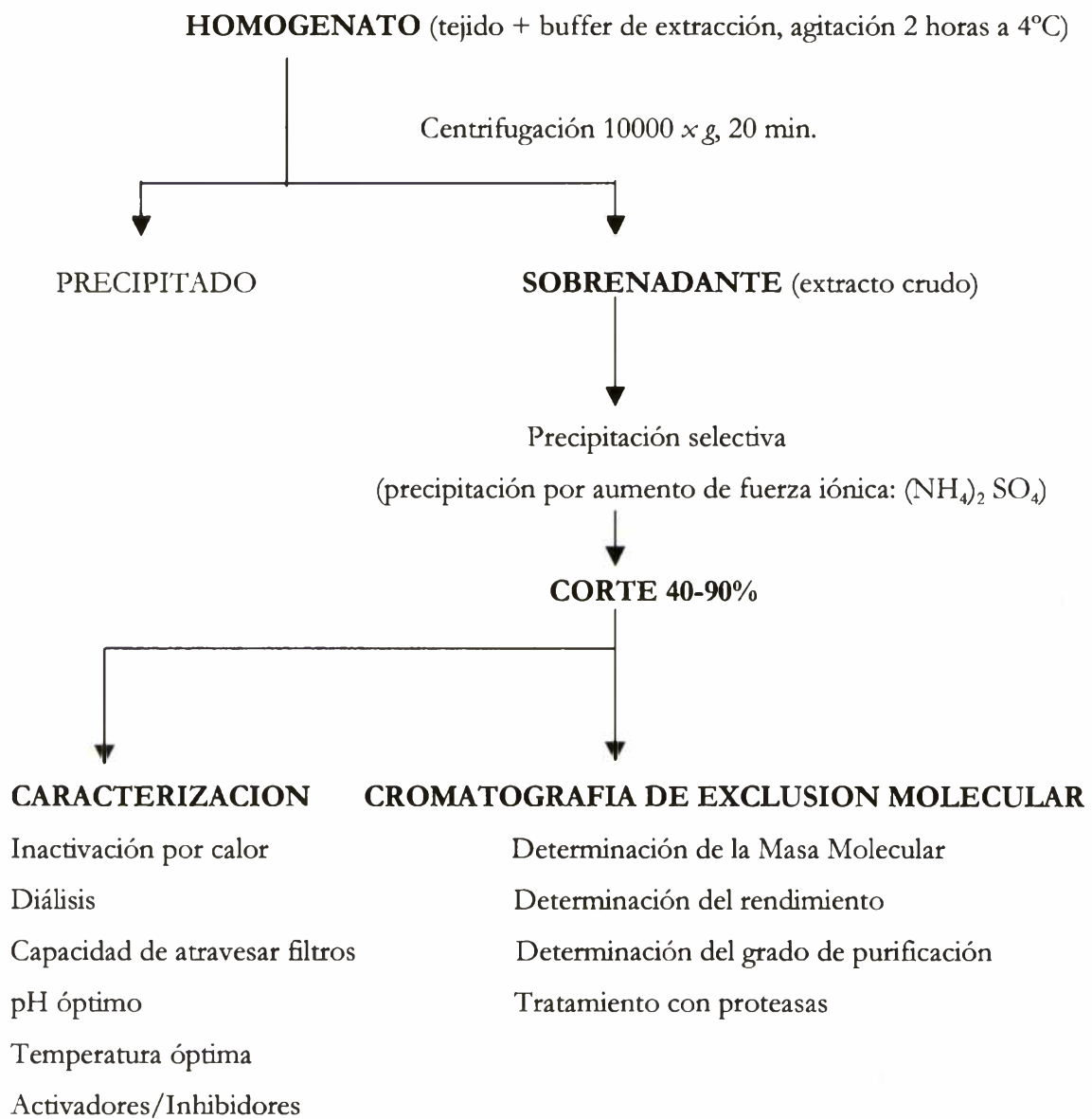
“Avanzar en el conocimiento de la degradación de clorofilas mediante el estudio y caracterización de la actividad MDS en brócoli.”

Actividades propuestas para cumplir este objetivo:

- A) Detectar la actividad MDS en extractos crudos de brócoli.
- B) Purificar parcialmente la actividad MDS de brócoli.
- C) Caracterizar la actividad MDS de brócoli.

Se presenta en la hoja siguiente un esquema de la secuencia de trabajo que será utilizada.

Secuencia de trabajo propuesta para realizar la purificación parcial y caracterización de la actividad MDS de brócoli



II.3- MATERIALES Y MÉTODOS

II.3-1 Material vegetal

Se trabajó con cabezas centrales de brócoli (*Brassica oleracea* var *italica*) cv. De Cicco, cultivadas a campo en la zona de Arana, La Plata, provincia de Buenos Aires. Inmediatamente después de la cosecha las muestras fueron llevadas al laboratorio para ser utilizadas en las experiencias. Se colocaron cabezas centrales en bandejas de plástico cubiertas con PVC y se almacenaron a 20° C en oscuridad durante 4 días para que se desarrolle la senescencia.. Se tomaron muestras para preparar los extractos enzimáticos luego de 0, 1 y 3 días de almacenamiento.

II.3-2 Preparación del extracto para medir actividad de MDS (Mg-Dequelatasa)

Aproximadamente 25 g de ramilletes de brócoli congelados y triturados con un molinillo se colocaron en 150 mL del buffer de extracción de la siguiente composición: NaH_2PO_4 0,05M; Na_2HPO_4 0,05M; pH 7.02; PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo) 1 mM; tritón X-100 0,1% (v/v); PVPP (polivinil polipirrolidona) 30 g/l. Se agitó durante 2 hs a 4°C. Luego se centrifugó a 10000xg y 4°C durante 20 min. Se descartó el precipitado y el sobrenadante (**extracto crudo**) se llevó a 40 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se agitó durante 4h a 4°C. Luego se centrifugó a 10000xg y 4°C, durante 20 min. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se llevó a 90 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se centrifugó en condiciones similares. El precipitado obtenido fue disuelto en buffer fosfato 0,05 M (**corte 40-90**).

II.3-3 Análisis de la capacidad de atravesar filtros y membranas

Diferentes alícuotas del extracto se dializaron contra buffer fosfato 0,05 M pH 7,02 utilizando membranas de corte 12000, 10000, 6000 ó 2000 Da. Otras alícuotas fueron ultrafiltradas mediante concentradores de corte 10000 Da a 6000xg durante 14 h a 4° C.

II.3-4 Preparación del sustrato (clorofilina)

Se utilizó como sustrato clorofilina, obtenida de hojas de acelga (*Beta vulgaris* var. *Cicla* L.) según el método de Vicentini (Vicentini y col., 1995). Se homogeneizaron 18g de hojas de acelga en un Omnimixer en presencia de 60 ml de una solución 80:20 de

acetona:agua. La suspensión resultante fue centrifugada a 10000xg durante 15 min a 4° C. En el sobrenadante se realizó la extracción de clorofilas utilizando 40 ml de eter de petróleo como solvente de extracción. Las clorofilas de la fase etérea se saponificaron mediante el agregado de 1 ml de solución saturada de KOH en metanol (30 % p/v), se dejó reaccionar durante 3 horas en oscuridad. El precipitado obtenido (clorofilina) se separó por centrifugación y se resuspendió en solución de tricina 1 M, pH 9.

II.3-5 Medida de la actividad MDS

Se preparó una mezcla de reacción con 75 µl de extracto en buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, 25 µl de clorofilina y 400 µl de buffer tris-tricina 50 mM, pH 8,8 y 37° C. El pH de la mezcla de reacción completa fue de 8,4. Se midió el aumento de la absorbancia a 687 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

II.3-6 Medida de la actividad MDS en función del pH

Para realizar las medidas de actividad en distintos valores de pH se prepararon mezclas de reacción según lo detallado en **II.3-5** pero utilizando 400 µl de buffer de los diferentes valores de pH entre 5,0 y 9,0. Se ensayaron dos sistemas buffer: tris-tricina 50mM y $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, los que se ajustaron a diferentes pH. Para el sistema tris-tricina se utilizaron los pH 5,7/6,4/7,0/7,5/8,0/8,5/9,0 mientras que para el sistema fosfato los valores de pH fueron 5,0/5,5/6,0/6,5/7,0/7,5/8,0/8,7. Todas las medidas de actividad enzimática se realizaron por triplicado, para cada una de las diferentes condiciones en que se realizó la medida. La actividad MDS se expresó como el aumento de la absorbancia a 687 nm ó 690 nm por minuto cuando se compararon resultados obtenidos para un extracto en distintas condiciones de medida y se expresó como el aumento de absorbancia a 687 nm ó 690 nm por min y por gramo de tejido cuando se compararon resultados entre extractos diferentes.

II.3-7 Medida de la actividad MDS en función de la temperatura

Para realizar las medidas de actividad a los diferentes valores de temperatura se prepararon mezclas de reacción de acuerdo a lo detallado en **II.3-5** y se realizó la medida incubando la mezcla de reacción a las siguientes temperaturas: 20, 25, 37, 50, 70 y 80° C.

II.3-8 Medida de la actividad MDS en presencia de efectores (activadores /inhibidores)

Se ensayó la actividad MDS en presencia de diferentes compuestos, para ello se prepararon mezclas de reacción según lo detallado en II.3-5 y se agregó en el medio de reacción EDTA, KCl, MgSO₄, MgCl₂, HgCl₂, H₂O₂ ó glutatión reducido, siendo las concentraciones finales en la mezcla de reacción las detalladas para cada caso en la tabla de resultados

II.3-9 Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó un sistema para FPLC, Pharmacia, equipado con una columna XK 16/40 de Pharmacia rellena con Sephacryl 200 o con Superdex 30, las que se equilibraron con buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6,8. Se sembró 0,8 ml de muestra (corte 40-90%). Para el desarrollo de la cromatografía se utilizó buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6,8, a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min., recogándose fracciones de 2 ml a la salida del detector (espectrofotómetro, medida de la Abs a 280 nm). La actividad MDS se midió en cada una de las muestras de 2 ml que se recogieron a la salida de la columna, utilizando 150 µl de muestra, 25 µl de clorofilina y 125 µl de buffer tris/ tricina y se procedió según II.3-5

Para determinar la masa molecular (MM) se calibraron las columnas de exclusión molecular con los siguientes marcadores de masa molecular conocida (Pharmacia):

Para la columna Sephacryl 200: Blue dextran (MM= 2000 kDa), Anhidrasa carbónica (MM= 29 kDa), Albúmina (MM= 66 kDa), Ribonucleasa (MM= 13,5 kDa).

Para la columna Superdex 30: Pentaglicina (Mr 303); Gastrina I fragmento 14-17 (MM 546); Sustancia P (MM 1346), Aprotinin (MM 6500), y citocromo c (MM 12400).

II.3-10 Tratamiento con proteasas

Los extractos parcialmente purificados mediante cromatografía de exclusión molecular fueron tratados con proteasas de la siguiente manera: 200 µl de extracto se trataron con 50 ml de solución de proteinasa K 50mg.ml⁻¹ o con 50 ml de papaína 28 mg.ml⁻¹. Las mezclas se incubaron durante 20 h a 37° C y luego se midió la actividad MDS de estas mezclas. Se prepararon los controles correspondientes sin el agregado de proteasas pero que fueron sometidos al mismo tiempo y temperatura de incubación.

II.3-11 Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (1976) para la medida de proteínas en las muestras utilizando albúmina bovina como patrón.

II.3-12 Diseño experimental

Las experiencias completas fueron realizadas tres veces. En cada experiencia los extractos fueron preparados por duplicados. Todas las medidas de actividad fueron realizadas para cada punto por triplicado. Se calcularon las medias con sus desviaciones estandard.

II.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1- Medida de la actividad MDS en extractos de brócoli

Cuando se realizó la caracterización de la senescencia postcosecha de brócoli cv. De Cicco (Capítulo I), se encontró que durante este período se produce un aumento de la actividad MDS. Considerando este resultado, se prepararon extractos de brócoli a partir de tejido recién cosechado y a partir de inflorescencias que fueron almacenadas a 20° C en oscuridad durante 2 y 4 días para que se desarrolle la senescencia. Estos extractos fueron utilizados para realizar la medida de actividad MDS según el método de Vicentini y col. (1995) (Tabla II.1).

Tabla II.1- Medida de la actividad MDS en extracto crudo de brócoli luego de 0, 2 y 4 días de almacenamiento a 20° C en oscuridad. La actividad MDS se expresó como $\delta\text{Abs}_{687\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Extracto obtenido a partir de :	Actividad MDS (en el extracto crudo)
Brócoli recién cosechado (día 0)	0,024 ± 0,002
Brócoli presenescente (día 2)	0,086 ± 0,007
Brócoli senescente (día 4)	0,105 ± 0,012

Los resultados obtenidos indicaron que durante la senescencia postcosecha de brócoli la actividad MDS detectada en los extractos crudos aumentó más de 2 veces en tejido senescente (luego de 3 días de almacenamiento) respecto al valor original. Frente a este resultado los extractos utilizados para caracterizar la actividad MDS de brócoli, se prepararon a partir de brócoli almacenado por 3 días a 20° C y en oscuridad.

La medida de actividad MDS en un extracto crudo de brócoli fue baja, mientras que dicha actividad fue significativamente mayor en un extracto concentrado y parcialmente purificado mediante precipitación con sulfato de amonio, dicha actividad fue recuperada en la fracción correspondiente a 40-90% (Tabla II.2). Shioi y col. (1996), trabajando con *C.album*, encontraron que la actividad MDS no precipitó en la fracción 35-75 % de sulfato de amonio.

Se logró la inactivación de dicha fracción mediante calentamiento a 100°C durante 10 minutos (**Tabla II.2**).

Por otra parte, se dializó una fracción del corte 40-90% utilizando una membrana de corte 12000 Da. Luego de la diálisis no se detectó actividad MDS. Frente a este resultado, se realizaron una serie de ensayos en los que se utilizaron membranas con diferentes límites de corte (12000, 10000 y 6000 Da) y se encontró que la actividad MDS se perdió en todos los casos. Este resultado es coincidente con el de Shioi y col. (1996) quienes encontraron que la actividad MDS está asociada a un compuesto de masa molecular menor que 5000 Da. Sin embargo cuando se realizó una prueba utilizando concentradores de corte 10000 Da, la actividad MDS no se perdió. La diferencia entre ambas experiencias (diálisis y ultrafiltración) está dada por la fuerza iónica. Esto indicaría que MDS podría ser un compuesto de muy baja masa molecular y que dependiendo de la fuerza iónica que lo rodea, se asocia con macromoléculas comportándose como un compuesto de alta masa molecular.

Tabla II.2- Actividad MDS en las distintas etapas de fraccionamiento durante la obtención de extractos de brócoli.

La actividad MDS fue medida en un buffer tris-tricina 50 mM pH 8,8 a 37° C, siguiendo el aumento de abs. a 687 nm en función del tiempo de reacción. La cantidad de sustrato utilizada produce una absorbancia inicial de 0,3 a 687 nm. La unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que se necesita para aumentar la Abs 687 nm en 1 unidad por minuto en las condiciones mencionadas.

	U/mL $\delta Abs_{687nm}/min.mL$	U/g(promedio) $\delta Abs_{687nm}/min. mL$	% Actividad (rendimiento)
Extracto crudo	0,097 ± 0,006	0,628	100
Precipitado 40% (NH₄)₂SO₄	0,2784 ± 0,008	0,1546	24,62
Corte 40-90 %	0,9517 ± 0,009	0,5135	81,77
Calentamiento (100° C/ 10 min)	0,0368 ± 0,005		0
Dializado (12 kD)	0,0032 ± 0,0005		0

Las medidas de actividad MDS se realizaron según el método descrito por Vicentini y col. (1996). Cuando una alícuota del extracto concentrado y parcialmente purificado (corte 40-90%) se incubó a pH 8,8 y 37° C en presencia de cantidad adecuada de clorofilina (absorbancia inicial a 687 nm de 0,30), se observaron modificaciones en el espectrograma de la mezcla durante el transcurso de la reacción. Se encontró que la absorbancia disminuyó a 646 nm y aumentó a 690 nm (**Figura II.1-A**). Esta modificación en el espectrograma correspondiente a la mezcla de reacción, puede explicarse en base a la reacción que cataliza la actividad MDS (**Figura II.2-**).

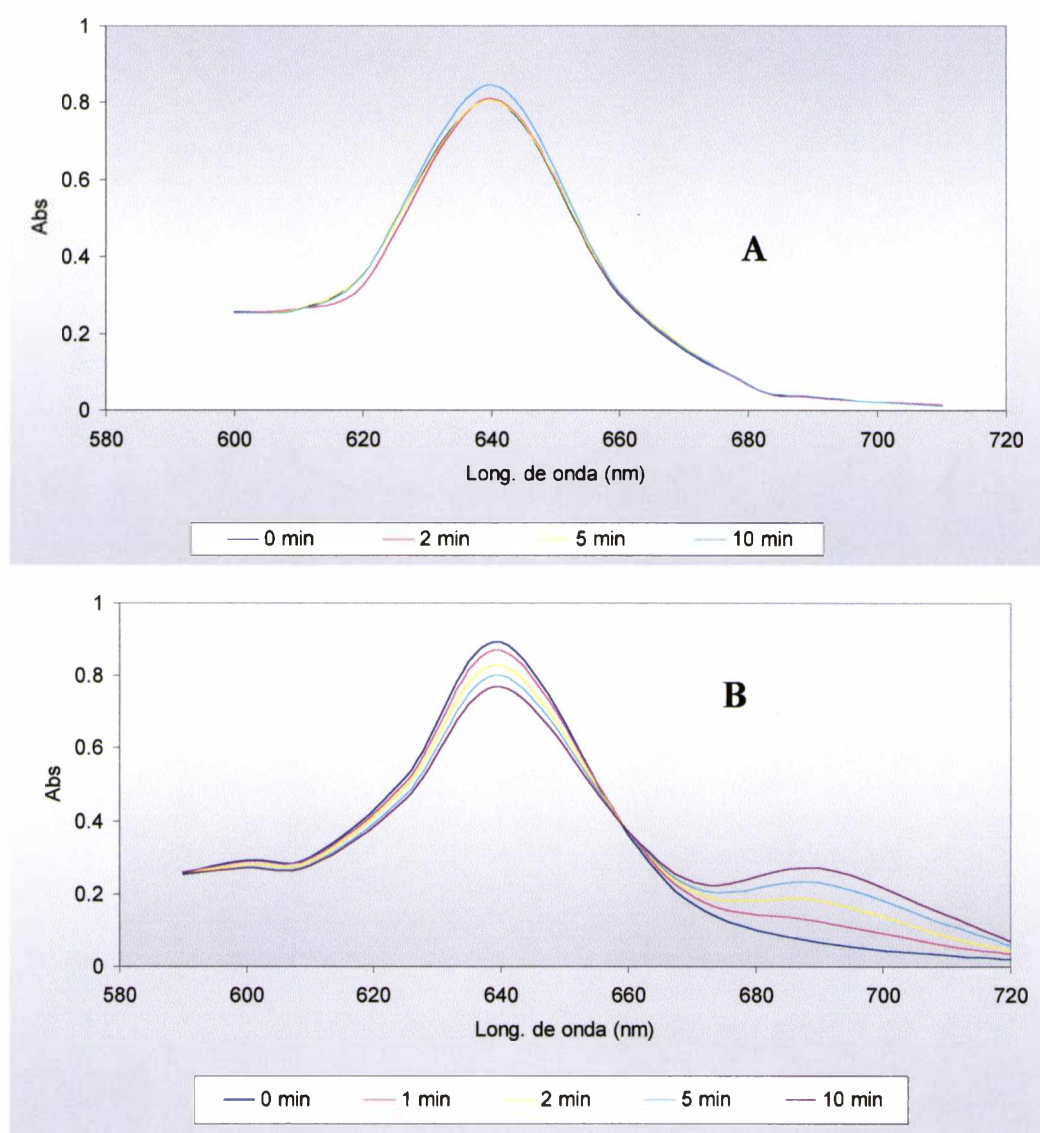


Figura II.1- Espectrograma de la mezcla de reacción en función del tiempo de reacción en ausencia (A) y en presencia (B) de extracto parcialmente purificado de brócoli (corte 40-90%).

Como consecuencia de la actividad MDS la clorofilina (pigmento verde oscuro) pierde el átomo central (Mg^{+2}) del anillo tetrapirrólico, transformándose en un derivado de clorofilina sin Mg^{+2} similar a feofórbido (pigmento verde pardo). Este cambio en la estructura química de la clorofilina produce un cambio en su espectrograma: disminuye el pico a 646 nm y aparece un nuevo pico a 690 nm. Los cambios mencionados en el espectrograma no se observaron cuando las mezclas de reacción fueron estudiadas en ausencia de extracto MDS (**Figura II.1-B**). A partir de este resultado, dado que el máximo del pico que aparece como consecuencia de la reacción se registró a 690 nm se eligió esta longitud de onda para medir la actividad MDS en todas las determinaciones que se realizaron posteriormente (Vicentini y col., utilizaban 687 nm).

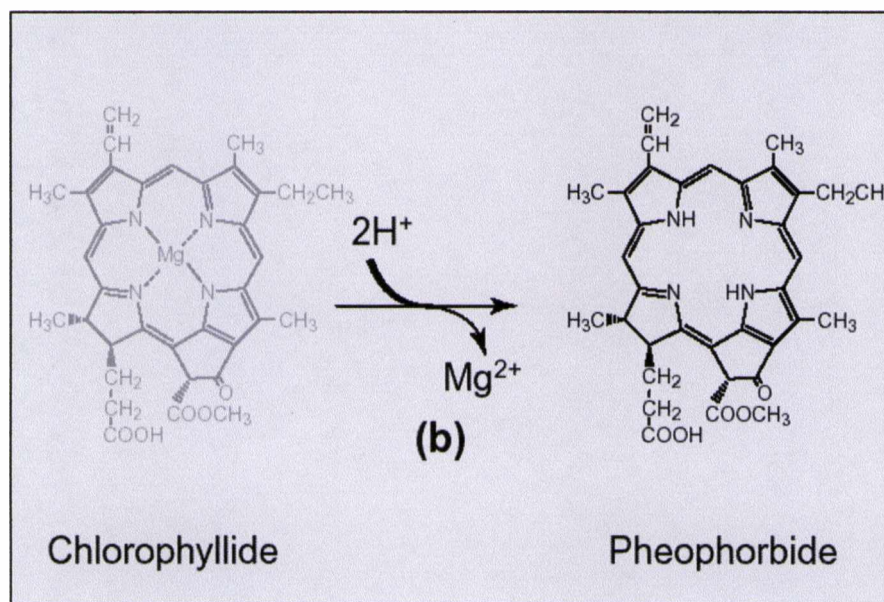


Figura II.2.

Reacción catalizada por la actividad MDS.
 Adaptada de Trends in Plant Science, 2002, Otha y col.,
 Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed?"

Por otra parte se realizó un control del efecto de los diferentes compuestos presentes en la mezcla de reacción sobre la clorofilina utilizada como sustrato (**Tabla II.3**).

Tabla II.3- Efecto de la composición de la mezcla de reacción utilizada para medir la actividad MDS sobre la estabilidad de la clorofilina. Se prepararon las mezclas correspondientes en presencia de sustrato y se incubaron a 37° C y pH 8.8. Se midió el aumento de la absorbancia a 690 nm por min.

Mezcla de reacción	Actividad MDS ($\delta \text{ Abs}_{690\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1}$)
50 mM Tris/Tricina = A	0,0001 \pm 0,0000
A + 0,1% Tritón X-100	0,0008 \pm 0,0001
A +0,1 M fosfato+0,1% Tritón X-100	0,0017 \pm 0,0002
A + 0,1 M fosfato + 0,1% Tritón X-100 + 0,25 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ = B	0,0225 \pm 0,0009
Extracto (40-90%) disuelto en A	0,4024 \pm 0,0015
Extracto (40-90%) disuelto en B	0,8650 \pm 0,0018

Los resultados de la tabla II.3- indican que la presencia de buffer tris-tricina, tritón X-100 y fosfato 0,1 M, no producen cambios importante en la absorbancia a 690 nm. Solamente se observó actividad MDS en aquellos casos en que se agregó extracto concentrado de brócoli (corte 40-90 %). La presencia de sales de amonio aumenta la actividad MDS, lo que podría explicarse por dos razones diferentes. La primera sería que las sales de amonio acidifican ligeramente el medio y la clorofilina pierde su átomo de Mg⁺² inespecíficamente, pero como puede observarse en la tabla la acción inespecífica de las sales de amonio es baja respecto a la actividad que se obtuvo en presencia del extracto. La otra explicación posible sería que la mayor fuerza iónica del medio aumentó la eficiencia de MDS.

2- Determinación de la Temperatura óptima para la actividad MDS

Se midió la actividad la actividad MDS (corte 40-90%) a diferentes temperaturas (Figura II.3). Se observó un aumento de la actividad con la temperatura en el rango desde

20° C hasta alcanzar el máximo valor a 50°C, a partir de este valor la actividad disminuye nuevamente. Este comportamiento corresponde al típico comportamiento de actividad enzimática en función de la temperatura ya que la actividad de una enzima de naturaleza proteica aumenta con la temperatura tal como lo indica la ecuación de Arrhenius, pero cuando las temperaturas son muy elevadas se produce la desnaturalización de la proteína por lo que disminuye la actividad. La temperatura óptima obtenida para la actividad MDS de brócoli fue 50° C.

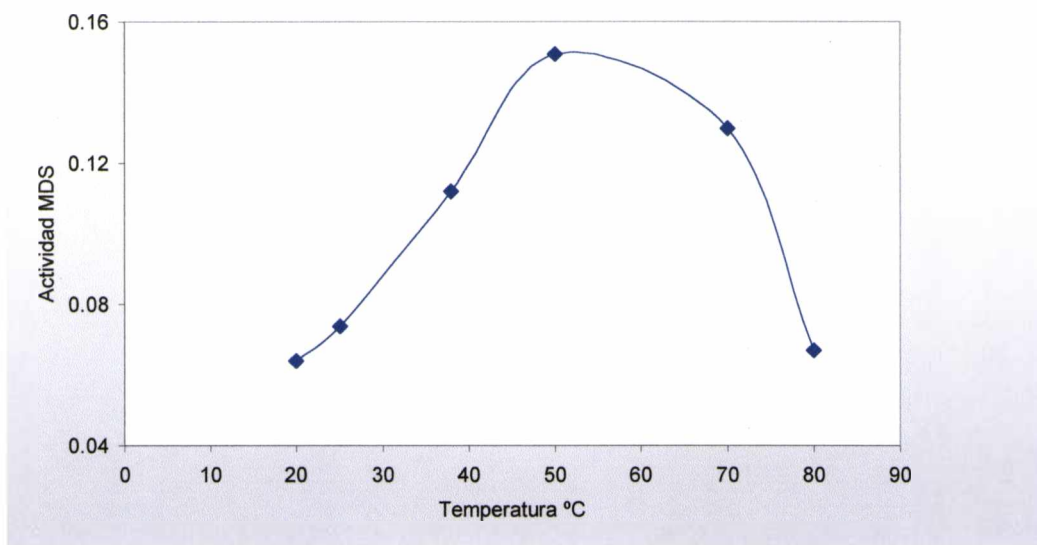


Figura II.3- Medida de la actividad MDS en función de la temperatura. La actividad MDS se expresó como el aumento de $Abs_{690\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$ en la siguiente mezcla de reacción: 0.075 ml de extracto, 0.025 ml de clorofilina y 0.4 ml de buffer pH 8.8, incubada a 37° C.

3- Determinación del pH óptimo para la actividad MDS

Se midió la actividad MDS (corte 40-90%) en distintas condiciones de pH, con el fin de obtener el pH óptimo en dos sistemas buffer diferentes: $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM (**Figura II.4**) y tris-tricina, 50 mM (**Figura II.5**). En ambos sistemas se observó un descenso de la actividad a pHs extremos. El pH óptimo para la actividad MDS en buffer fosfato fue 7,5; resultado coincidente con los obtenidos para la actividad MDS de *Chenopodium album* (Shioi y col., 1996). El pH óptimo en tris-tricina fue cercano a 8, valor

ligeramente inferior al que se encontró para la actividad MDS de *Brassica napus* (Vicentini y col., 1995).

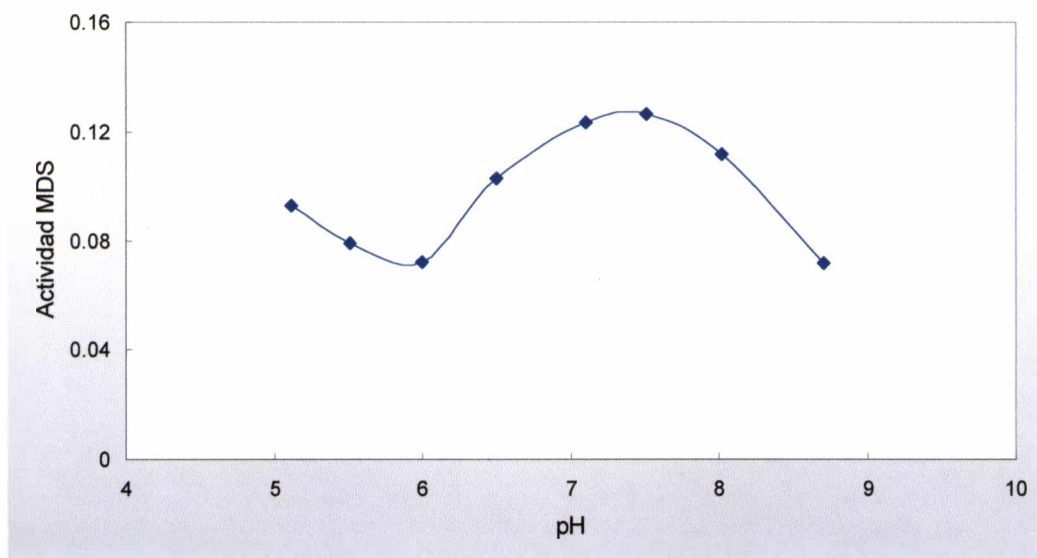


Figura II.4- Medida de la actividad MDS en función del pH, en el sistema buffer fosfato. La actividad MDS se expresó como el aumento de Abs_{690 nm}·min⁻¹.

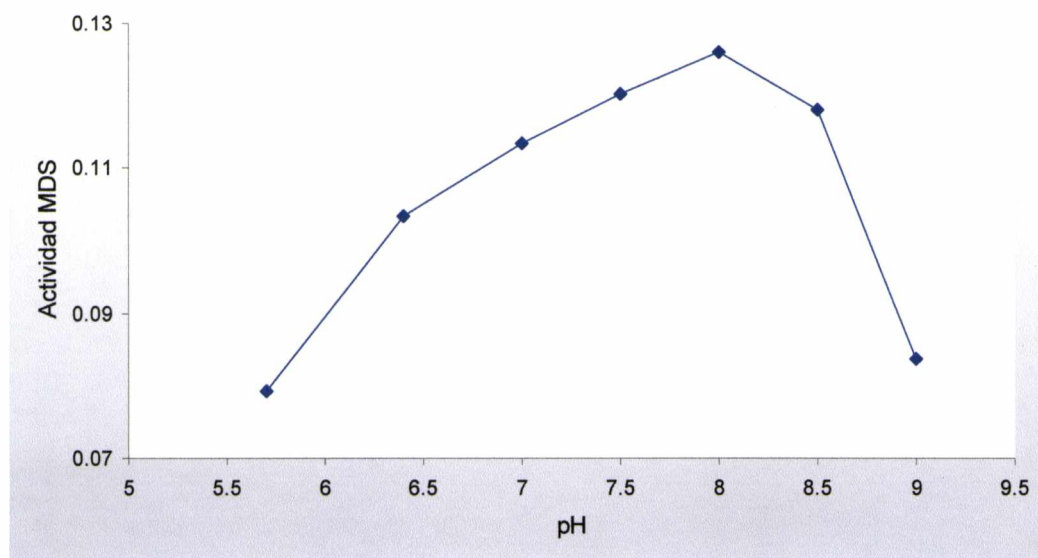


Figura II.5- Medida de la actividad MDS en función del pH, en un sistema buffer tris/tricina. La actividad MDS se expresó como el aumento de la Abs_{690 nm}·min⁻¹.

4- Efecto de activadores e inhibidores sobre la actividad MDS

Se analizó el efecto de diferentes compuestos sobre la actividad MDS (Tabla II.4). El agregado de EDTA en el medio de reacción aumentó la actividad MDS posiblemente porque disminuye la concentración de Mg^{+2} , que es un producto de la reacción enzimática. El agregado de $MgCl_2$ 10 mM disminuyó la actividad MDS un 50 %, lo cual se debería a la presencia del Mg^{+2} en el medio de reacción el cual es un producto de la reacción catalizada. Este resultado es similar a lo descrito por Vicentini y col. (1995). Se realizó una medida de la actividad MDS en presencia de KCl para descartar la posibilidad de que el responsable de la inhibición fuera el ión Cl. Los resultados obtenidos indican claramente que la inhibición se debería a Mg^{+2} ya que la presencia de KCl aumentó significativamente la actividad MDS.

Tabla II.4- Efecto de diferentes compuestos en la mezcla de reacción sobre la actividad de MDS.

Componente	Concentración	MDS
	(mM)	(% actividad respecto al control)
Control	-	100
KCl	21,2	274
KCl	10	105
$MgCl_2$	2	125
$MgCl_2$	9,82	57
$Mg SO_4$	5	97
$HgCl_2$	1,62	100
$HgCl_2$	3,65	0
EDTA	2,10	295
H_2O_2	1,2	140
Glutación reducido	1,2	30

La inclusión de Hg^{+2} 3,6 mM en la mezcla de reacción claramente disminuyó la actividad MDS, este resultado sugiere la presencia de un grupo -SH en el sitio activo de la enzima, tal como fuera sugerido por Vicentini y col.(1995) para la actividad MDS en cotiledones de colza. Por otra parte se encontró un aumento de la actividad MDS en presencia de H_2O_2 mientras que la presencia de glutatión reducido la inhibió.

Los resultados obtenidos sugieren que en el sitio activo de la enzima participarían grupos –SH y que además resultaría importante el estado rédox de los mismos para la actividad.

5- Determinación de la masa molecular

Con el fin de determinar la masa molecular del compuesto con actividad MDS, se realizó una cromatografía de exclusión molecular, utilizando como fase estacionaria Sephacryl 200 cuyo rango de resolución para proteínas es $10^3 - 10^6$ Da. Se utilizó como fase móvil buffer fosfato pH 6,88. Se detectó una fracción con actividad MDS (MDS I) a un volumen de elusión (V_e) de 68 ml (**Figura II.6**) y otra fracción adicional (MDS II) a 47 ml cuya actividad corresponde a un 25% de la actividad encontrada en 68 ml. Para determinar la masa molecular de ambas fracciones, se realizó una curva de calibración utilizando patrones de masa molecular conocida (**tabla II.5**). La masa molecular (MM) que corresponde al volumen de 47 ml fue de 18890 Da. Para el volumen de elusión (V_e) de 68 ml la masa molecular estimada fue 1780 Da. Este valor está por debajo del límite de resolución de la resina utilizada (S-200), por lo que para determinar su masa molecular se utilizó otra fase estacionaria: Superdex 30, la que permite resolver masas moleculares menores de 10000 Da. Utilizando esta resina, se detectó una pequeña actividad MDS en el volumen muerto (V_0) pero la mayor actividad MDS se detectó en una fracción que corresponde a un volumen de elusión (V_e) de 58 ml. La actividad que se detectó en el volumen muerto corresponde a la actividad MDS II, cuya masa molecular es 18800 Da, y que por lo tanto es mayor que el rango de separación de la resina Superdex 30 (**Figura II.7**). La MM correspondiente al volumen 58 ml fue de 2183 Da y se determinó utilizando los patrones correspondientes (**tabla II.6**).

Tabla II.5- Curva de calibración para la determinación de la Masa Molecular de MDS (Resina S-200)

	Masa Molecular (Da)	Log. MM	V_e mL	V_e/V_0
Blue Dextrán	250000	5,39	26	1
Albúmina	66000	4,81	36	1,38
Anh. Carbónica	29000	4,46	43	1,65
Ribonucleasa	13500	4,13	50	1,92
MDS II	18782,35	4,27	47	1,81
MDS I	1737,02	3,24	68	2,61

Tabla II.6- Curva de calibración para la determinación de la Masa Molecular de MDS (Resina Superdex-30)

	Masa molecular (Da)	Log MM	Ve mL	Ve/V0
Citocromo c	12400	4,09	26	1
Aprotinina	6500	3,81	42	1,61
Gastrina I 14-17	546	2,74	82	3,15
Pentaglicina	303	2,48	100	3,85
MDS II			26 (V0)	1
MDS I	2183	3,40	58	2,23

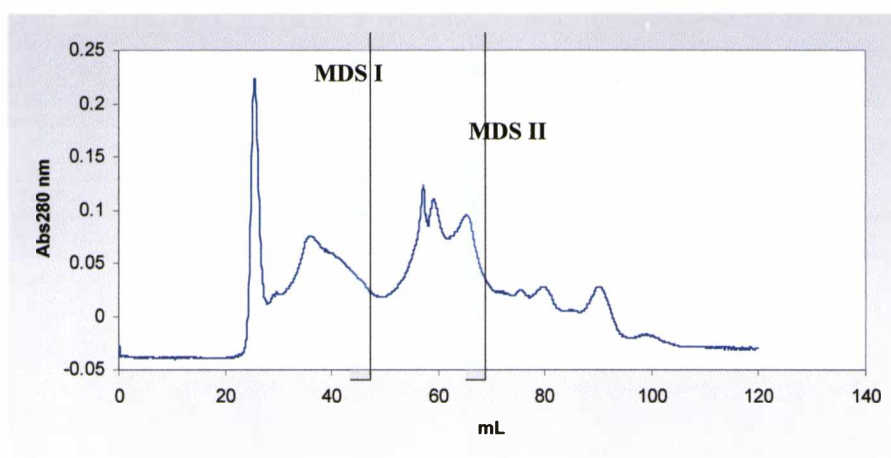


Figura II.6- Cromatograma obtenido utilizando como fase estacionaria la resina Sephacryl-200. El detector registró la absorbancia a 280 nm. El área sombreada indica los volúmenes de retención que presentaron actividad MDS.

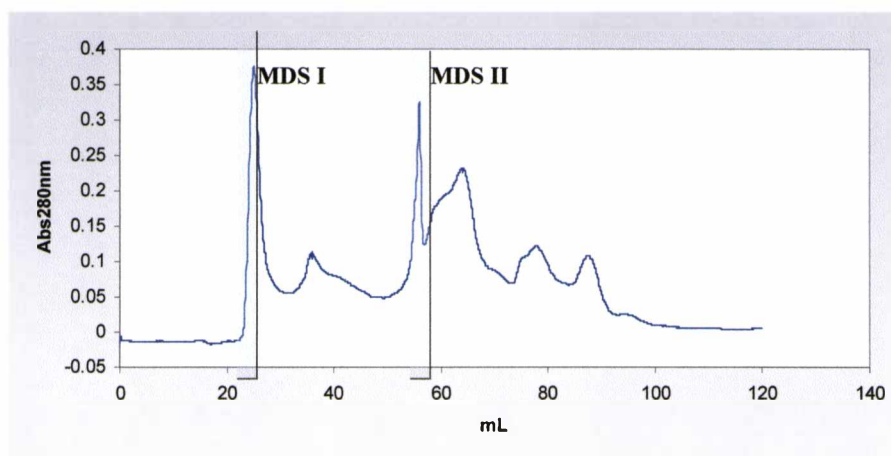


Figura II.7- Cromatograma obtenido utilizando como fase estacionaria Superdex-30. El detector registra la absorbancia a 280 nm. Las áreas sombreadas corresponden a los volúmenes que presentaron actividad MDS.

La actividad MDS II, que se obtiene a la salida de una cromatografía de exclusión molecular, no se inactivó por tratamiento a 100° C durante 10 y 30 min. Estos resultados sugieren que el compuesto de muy baja masa molecular se comporta como un compuesto termoestable.

6- Tratamiento con proteasas

Hasta el presente no hay información disponible sobre la estructura química de la actividad MDS. Shioi y col. (1996) propusieron que posiblemente se trate de un péptido pequeño. En consecuencia, se realizaron tratamientos con proteasas con el fin de analizar la posibilidad de que a pesar de tratarse de una molécula de muy baja masa molecular, pueda ser de naturaleza peptídica. Para ello, extractos parcialmente purificados luego de la cromatografía de exclusión molecular, fueron incubados con proteinasa K o papaína (Tabla II.7-). La actividad MDS disminuyó aproximadamente un 45 % mediante el tratamiento con proteinasa K, mientras que el tratamiento con papaína aparentemente no la afectó. Estos resultados pueden explicarse considerando que, si la sustancia en cuestión es un péptido de masa molecular cercana a 2100 Da debería estar formado por aproximadamente 12 aminoácidos. Por esta razón es altamente probable que en una secuencia tan corta, exista algún sitio de corte para proteinasa K pero no para papaína.

Tabla II.7- Efecto del tratamiento con proteasas sobre la actividad MDS.

Se utilizaron extractos parcialmente purificados mediante precipitación con sulfato de amonio y sometidos a cromatografía de exclusión molecular. Se incubaron en presencia de proteasas a 37° C durante 20 h. Se midió la actividad MDS residual, midiendo la $Abs_{687nm} \cdot min^{-1}$

Tratamiento	% actividad MDS residual
Control (sin agregado de proteasas)	100
Proteinasa K	54 ± 2.5
Papaína	95.5 ± 3.6

7- Determinación del rendimiento y purificación de los pasos realizados

En la tabla II.8- se presentan los resultados obtenidos para el rendimiento y purificación de cada etapa de purificación realizada.

La precipitación con sulfato de amonio es un paso que claramente permitió concentrar la actividad MDS, logrando un muy buen rendimiento. La cromatografía de exclusión molecular presentó un bajo rendimiento pero nos permitió purificar la actividad MDS aproximadamente 13 veces. Cabe mencionar que la cromatografía de exclusión molecular generalmente no da un resultado satisfactorio como paso de purificación, pero en el caso de la actividad MDS, por tratarse de una masa molecular muy baja nos permite eliminar gran cantidad de material proteico, dado que la mayoría de las proteínas poseen masa moleculares mayores.

Tabla II.8- Tabla de purificación parcial de la actividad MDS

	Actividad **U/mL	Actividad total **U	Proteínas mg/ml	Proteínas totales	**U/mg Act. esp.	Rendimiento	Veces que se purificó
Extracto crudo	0,135	19,57	0,280	40,6	0,1964	100	1
Corte 40/90	1,013	15,2	0,862	12,93	1,1752	77,67	5,98
Salida FPLC*	0,1247	2,244	0,047	0,846	2,6531	14,76	13,49

* corresponde a la actividad MDS I.

**U: $\delta \text{ Abs}_{690 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$

La actividad MDS de brócoli se pudo purificar aproximadamente 13 veces mediante dos pasos de purificación: precipitación selectiva con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular.

La caracterización de la actividad MDS de brócoli arrojó resultados poco habituales y diferentes al comportamiento esperado para una enzima clásica. Sin embargo, Shioi y col.(1996) también habían encontrado propiedades muy particulares en la caracterización de MDS de *Chenopodium album*. Estas peculiaridades llevaron a preguntarnos si estas características sólo se observan en estos sistemas, o si se trata de propiedades generales de la actividad MDS en cualquier sistema que presente una importante degradación de clorofilas. Por tal razón se realizó una caracterización y purificación parcial de la actividad MDS en frutillas verdes, con el objetivo de comparar las características de la actividad MDS en ambos sistemas.

Los resultados obtenidos se presentan como un anexo del capítulo II de la tesis.

Anexo II. Caracterización de la actividad Mg-Dequelatasa de frutilla (*Fragaria x ananassa*)

OBJETIVO

“Detectar y caracterizar la actividad MDS de frutillas y compararla con la actividad MDS de brócoli.”

MATERIALES Y MÉTODOS

1-Material vegetal

Se trabajó con frutillas (*Fragaria x ananassa*, Duch., c.v. Selva), las que fueron obtenidas de productores de la zona de La Plata. Los frutos se cosecharon y se clasificaron de acuerdo a la coloración externa y al tamaño en diferentes estados de maduración: verde pequeño, verde grande, blancos, virados y maduros. Los frutos se lavaron con agua, se secaron, y se utilizaron inmediatamente o bien se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80° C. Para la caracterización de la actividad MDS de frutillas se utilizaron los frutos verde pequeños.

2-Preparación del extracto para medir la actividad Mg- Dequelatasa

Aproximadamente 25 g de frutos congelados se homogeneizaron en un Omnimixer con 100 ml de buffer de extracción de la siguiente composición: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,1 M; pH 7.02; PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo) 1 mM; tritón X-100 0,1% (v/v); PVPP (polivinil polipirrolidona) 30 g/l. Se procedió según lo indicado en Materiales y Métodos, II.3-2, pero la fracción con la que se trabajó fue la que precipitó entre 45-90 % de (NH₄)₂SO₄.

3-Preparación del sustrato (clorofilina)

Se procedió de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos II.3-4.

4- Medida de la actividad MDS

Se preparó una mezcla de reacción con 100 µl de extracto en buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, 50 µl de clorofilina y 350 µl de buffer tris-tricina 50 mM, pH 8,8 y se incubó 37° C. Se midió el aumento de la absorbancia a 687 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

5- Medida de la actividad MDS en función del pH

Se procedió de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos **II.3-6**.

6- Medida de la actividad MDS en función de la temperatura

Se procedió de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos **II.3-7**.

7- Medida de la actividad MDS en presencia de efectores (activadores /inhibidores)

Se ensayó la actividad MDS en presencia de diferentes compuestos, para ello se prepararon mezclas de reacción según lo detallado en el punto 4 de esta sección y se agregó al medio de reacción EDTA (10mM), KCl (2,5 mM), MgCl_2 (2,5 mM), HgCl_2 (2,5 mM), H_2O_2 (1,5 mM) ó glutatión reducido (1,5 mM).

8- Cromatografía de exclusión molecular

Se procedió de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos **II.3-9**.

9- Tratamiento con proteasas

Se procedió de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos **II.3-10**.

10- Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Lowry modificado según Potty (1969) para la medida de proteínas en las muestras utilizando albúmina bovina como patrón.

11- Diseño experimental

Las experiencias completas se realizaron tres veces. En cada experiencia los extractos se prepararon por duplicado y todas las medidas de actividad se realizaron por triplicado para cada punto. Se calcularon las medias y sus desvíos estandard.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1- Medida de la actividad MDS en un extracto de frutillas

La actividad MDS en un extracto crudo de frutillas fue muy baja ($0,018 \pm 0,005 \delta\text{Abs}_{687} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), pero la concentración y purificación parcial mediante un fraccionamiento con sulfato de amonio, permitió aumentar significativamente la actividad ($0,22 \pm 0,012 \delta\text{Abs}_{687} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Mediante el fraccionamiento con sulfato de amonio, se eliminaron gran cantidad de pectinas en la fracción que precipitó entre 0 y 45 % (Civello y col., 1995) mientras que la actividad MDS se recuperó en la fracción 45-90 %.

Cuando una alícuota del corte 45-90 % se puso en contacto con clorofilina, se observó una modificación del espectro de absorción de la clorofilina en función del tiempo de reacción similar a lo que se observó con el corte (40-90) de brócoli. Se observó un aumento de la absorbancia a 687 nm y un descenso a 646 nm (Figura I). Estos cambios en el espectro de absorción corresponden a la disminución de

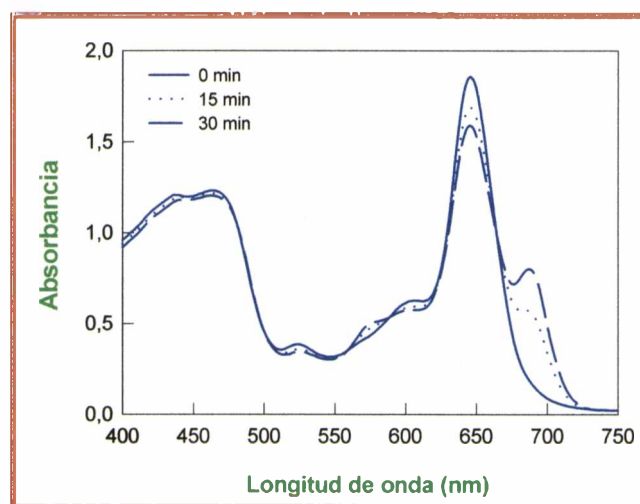


Figura I. Cambios en el espectro de absorción de clorofilina en función del tiempo de reacción en presencia de una alícuota del corte 45-90 %.

clorofilina y la formación del derivado de clorofilina sin Mg^{+2} (similar a feoforbido), tal como se ha mencionado en el capítulo II. La actividad MDS se midió como el aumento de la absorbancia a 687 nm (de acuerdo con Vicentini y col., 1995).

Se analizó el comportamiento de la actividad MDS sometida a calentamiento a 100°C durante 10 min y se observó que la actividad disminuyó aproximadamente un 80 %. Cuando se realizó una diálisis utilizando una membrana de corte 10000 Da, la actividad MDS se perdió totalmente tal como ocurrió con el extracto de brócoli. Estos resultados llevaron a pensar, nuevamente, que al igual que en el caso de brócoli, la fuerza iónica del medio en el que se encuentra MDS afecta su comportamiento. A partir de estos resultados se preparó el extracto MDS de frutillas en dos condiciones diferentes: alta fuerza iónica (0,8M) y baja fuerza iónica (0,055 M). Se realizó el calentamiento a 100°C durante 10 min

en los dos extractos y además se realizaron ultrafiltraciones utilizando concentradores cuyos filtros tienen corte 10000 Da (centrifugación durante 18 h, a 4° C y 6000 $\times g$). Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla I**.

Tabla I. Efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de atravesar un filtro de 10000 Da y sobre la estabilidad frente al calentamiento.

La actividad MDS se midió siguiendo el aumento de la absorbancia (Abs) a 687 nm por min, de una mezcla de reacción que contenía buffer tris/tricina, 50mM, pH 8,8 y cantidad de clorofilina como para lograr una Abs inicial de 0.25; siendo 37° C la temperatura de incubación. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un aumento de Abs de una unidad por min. Se determinaron los % de actividades relativas a sus respectivos controles.

	MDSbaja fuerza iónica: 0,055 M	MDSalta fuerza iónica: 0,8 M
Control	100	100
Filtrado (corte 10000 Da)	55 \pm 2	15 \pm 1,8
Calentamiento (100° C/10 min)	87 \pm 1,5	15 \pm 1,8
Filtrado + calentamiento	57 \pm 2	-----

Los resultados obtenidos indicaron que en baja fuerza iónica la actividad MDS de frutillas se comporta como un compuesto de baja masa molecular (atraviesa un filtro de 10000 Da) y que es termoestable ya que la actividad se mantiene luego del calentamiento. En alta fuerza iónica, la actividad MDS de frutillas se comportó como un compuesto de alta masa molecular, ya que no fue capaz de atravesar el filtro y por otra parte la actividad disminuyó por efecto del calentamiento. Estos resultados sugieren que se trata de un compuesto de baja masa molecular que en condiciones de alta fuerza iónica se asocia a otro compuesto lo que hace que se comporte como de alta masa molecular. Estas sugerencias son coincidentes con las dadas por Shioi y col.(1996) quienes propusieron que la actividad MDS está asociada a un compuesto de baja masa molecular y que se asocia a compuestos proteicos que serían responsables de la inactivación que se produce cuando un extracto crudo con actividad MDS se calienta a 95 ° C durante 5 min.

Cabe mencionar que a partir de estos resultados se intentó obtener extractos con actividad MDS de brócoli en condiciones de baja fuerza iónica (0,050; 0,025 y 0,012 M), los que fueron sometidos a ultrafiltración pero no se logró que la actividad MDS atravesara el

filtro. De todos modos la actividad MDS de brócoli siempre se pierde por diálisis. El comportamiento en ambos sistemas se ve influenciado por la fuerza iónica, pero en el caso de frutillas aparentemente la asociación del compuesto de baja masa molecular a otros compuestos sería posiblemente más lábil que en el caso de brócoli.

2- Medida del pH óptimo para la actividad MDS de frutillas

Se realizó el análisis de la variación de la actividad MDS en función del pH para las dos condiciones de fuerza iónica: 0,055 M y 0,8 M.

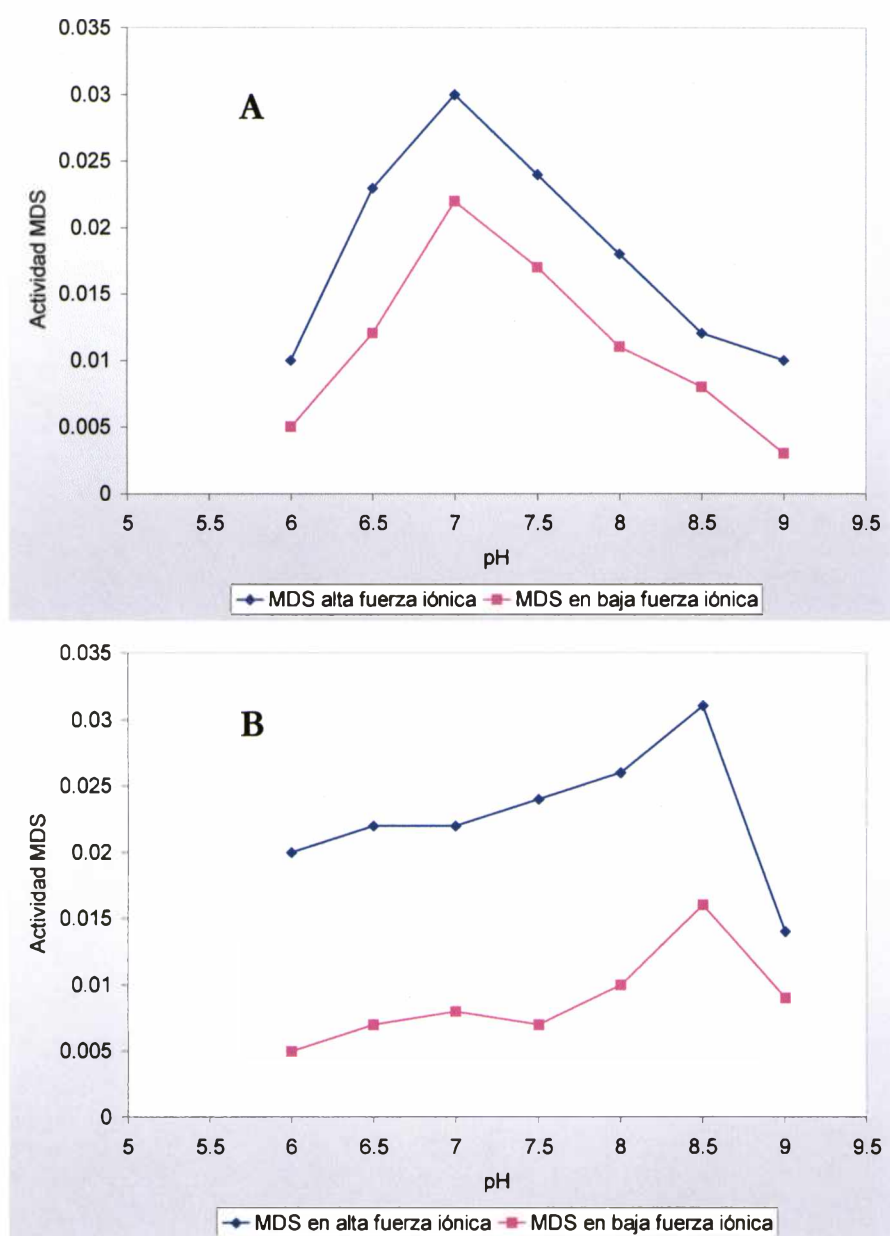


Figura II- Medida de la actividad MDS de frutillas en función del pH.
A: buffer fosfato y B: buffer tris / tricina. ($\delta\text{Abs}_{687\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1}$)

La variación de actividad con el pH fue similar en ambas condiciones de fuerza iónica, pero los valores de actividad fueron siempre superiores en el caso de alta fuerza iónica (**Figura II**). Se analizó el comportamiento utilizando dos sistemas buffer: fosfato y tris/tricina. El pH óptimo para la actividad MDS fue 7,1 en buffer fosfato y 8,8 en tris/tricina. Los valores son similares a los obtenidos para la actividad MDS de brócoli, los que fueron 7,5 y 8,0 respectivamente.

3- Medida de la temperatura óptima para la actividad MDS de frutillas

Se analizó el cambio de la actividad MDS de frutillas en función de la temperatura de incubación para las dos condiciones de fuerza iónica: 0,055 y 0,8 M (**Figura III**).

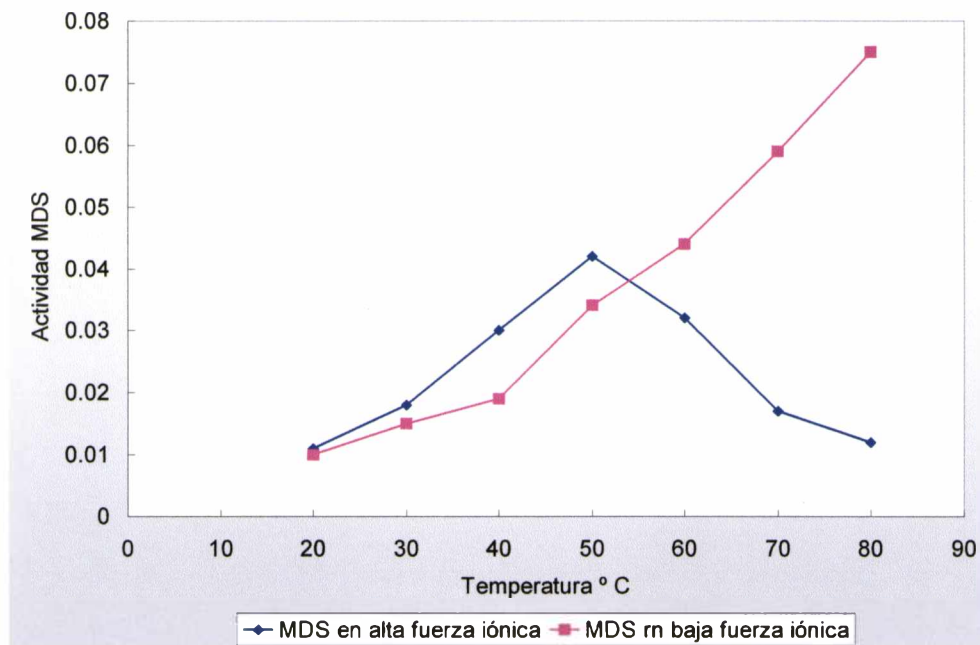


Figura III- Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad MDS de frutillas. Se realizó la medida de actividad según lo descrito en el punto 4 de materiales y métodos. La actividad se expresó como $\delta\text{Abs}_{687} \cdot \text{min}^{-1}$

La actividad MDS de frutillas en baja fuerza iónica se comportó no sólo como un compuesto termoestable, sino que además, la actividad aumentó al aumentar la temperatura de incubación (**Figura III**). Por el contrario en alta fuerza iónica la actividad MDS presentó un comportamiento típico de las actividades enzimáticas de naturaleza proteica, siendo la temperatura óptima para su actividad 50° C.

4- Medida de la actividad MDS en presencia de efectores (activadores/inhibidores)

Se analizó el efecto de la presencia en la mezcla de reacción de diferentes compuestos (Tabla 2). Se encontraron resultados similares a los obtenidos para la actividad MDS de brócoli: la presencia de EDTA aumentó la actividad posiblemente por su capacidad de formar complejos con el Mg^{+2} ; la presencia de $MgCl_2$ 2,5 mM disminuyó la actividad posiblemente porque el Mg^{+2} es un producto final de la reacción catalizada por MDS. La presencia de Hg^{+2} (2,5 mM) inhibió marcadamente la actividad MDS, este resultados sugiere la presencia de grupos SH- en el sitio activo de la enzima. La presencia de H_2O_2 aumentó fuertemente la actividad mientras que glutatión reducido la inhibió. Nuevamente los resultados sugieren la presencia en el sitio activo de alguna función orgánica susceptible a reacciones de óxido reducción lo que modificaría la actividad MDS.

Tabla 2. Efecto de diferentes compuestos presentes en la mezcla de reacción sobre la actividad MDS de frutilla.

Efactor	Concentración mM	%Actividad MDS
Control		100
KCl	2,5	100
$MgCl_2$	2,5	65
$HgCl_2$	2,5	8
EDTA	10	200
H_2O_2	1,2	160
Glutatión reducido	1,2	30

5- Determinación de la masa molecular

La determinación de la masa molecular del compuesto con actividad MDS se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular, utilizando como fase estacionaria una resina Superdex-30 que separa moléculas de masa molecular menor a 10000 Da. Se utilizaron las mismas condiciones de elusión que en el caso de MDS de brócoli y

se calibró la resina con los mismos patrones (**Figura IV**). En esas condiciones el valor de masa molecular correspondiente a la actividad MDS de frutillas fue 2180 ± 20 .

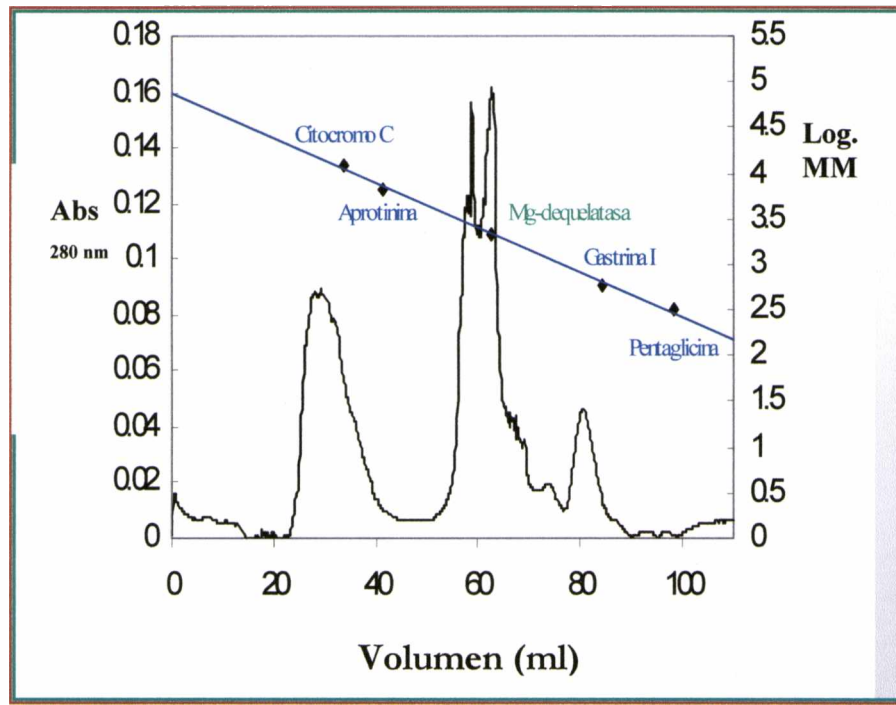


Figura IV. Cromatograma obtenido por medio de la cromatografía de exclusión molecular utilizando Superdex-30 como fase estacionaria. La columna fue equilibrada con buffer fosfato 0,1 M y pH 7. Se sembró 2 ml de muestra y se recogieron fracciones de 1 ml a la salida de la columna. Se detectó la absorbancia a 280 nm a la salida de la columna y se midió la actividad MDS en cada fracción de 1 ml. La mayor actividad MDS se encontró en un Volumen de elusión de 60 ml.

6- Tratamiento con proteasas

Se realizaron tratamientos con proteasas, incubando extractos parcialmente purificados por cromatografía de exclusión molecular con proteinasa K o papaína (**Tabla 4**). La actividad MDS fue disminuída aproximadamente un 55 % mediante el tratamiento con proteinasa K, mientras que el tratamiento con papaína disminuyó la actividad sólo un 7 %. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para MDS de brócoli, lo que sostiene la posibilidad de que se trata de un compuesto de naturaleza proteica.

Tabla 4- % Actividad MDS residual, luego del tratamiento con proteasas.

Tratamiento	% Actividad MDS
Control	100
Proteinasa K	45 ± 3,4
Papaína	93,1 ± 4,4

**Comparación de los resultados obtenidos para la actividad MDS
de brócoli y frutillas**

En la siguiente tabla se presentan a modo de resumen y comparación todas las características obtenidas para la actividad MDS de brócoli y de frutilla.

	Brócoli	Frutilla
Fraccionamiento con (NH₄)₂SO₄	40 – 90 %	45 – 90 %
Diálisis*	Se pierde	Se pierde
Ultrafiltración*	No se pierde	Se pierde
PH óptimo fosfato	7	7
PH óptimo tris/tricina	8	8,8
Temperatura óptima	50° C	50° C
EDTA	Activador	Activador
MgCl₂	Inhibidor	Inhibidor
HgCl₂	Inhibidor	Inhibidor
H₂O₂	Activador	Activador
Glutatión reducido	Inhibidor	Inhibidor
Masa molecular	2180	2180
Papaína	No degrada	No degrada
Proteinasa K	Degrada	Degrada

* Los valores de corte fueron 10000Da para diálisis y para ultrafiltración.

Podemos especular que la actividad MDS en ambos casos está relacionada con compuestos muy similares dado que ambos poseen características prácticamente iguales. Podemos sugerir que se trata de un compuesto de naturaleza proteica que de acuerdo a la fuerza iónica del medio presenta diferente comportamiento: en baja fuerza iónica es de baja masa molecular, lo que le confiere la capacidad de atravesar filtros de 10000 Da y aún menores y la característica de ser termoestable, mientras que en alta fuerza iónica se comporta como un compuesto de alta masa molecular ya que no puede atravesar filtros

de 10000 Da. Este compuesto de alta masa molecular presenta una temperatura óptima cercana a 50° C. Las curvas de pH obtenidas para la actividad MDS en ambos sistemas fueron similares tanto en buffer fosfato como en buffer tris/tricina.

Por otra parte podemos sugerir la presencia de un grupo capaz de oxidarse o reducirse presente en el sitio activo de MDS, y que el estado redox en que se encuentra dicho grupo afecta directamente a la actividad MDS.

En el caso de brócoli el comportamiento de la actividad MDS durante la diálisis, corresponde al comportamiento de un compuesto de baja masa molecular y ello coincide con el resultado obtenido por cromatografía de exclusión molecular. Sin embargo no se logra que en condiciones de fuerza iónica similares a 0.055 M el compuesto se comporte como de baja masa molecular y atraviese los filtros, siempre se comportó en las ultrafiltraciones como de alta masa molecular. Esto llevó a suponer que la unión entre la actividad MDS y el otro compuesto es más fuerte en el caso de brócoli respecto a lo que se observó en frutillas.

II.5- CONCLUSIONES

- ❖ Se encontró actividad MDS en tejido de brócoli recién cosechado, presenescente y senescente, y se observó que la actividad fue mayor a medida que avanza la senescencia..
- ❖ Dicha actividad está relacionada con un compuesto posiblemente de naturaleza proteica cuya masa molecular sería de aproximadamente 2000 Da.
- ❖ Este compuesto en determinadas condiciones de fuerza iónica se asocia a algún otro compuesto de mayor masa molecular lo que le impide atravesar filtros de 10000 Da.
- ❖ La actividad MDS es fuertemente inhibida por la presencia de iones Hg^{+2} y por otra parte es modificada por la presencia de agentes oxidantes (H_2O_2) y reductores (glutación reducido). Estos resultados sugieren que en la actividad MDS participaría alguna función orgánica, como un grupo SH-, y que su estado redox sería muy importante para la acción de la enzima.
- ❖ La actividad MDS de brócoli se pudo purificar aproximadamente 13 veces mediante dos pasos de purificación: precipitación selectiva con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular.
- ❖ La actividad MDS en brócoli y en frutillas estaría asociada a un compuesto de naturaleza proteica de característica muy similares.

Capítulo III

Efecto del tratamiento
con citoquininas y con etileno
sobre la degradación de clorofilas
durante la senescencia postcosecha
de brócoli

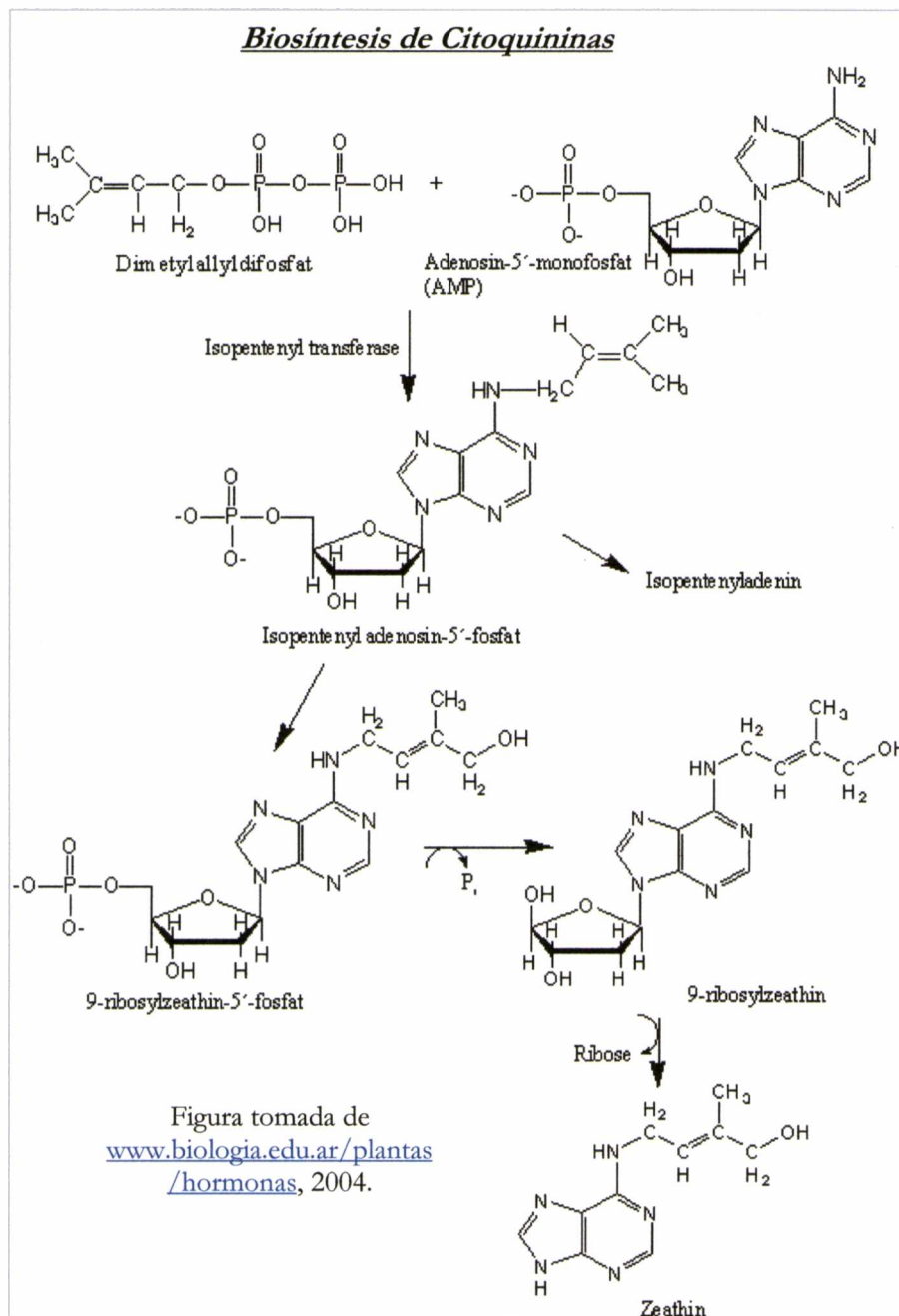


III.1- INTRODUCCION

Citoquininas

Estructura química y biosíntesis:

Las citoquininas son hormonas vegetales cuya estructura química corresponde a compuestos purínicos derivados de adenina, sustituidos en N-6, que se sintetizan a partir



de isopentenil pirofosfato (dimetil alil pirofosfato) y AMP, reacción catalizada por la enzima isopentenyl transferasa (ipt).

La citoquinina más importante de plantas superiores es zeatina. En las células se pueden encontrar en forma libre o conjugada, como ribósidos, ribótidos y glucósidos. Todas las formas conjugadas se transforman enzimáticamente en la libre que es la forma activa de esta hormona. Las citoquininas se sintetizan en raíces y desde allí son llevadas a otras partes de la planta a través del xilema como zeatin ribósidos. Los brotes meristemáticos también sintetizan citoquininas durante la etapa de crecimiento, pero la acción es localizada (Taiz y Zeiger 1998).

Mecanismo de acción:

El mecanismo de acción de las citoquininas es aún desconocido, pero se ha identificado como posible receptor de citoquininas en *Arabidopsis*, una proteína transmembrana relacionada con la familia de histidinas proteasas y con el receptor de etileno ETR1. El gen EIN2 involucrado en las respuestas de etileno, también ha sido identificado en mutantes resistentes a citoquininas lo que indicaría que etileno y citoquininas comparten componentes del camino de señalización de respuestas.

Las citoquininas tienen un marcado efecto sobre la velocidad de síntesis de proteínas, en particular estimulan la síntesis de proteínas específicas de cloroplastos que son codificadas por genes nucleares y sintetizadas en citoplasma. Las citoquininas aumentan la expresión de ciertos ARNm específicos, algunos de ellos aparecerían como señal intracelular de la hormona que transmite la señal.

En algunos sistemas la respuesta inicial a las citoquininas sería un aumento de la concentración de Ca^{+2} en el citoplasma (Taiz y Zeiger, 1998).

Efectos biológicos:

Las citoquininas participan en la regulación de numerosos procesos fisiológicos. En combinación con auxinas, estimulan la división celular. Se ha demostrado que las citoquininas pueden estimular la división celular en cultivos de células maduras de tabaco, cuando en el medio de incubación están presentes además las auxinas. La regulación del ciclo celular y la división celular necesitan la presencia de las dos hormonas: citoquininas y auxinas, pero además la relación entre ambas hormonas determina la diferenciación en raíces y brotes: alta relación auxinas/citoquininas favorece la formación de raíces y baja

relación promueve la formación de brotes (Taiz Zeiger , 1998).

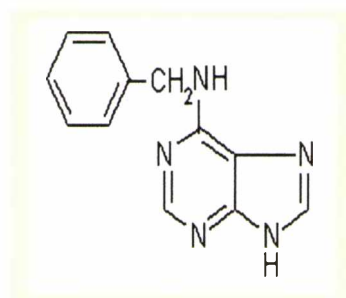
Otra función importante de citoquininas es regular la dominancia apical, lo que determina la forma de las plantas. Si bien la dominancia apical está determinada principalmente por auxinas, las citoquininas juegan un rol importante en la iniciación del crecimiento lateral de los brotes. Por otra parte las citoquininas promueven la expansión celular en diferentes tejidos a través de un aumento de extensibilidad de las paredes celulares(Taiz Zeiger, 1998).

Se ha demostrado que las citoquininas retrasan la senescencia de hojas. Tratamientos con citoquininas sobre plantas enteras de muchas especies han dado como resultado una disminución drástica de los síntomas de senescencia (Van Staden y col., 1988). Hay evidencias que demuestran que las hojas jóvenes pueden sintetizar citoquininas mientras que las hojas maduras no, de modo que éstas dependen de las citoquininas sintetizadas en las raíces para retrasar su senescencia. Las principales citoquininas involucradas en esta acción son zeatin ribósido y dihidrozeatin ribósido las que son transportadas a través del xilema (Noodén y col., 1990). Hasta el presente se conocen muchos genes que se activan durante la senescencia, pero poco se conoce aún sobre como se activan estos genes, como comienza este proceso y como se regula la expresión de dichos genes. Amasino y col. (1995) transformaron plantas de tabaco con un gen quimérico conteniendo un promotor específico de senescencia que conducía la expresión de *ipt*. De esta manera durante la senescencia las plantas transformadas mantenían altos niveles de citoquininas lo provocó un retraso en el comienzo de la senescencia y además autoreguló los niveles de citoquininas.

Otra función importante de las citoquininas es que participa, junto a otros factores como la luz, nutrientes y estado de desarrollo, en la regulación de la síntesis de pigmentos fotosintéticos y proteínas que integran los complejos pigmentos-proteínas necesarios para realizar la fotosíntesis. Cuando hojas etioladas son tratadas con citoquininas antes de ser iluminadas, se forman cloroplastos con granas más desarrolladas y las enzimas fotosintéticas son sintetizadas a mayor velocidad cuando son iluminadas (Taiz Zeiger, 1998) .

BAP

En general, cuando se realizan tratamientos con citoquininas en forma exógena se utilizan citoquininas sintéticas, tales como la Benzil Amino Purina (BAP).

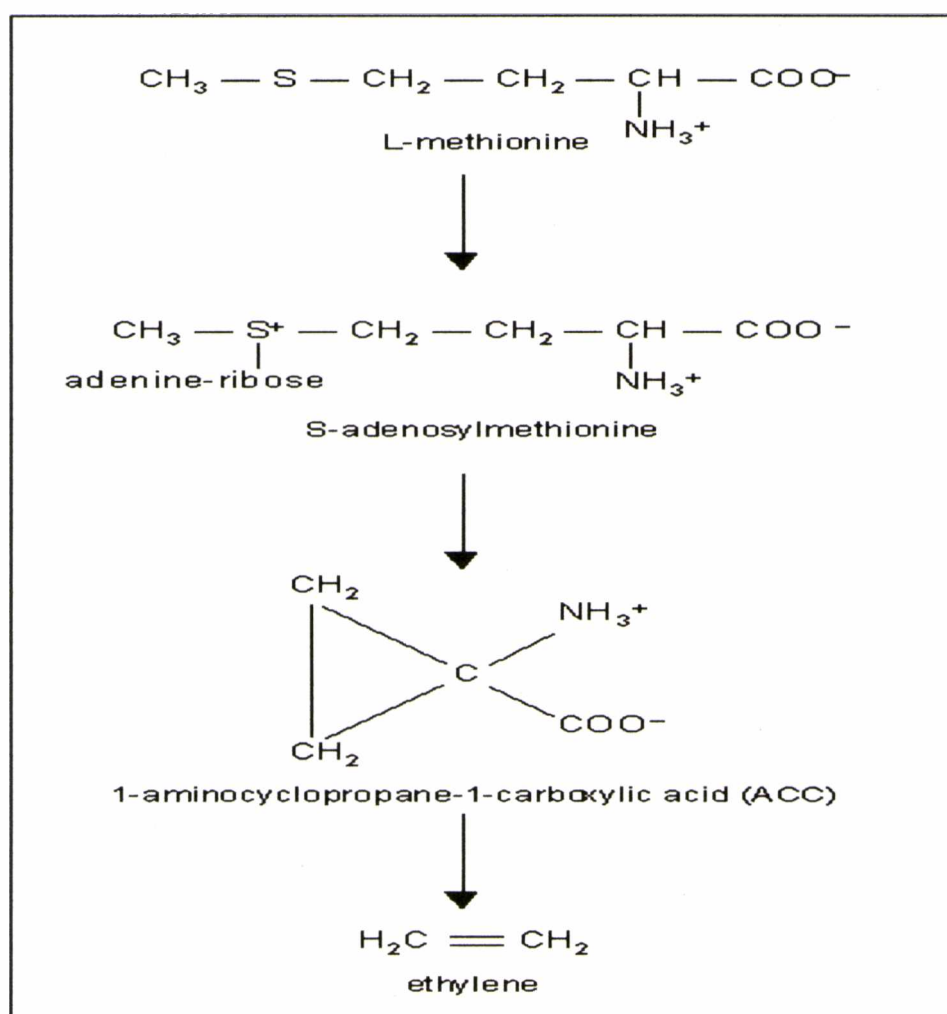


Etileno

Estructura química y biosíntesis:

El etileno es un gas incoloro que en los vegetales superiores actúa como una hormona pudiendo ser sintetizado en la mayoría de los órganos. Durante la senescencia de tejidos y durante la maduración de frutos se producen mayores niveles de etileno que en los tejidos jóvenes o inmaduros.

El precursor de etileno "in vivo" es el aminoácido metionina, el cual se convierte sucesivamente en SAM (S-adenosilmetionina), ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) y finalmente en etileno (Taiz y Zeiger, 1998).



Biosíntesis de etileno: esquema tomado de www.biologia.edu.ar/plantas/hormonas, 2004.

El paso limitante de la síntesis de etileno es la formación de ACC catalizada por la enzima ACC sintasa que requiere como cofactor piridoxal fosfato. Los intermediarios

metionina y SAM forman parte de un ciclo de reacciones que permiten recuperar el sustrato para la síntesis de etileno (ciclo de Yang). La biosíntesis de etileno puede ser estimulada por diversos factores: maduración de frutos, diversas condiciones de estrés y la presencia de auxinas y giberelinas (Taiz y Zeiger, 1998).

Mecanismo de acción:

El etileno actúa a través de un receptor de membrana, ETR-1, cuya secuencia de ADN es conocida y se relaciona con el sistema de dos componentes de histidinas quinasas de procariontes (Chang, y col, 1993). El receptor ETR-1 es una proteína de membrana que presenta varios dominios: un dominio extracitoplasmático que corresponde al sitio de unión al etileno, un dominio transmembrana, y dos dominios intracitoplasmáticos que serían sitios de fosforilación involucrados en la transmisión de la señal a la célula. En la unión del etileno a su receptor participa un átomo de Cu^{+2} que actuaría como un mediador en la unión.

Los efectos biológicos de etileno pueden ser bloqueados de dos maneras: utilizando inhibidores de su biosíntesis o utilizando antagonistas. AVG (aminoetoxivinil-glicina) y AOA (ácido aminooxiacético) inhiben la síntesis de etileno ya que actúan a nivel de la enzima ACC sintasa, mientras que CO_2 , iones Ag^+ y MCP (metil ciclopropano) inhiben su acción ya que actúan a nivel del receptor de etileno. En el caso de Ag^+ se reemplaza el lugar del Cu^{+2} , interfiriendo con la propagación de la señal. El efecto del MCP se debe a la unión irreversible de este producto con el receptor de etileno (Bleeker, y col., 1996).

Efectos biológicos:

El etileno se considera una hormona involucrada fundamentalmente con la aceleración de la maduración de frutos y de la senescencia en flores y hojas, sin embargo debemos mencionar que es una hormona vegetal que participa en otros procesos biológicos.

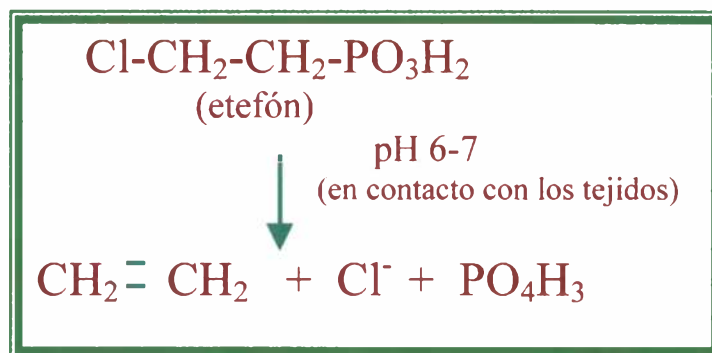
Se ha demostrado que etileno es un acelerador de la maduración en frutos, tanto climatéricos como no climatéricos. Este efecto sobre la maduración hace del etileno una herramienta de tecnología postcosecha permitiendo, en muchos casos, lograr la maduración pareja de frutos. Sin embargo, en otros casos, no es deseado que los frutos maduren rápido ya que esto limitaría su vida comercial. Por lo tanto muchas veces en los almacenamientos,

tanto de frutos como de hortalizas sensibles al etileno (verduras de hojas, brócoli, etc) se debe eliminar la presencia de este gas.

Entre otras funciones importantes de etileno podemos mencionar: regulación de la abscisión de hojas y frutos; del desarrollo de raíces, y del crecimiento de semillas. Por otra parte se ha demostrado que etileno regula la expresión de numerosos genes vinculados a respuesta de defensa frente a patógenos (Saniewski y Miyamoto, 1998).

Etefón:

Para realizar tratamientos con etileno exógeno, es común la utilización de productos líquidos, tales como etefón, los cuales generan etileno en contacto con los tejidos.



Citoquininas, etileno y senescencia postcosecha de brócoli

Como se ha descrito anteriormente, las inflorescencias de brócoli, por tratarse de tejidos inmaduros, senescen rápidamente luego de la cosecha y el síntoma más evidente es la degradación de clorofilas que lleva al amarillamiento del tejido.

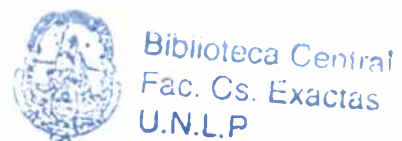
Durante el proceso de senescencia, las clorofilas y las proteínas fotosintéticas son degradadas (Humbeck y col., 1996). Las hormonas vegetales son capaces de acelerar o retrasar este proceso. Mientras ABA (ácido absísico) y etileno aceleran el proceso de senescencia (Smart, 1994), las citoquininas inhiben o retrasan la degradación de clorofilas y sus proteínas asociadas (Badenoch-Jones y col., 1996).

Se ha demostrado que el tratamiento de inflorescencias de brócoli con citoquininas (BAP, 50 ppm durante 30 min) produce además de un retraso en la pérdida de color verde, un retraso en la degradación de proteínas y acumulación de amonio, hechos que caracterizan la degradación de proteínas que se produce durante la senescencia (Downs y col., 1997). La utilización de una construcción genética similar a la mencionada anteriormente (un promotor de senescencia SAG12 unido a un gen ipt de *Agrobacterium* (Gan y Amasino, 1995) permitió obtener brócoli transgénico cuyas inflorescencias mostraron evidencias de retraso de amarillamiento durante la senescencia (Chen y col., 2001). Por otra parte se ha demostrado que las citoquininas pueden retrasar el comienzo de la degradación de clorofilas en las inflorescencias pero no tienen ningún efecto sobre la producción de etileno (Clarke y col., 1994; Tian y col., 1994).

Respecto al etileno se ha demostrado que las aplicaciones exógenas de éste y de propileno aceleran el amarillamiento de inflorescencias de brócoli (Aharoni y col., 1985; Tian y col., 1994) mientras que la aplicación de antagonistas como Ag⁺, CO₂ y AVG, retrasan el proceso (Wang, 1977). Durante la postcosecha, se ha demostrado que aumenta la sensibilidad de las inflorescencias a la aplicación exógena de etileno (Tian y col., 1993). Tanto los niveles de etileno como la expresión de genes que codifican para su biosíntesis están aumentados durante la postcosecha (Pogson y col., 1995). En respuesta al corte que se realiza en la cosecha, los tallos producen un aumento de ACC y etileno, lo cual a su vez provoca un aumento de la actividad ACC oxidasa en las inflorescencias, lo que conduce a una senescencia acelerada (Kato y col., 2002). Brócolis modificados con el gen antisentido para ACC oxidasa presentaron muy baja producción de etileno y un marcado retraso en el

amarillamiento postcosecha (Henzi y col., 2000). Watanabe y col. (2000) demostraron que metiljasmonato acelera la senescencia de brócoli ya que promueve la producción de etileno.

Tanto las citoquininas como el etileno juegan un rol importante en la regulación de la senescencia de hojas y tejidos. Dado que el síntoma más evidente de senescencia postcosecha de brócoli es el amarillamiento que se produce en las inflorescencias como consecuencia de la degradación de clorofilas, es posible pensar que estas fitohormonas afectarían la actividad de las enzimas que degradan clorofilas y por lo tanto la velocidad de degradación de las mismas.



III.2- OBJETIVO

“Estudiar el efecto de las hormonas que regulan la senescencia (etileno y citoquininas) sobre la actividad de algunas de las enzimas involucradas en la degradación de clorofilas durante la postcosecha de brócoli.”

Actividades propuestas para cumplir este objetivo:

A) Realizar tratamientos por inmersión {
Agua + DMSO (control)
BAP + DMSO (citoquininas).
Etefón+ DMSO (etileno).

B) Comparar el contenido de pigmentos durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20°C entre los tratamientos y los controles.

C) Comparar la actividad de las enzimas que degradan clorofilas durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20°C entre los tratamientos y los controles.

III. 3- MATERIALES Y MÉTODOS

III.3-1 Material vegetal y tratamiento con hormonas

Se trabajó con cabezas centrales de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica, cv Shogun*) cultivadas a campo en la zona de Arana, La Plata, Provincia de Buenos Aires. Inmediatamente después de la cosecha las muestras fueron llevadas al laboratorio y utilizadas en las experiencias. Las cabezas de brócoli fueron separadas en ramilletes los que fueron tratados por inmersión en soluciones que contenían 100 ppm de BAP y 0,1 % de DMSO (dimetil sulfóxido, producto que facilita la absorción de las fitohormonas por los tejidos), o bien 100 ppm de etefón y 0,1 % de DMSO. Los tratamientos se realizaron durante 1 min.

Luego de los tratamientos las muestras fueron almacenadas en bandejas de PVC perforado a 20° C durante 4 días. Todos los días se realizaron medidas de color superficial y tomaron muestras las que fueron congeladas con nitrógeno líquido hasta su utilización en las determinaciones bioquímicas.

* Este trabajo en particular se realizó con la variedad Shogun, ya que transitoriamente resultó imposible conseguir muestra confiable de la variedad De Cicco.

III.3-2 Medida del color superficial

Se cuantificó el color superficial a través de los parámetros L*, a*, y b* los que se obtuvieron mediante un colorímetro (Minolta CR300, Osaka, Japón). Se calculó el valor del ángulo hue (h°) de acuerdo a: $\arctg b/a$, si a es positivo y $180 - \arctg b/a$ si a es negativo. Para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento se realizaron las medidas sobre 10 cabezas de brócoli y en cada cabeza se midieron 3 posiciones diferentes.

III.3-3 Medida del contenido de clorofilas y feofitinas

Se trituraron ramilletes de brócoli congelados con un molinillo y aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido fueron colocados en 5 ml de acetona, se agitaron para favorecer la extracción y se centrifugaron a $6000 \times g$ durante 15 min. El sobrenadante fue utilizado para determinar el contenido de clorofilas totales, a y b por espectrofotometría según el método de Lichtenthaler (1987).

Para la medida del contenido de feofitinas (Pheo) se utilizó el mismo extracto de clorofilas. Todas las clorofilas presentes en el extracto fueron transformadas en feofitinas

mediante el agregado de una gota de HCl 25% v/v cada 5 ml de extracto. La cantidad de Pheo iniciales se obtuvo por diferencia entre la cantidad de feofitinas obtenidas luego de agregar el ácido y la cantidad de clorofilas iniciales de cada extracto, de acuerdo al método de Lichtenthaler (1987).

Para cada condición de tiempo y tratamiento se prepararon dos extractos y las medidas se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como microgramos de pigmento / gramo de tejido.

III.3-4 Preparación del extracto enzimático

Aproximadamente 3 g de tejido congelado fue homogeneizado en un Omnimixer durante 3 minutos a 4°C en presencia de 30 ml de buffer de extracción de la siguiente composición: NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0,1 M pH 6, Triton X-100 0,1% v/v, PVPP 1% p/v, cisteína 1 mM. El homogenato fue llevado a agitación por 1 hora a 4°C y luego centrifugado a 10000 \times g durante 20 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante se filtró por vacío a través de papel y finalmente se microfugó. Se prepararon dos homogenatos para cada muestra y las medidas de actividad se realizaron por duplicado en cada homogenato.

III.3-5 Preparación de los sustratos de las enzimas

Aproximadamente 6 g de hojas de acelga (*Beta vulgaris* var. cicla L.) se homogeneizaron con 60 ml de una mezcla acetona/agua (80/20) en Omnimixer. La suspensión obtenida se filtró a través de papel utilizando vacío. Al filtrado se le adicionaron 40 ml de éter de petróleo para extraer las clorofilas.

Para obtener las clorofilas utilizadas como sustrato de clorofilasa y peroxidasa, se eliminó el éter de petróleo por evaporación con N_2 y el residuo sólido conteniendo las clorofilas se disolvió con acetona.

Para obtener la clorofilina, sustrato de Magnesio dequelatasa (MDS), la fase etérea se trató con KOH 30% p/v en metanol, se dejó precipitando en oscuridad y se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado de clorofilina se resuspendió en tricina 1 M, pH 9. Ambos sustratos se conservaron a -20°C.

III.3-6 Medida de la actividad clorofilasa

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo: buffer $\text{NaPO}_4\text{H}_2\text{Na}/\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 0,1 M pH 7, Triton X-100 0,15% v/v, clorofilas preparadas según III.3-5 (aproximadamente

10 mM de modo de lograr una absorbancia inicial igual a 0,45 a 663 nm y acetona 16% v/v, siendo el volumen final de la mezcla de reacción de 13 ml. En esta mezcla se agregó 2 ml del extracto enzimático preparado de acuerdo a **III.3-4** y se incubó a 40°C. Luego de 0, 1, 2, 4, 8 y 18 horas se tomó 1 ml de la mezcla de reacción y se agregó sobre 3 ml de una mezcla hexano/acetona (70/30) previamente enfriada a 0°C, se agitó vigorosamente hasta la formación de una emulsión y finalmente se centrifugó a $9000 \times g$ durante 10 min a 4°C para separar las fases. Se midió la absorbancia a 663 nm en ambas fases, la desaparición de clorofila en la fase superior y la aparición de clorofilidos en la fase inferior. Las mezclas de reacción se mantuvieron durante la medida al resguardo de la luz. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de aparición de clorofilico en la fase acuosa por gramo de tejido: $\Delta Abs_{663 \text{ nm}}, \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$.

III.3-7 Medida de la actividad Mg-dequelatasa (MDS)

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por buffer Tris/tricina 0,1 M pH 9, 50 μ l clorofilina preparada según **III.3-5** ($DO_{687 \text{ nm}} = 0,3$), 150 μ l extracto enzimático preparado de acuerdo a **III.3-4** en un volumen final de 500 μ l. Se incubó a 37°C determinándose la producción del derivado sin Mg^{+2} de la clorofilina mediante la medida de la absorbancia a 687 nm durante 10 min. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de formación de feofórbido por gramo de tejido: $\Delta A_{687 \text{ nm}}, \cdot \text{min}^{-1} \cdot g^{-1}$.

III.3-8 Medida de la actividad peroxidasa

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por buffer NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0,1M, 0,2 M pH 5, tritón X-100 0,2% v/v, ácido p-cumárico 5 mM, H_2O_2 60 mM, 25 μ l de extracto enzimático preparado de acuerdo a **III.3-4** y 10 μ l de clorofila preparada según **III.3-5** (de modo que la $DO_{648 \text{ nm}}$ inicial sea cercana a 1), en un volumen total de 600 μ l. Se estimó la degradación de clorofila por la acción de peroxidasa a través del descenso de absorbancia a 648 nm. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de desaparición de clorofilas por gramo de tejido: $\Delta A_{659 \text{ nm}}, \cdot \text{min}^{-1} \cdot g^{-1}$.

III.3-9 Análisis estadístico

La experiencia completa se realizó tres veces y las tendencias encontradas fueron similares. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de ANOVA, las medias fueron comparadas mediante un test de LSD a un nivel de significación de 0,05.

III.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Observación visual y medida de color superficial

Los ramilletes de brócoli fueron tratados con BAP o con etefón y luego almacenados a 20° C durante 4 días. La pérdida de peso de las muestras fue de 4,6 % respecto al valor inicial luego de 4 días de almacenamiento (datos no mostrados). Las muestras control no presentaron cambios de color hasta el día 2 a partir del cual sufrieron un rápido amarillamiento. Las muestras tratadas con etefón presentaron amarillamiento antes del día 2 mientras que las tratadas con BAP mantuvieron su color durante toda la experiencia.

Los cambios de color superficial fueron evaluados a través de la medida de los parámetros de color: valor del ángulo hue y L* (luminosidad). La disminución del ángulo hue se correlaciona con el progresivo amarillamiento de los ramilletes durante todo el almacenamiento. Las muestras control disminuyeron el valor de hue a partir del día 2 ($p < 0,05$) mientras que las tratadas con etefón a partir del día 1 y a mayor velocidad que los controles. Respecto a las muestras tratadas con BAP, no se encontraron cambios en el valor de hue hasta el día 4 en el que se observó un ligero descenso (**Figura III.1**)

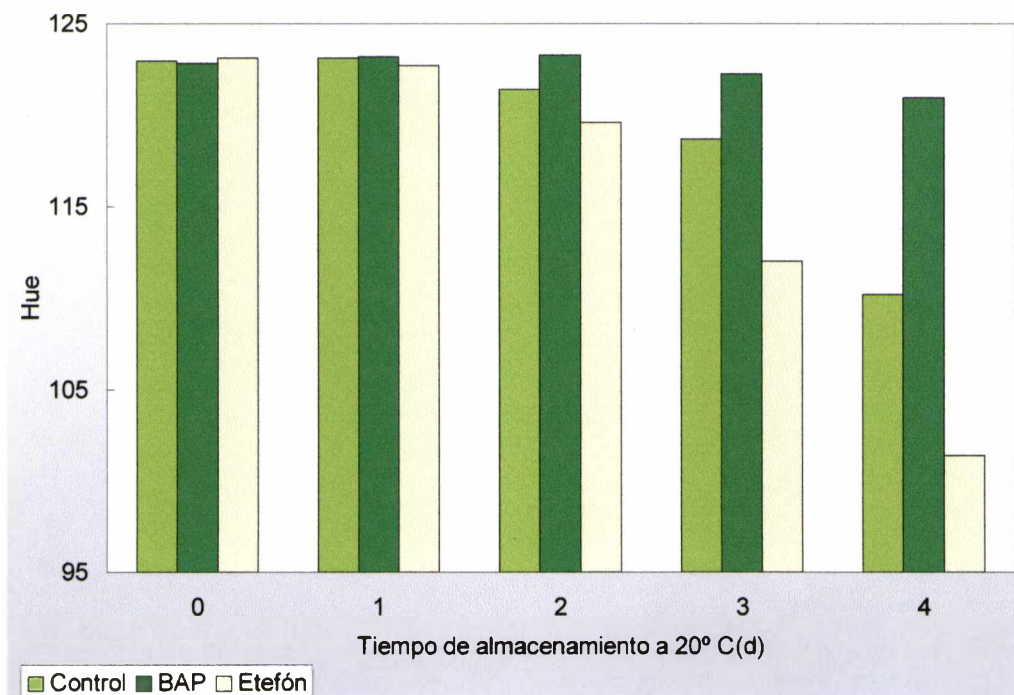


Figura III.1- Cambios en el valor de hue durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C. LSD: 0.27

El valor de L^* aumentó en todas las muestras durante el almacenamiento a 20° C, pero la velocidad de aumento de L^* fue mayor en las tratadas con etefón y menor en las tratadas con BAP, respecto a los controles (**Figura III.2**).

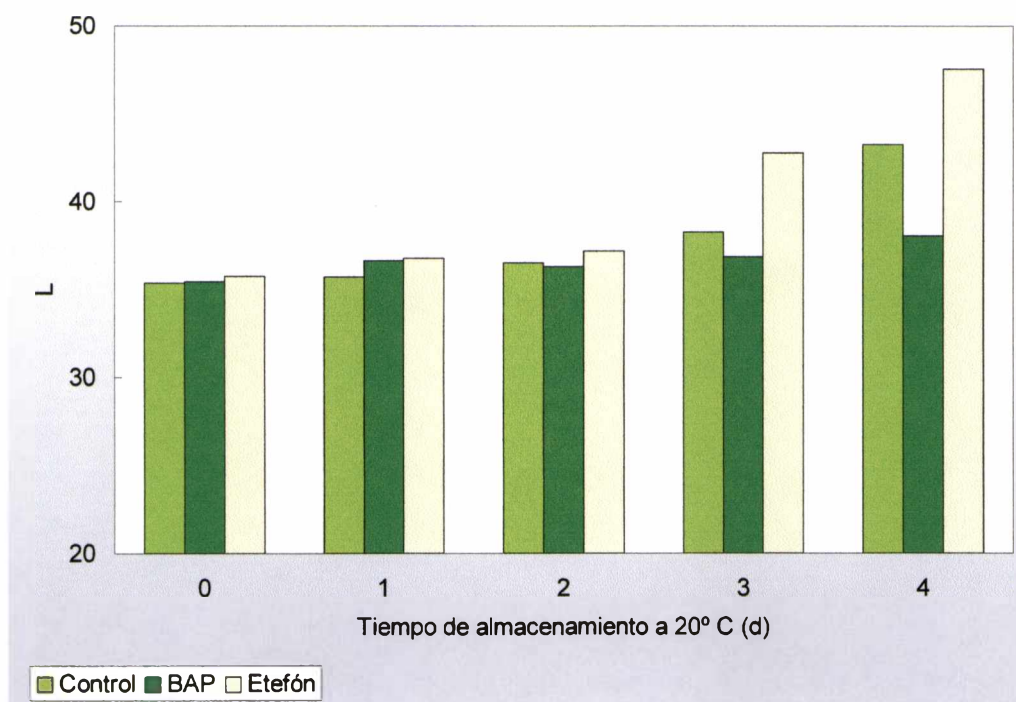


Figura III.2- Cambios en el valor de L durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C. LSD: 0.17

2. Medida del contenido de pigmentos

Clorofilas:

Los niveles de clorofilas y feofitinas fueron evaluados durante el almacenamiento a 20° C en las muestras controles y tratadas.

El contenido de clorofilas totales disminuye durante el almacenamiento en todos los casos (**Figura III.3**), pero la velocidad de degradación de clorofilas fue menor en las tratadas con BAP, ya que luego de 4 días retuvieron el 65 % del valor inicial mientras que los controles presentaron el 50 %. Las muestras tratadas con etefón presentaron mayor velocidad de degradación de clorofilas ya que retuvieron sólo el 38 % del valor inicial luego de 4 días de almacenamiento.

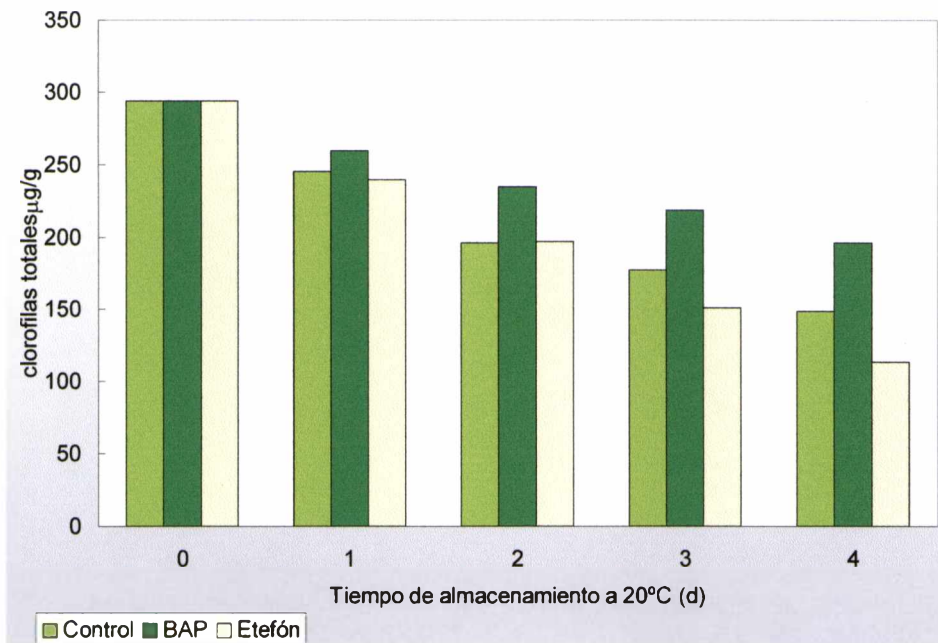


Figura III.3- Cambios en el contenido de clorofilas totales durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado 20° C. LSD: 14.

El valor del ángulo hue disminuye luego de dos días de almacenamiento mientras que la degradación de clorofilas es evidente en el día 1, es decir que la disminución del contenido de clorofilas se puede percibir antes de que se observe un cambio del color superficial. Resultados similares se han publicado en trabajos donde se estudiaba el efecto del tratamiento con propileno o con agentes antagonistas de etileno sobre la degradación de clorofilas en brócoli (Tian y col., 1994; Wang 1997).

El efecto de citoquininas sobre la degradación de clorofilas es coincidente con lo mostrado en otras publicaciones (Clarke y col., 1994; Downs y col., 1997) y con lo observado en

brócoli transformado con el gen de la enzima isopenteniltransferasa (*ipt*) bajo control de un promotor asociado a senescencia, el cual presentaba un alto contenido de citoquininas que serían responsable del retraso en el amarillamiento de las inflorescencias (Chen y col., 2001).

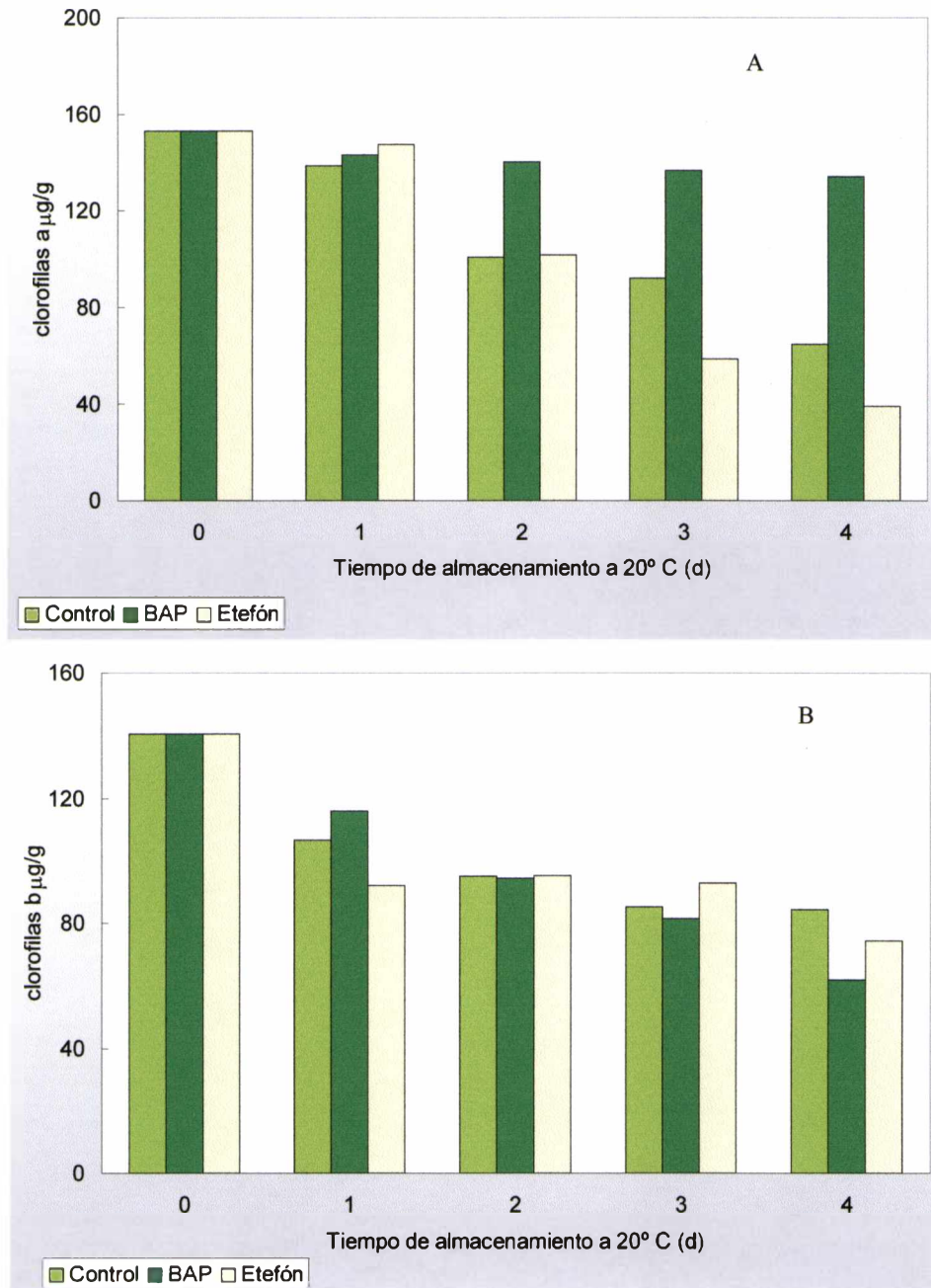


Figura III.4 Cambios en el contenido de clorofilas a (A) y b (B) durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C. LSD Cla: 16 LSD Clb: 12.

Se analizó también el efecto de las hormonas sobre la velocidad de degradación de cada tipo de clorofilas: a y b (Figura III.4). En las muestras control la velocidad de

degradación de clorofilas a fue mayor que la correspondiente a clorofilas b tal como ocurre generalmente durante la senescencia (Kura-Hotta y col., 1987; Hidema y col., 1992).

Cuando se analizó el efecto de los tratamientos aplicados sobre la velocidad de degradación de cada tipo de clorofilas se encontró que los tratamientos con hormonas tuvieron efecto sobre la velocidad de degradación de clorofilas a pero no afectaron a la degradación de clorofilas b. En el caso de clorofilas a el tratamiento con BAP retrasó la degradación mientras que el tratamiento con etefón la aceleró. Estos resultados indican que la degradación de clorofilas totales estaría vinculada a la degradación de clorofilas a y no se relacionaría con la degradación de clorofilas b. Se ha propuesto que todos los catabolitos de la degradación de clorofilas derivan de clorofila a y por lo tanto la clorofila b debe ser previamente transformada en clorofila a para ser catabolizada (Matile y col., 1999). Este modelo se afirma sobre la existencia de una enzima que transforma clorofila b en a: “clorofila b reductasa”. Por lo tanto el efecto diferencial sobre degradación de clorofilas a y b sería a nivel de un paso anterior a la vía común de degradación, es decir en el paso de transformación de clorofila b en a, o en alguna etapa de la desorganización de los complejos pigmentos proteínas.

Feofitinas:

Se analizó el contenido de feofitinas durante el almacenamiento a 20° C para las muestras control y las tratadas con hormonas (**Figura III.5**).

Se observó una acumulación transitoria de feofitinas en las muestras control, los valores aumentaron durante los días 2 y 3, y luego disminuyeron en el día 4. Las muestras tratadas con etefón presentaron un aumento continuo de feofitinas a partir del día 1 y durante toda la experiencia. En cambio, el tratamiento con BAP provocó una inhibición de la acumulación de feofitinas hasta el día 3, donde se detectó un ligero aumento de este pigmento. De acuerdo al modelo de degradación de clorofilas propuesto por Matile y col (1999), en una primera etapa las clorofilas son degradadas generando clorofilidos y liberando fitol (catalizada por clorofilasa). Posteriormente se formaría feofórbido por acción de MDS que remueve el átomo de Mg^{+2} . De acuerdo a este modelo no se observaría formación de feofitinas, que implica la remoción del átomo de Mg^{+2} directamente de la clorofila. Sin embargo, se ha encontrado acumulación de feofitinas durante la senescencia de hojas de perejil (Amir- Shapira y col., 1987) y durante el amarillamiento de hojas de

Ginkgo biloba (Tang y col., 2000) sugiriendo que la liberación del Mg^{+2} puede ocurrir también a partir de sustratos fitilados.

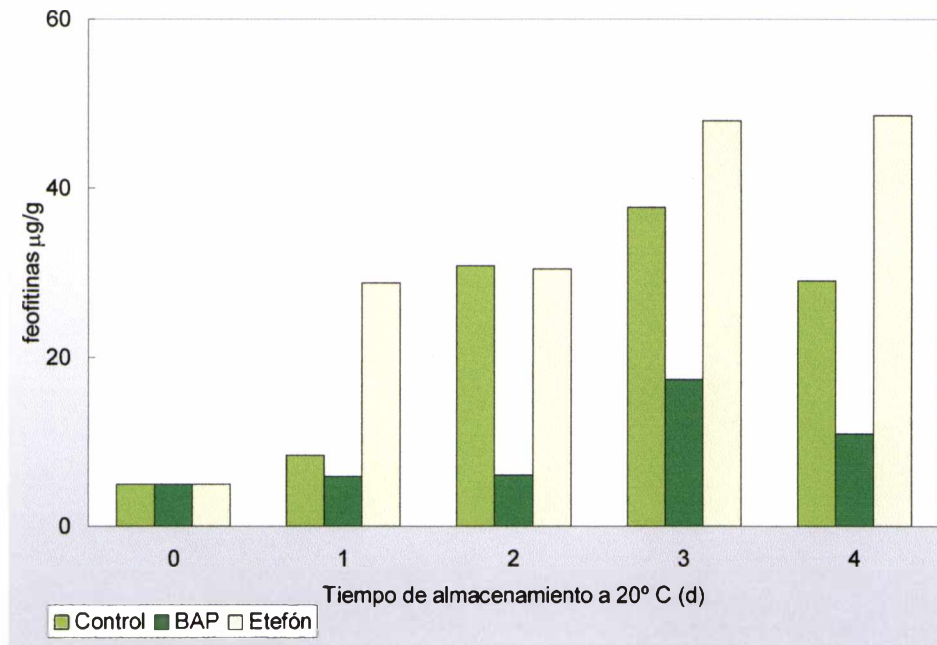


Figura III.5- Cambios en el contenido de feofitinas durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C. LSD: 8

3. Medida de la actividad de las enzimas que degradan clorofilas

Se analizó la actividad de las enzimas relacionadas con la degradación de clorofilas (clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasa) en las muestras control y tratadas con hormonas durante el almacenamiento a 20° C.

Clorofilasa

En las muestras control la actividad clorofilasa aumentó durante la experiencia alcanzando un máximo luego de 3 días de almacenamiento (**Figura III.6**). En las muestras tratadas con BAP, se observó que la actividad clorofilasa se mantuvo prácticamente sin cambios durante toda la experiencia, mientras que en las muestras tratadas con etefón la

actividad de la enzima aumentó continuamente, alcanzando valores tres veces superiores a los del control en el día 4 ($p < 0.05$).

Como se ha mencionado anteriormente, la enzima clorofilasa es una proteína con diferentes ubicaciones. Ha sido localizado principalmente en membrana de cloroplastos, pero también puede estar localizada en otras organelas, quizás en vacuolas (Takamiya y col., 2000). Posiblemente las diferentes ubicaciones tendrán diferente regulación, lo que permitiría explicar los diferentes patrones de actividad durante la senescencia que se encuentran en bibliografía para diferentes sistemas. Por ejemplo, la actividad clorofilasa aumenta durante la senescencia de cebada (Sabater y Rodríguez, 1978) y de espinaca (Yamauchi y Watada, 1991). Sin embargo en la mayoría de las hojas, la actividad clorofilasa no aumenta durante la senescencia (Matile y col., 1999). Yamahuchi y col. (1997) encontraron resultados similares trabajando con brócoli (*Brassica oleracea* L., cv Haitzu).

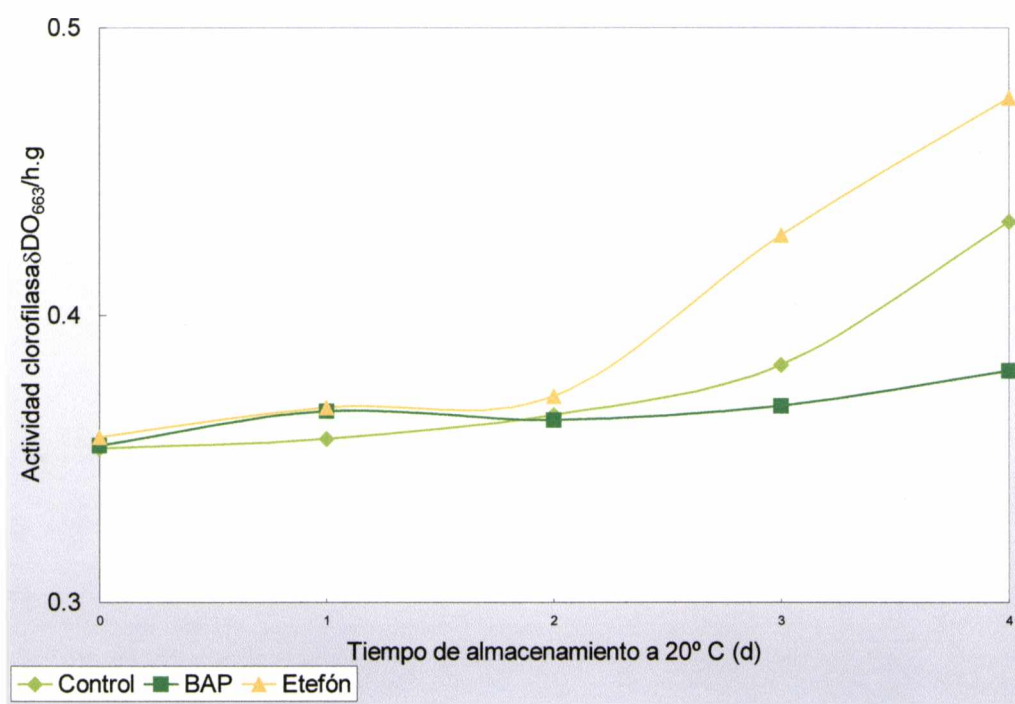


Figura III.6- Actividad clorofilasa durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C. LSD: 0.05

Con respecto al efecto del etileno sobre la actividad de la enzima, también se observa diferente comportamiento en diferentes sistemas. Por ejemplo, en hojas de espinaca no se observa un incremento adicional de la actividad clorofilasa en respuesta al tratamiento con etileno durante la senescencia (Yamauchi y Watada, 1991), sin embargo en cítricos, la actividad clorofilasa aumenta poco durante la maduración, pero si aumenta

notablemente la expresión del gen que codifica para esta enzima en respuesta a etileno (Amir-Shapira y col., 1987; Jacob-Wilk y col., 1999).

En el presente trabajo, el aumento de la actividad clorofilasa durante la senescencia estaría regulado por las dos hormonas, las citoquininas inhibirían este aumento, mientras que el etileno lo activaría.

Mg-dequelatasa

La actividad MDS aumenta durante la senescencia de brócoli, como puede observarse en las muestras control (**Figura III.7**). Luego de 4 días de almacenamiento a 20°C la actividad aumentó 7 veces respecto al valor inicial. En las muestras que fueron tratadas con etefón se observó el mismo comportamiento pero los valores de la actividad luego de 4 días de almacenamiento a 20°C fue 11 veces el valor inicial. Las muestras tratadas con BAP presentaron un aumento de la actividad en el día 1, manteniéndose constante hasta el final del almacenamiento, con un valor 4 veces mayor que el inicial.

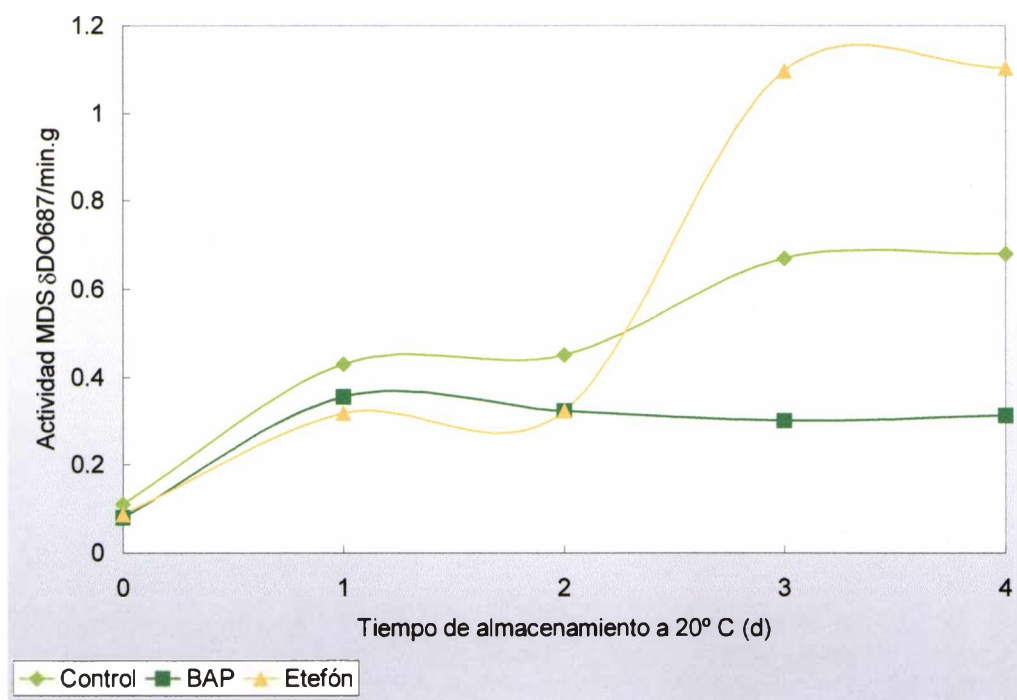


Figura III.7- Actividad MDS durante la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a 20° C. LSD: 0.08

La actividad MDS aumentó luego de 1 día de almacenamiento a 20° C mientras que clorofilasa aumentó en el día 2, este resultado permitiría explicar la acumulación transitoria de feofitinas que se observó durante la senescencia postcosecha de brócoli. Hasta el

presente, los datos que se obtienen en bibliografía indican que MDS actuaría, al menos “in vitro”, sobre sustratos defitilados una vez que actuó clorofilasa (Shioi y col., 1996; Matile y col., 1999), sin embargo la eliminación de Mg^{+2} a partir de sustratos fitilados podría estar catalizada “in vivo” por MDS o por otra enzima aún no identificada. El hecho de que durante la senescencia de hojas de Ginkgo biloba (Tang y col., 2000) y perejil (Amir-Shapira y col., 1987) y en inflorescencias de brócoli se acumulen feofitinas respaldan la posibilidad de que la remoción de Mg^{+2} puede realizarse a partir de compuestos defitilados.

La actividad MDS ha sido muy poco estudiada y hasta el presente no existen otros estudios de efectos de hormonas vegetales sobre la actividad de esta enzima. En el caso de brócoli los resultados mostraron que las citoquininas inhiben el aumento de MDS durante la senescencia poscosecha de brócoli, mientras que etileno lo favorece. El comportamiento de esta enzima frente a los tratamientos con hormonas es análogo al obtenido para clorofilasa lo que llevaría a pensar en una regulación similar para ambas.

Peroxidasa

La actividad peroxidasa aumentó 3 veces en las muestras control durante el almacenamiento a 20° C (Figura III.8).

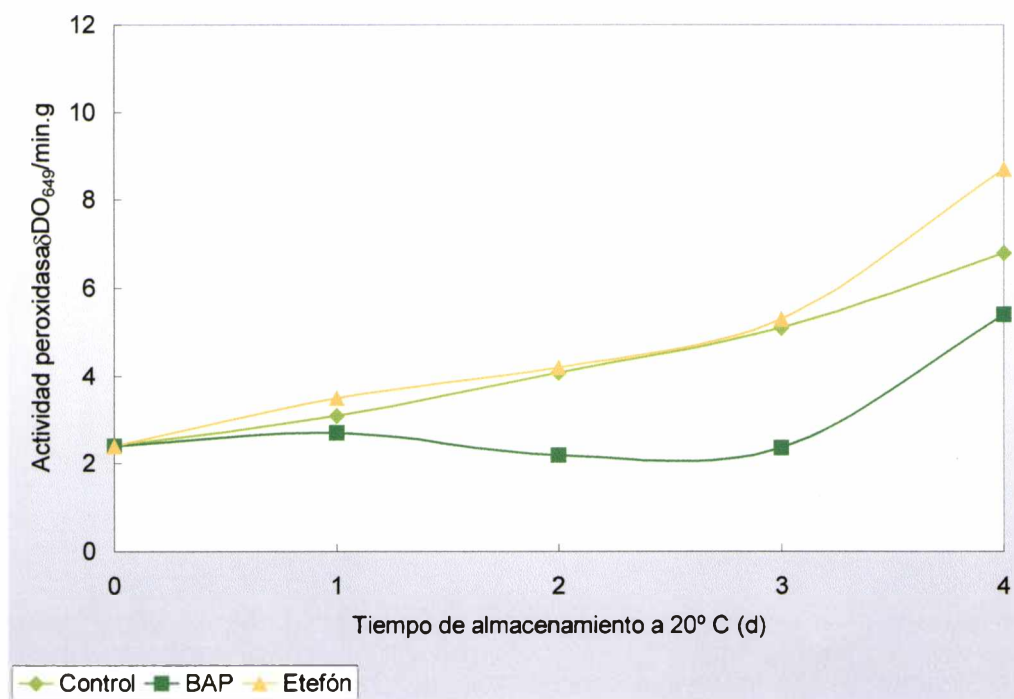


Figura III.8- Actividad de degradación de clorofilas mediada por peroxidasa durante la senescencia poscosecha de brócoli almacenado a 20° C. LSD: 0.11

Las muestras tratadas con etefón presentaron un comportamiento similar a los controles hasta el día 3, pero en el día 4 los valores fueron mayores que los controles ($p < 0.05$). En las muestras tratadas con BAP la actividad peroxidasa se mantuvo constante hasta el día 3 y aumentó su valor en el día 4 pero a niveles menores que los que corresponden al control.

Trabajos anteriores han demostrado un aumento en la actividad guaiacol peroxidasa (Toivonen y Sweeney, 1998), y de la actividad de degradación de clorofila mediada por peroxidasa (Funamoto y col., 2002) durante la senescencia postcosecha de brócoli. No existen publicaciones anteriores en las que se analice el efecto de las hormonas que regulan la senescencia sobre la actividad de esta enzima.

Los resultados obtenidos indicaron que esta enzima presentaría una regulación similar a la de clorofilasa y MDS ya que BAP disminuye el aumento de la actividad peroxidasa mientras que etefón acelera el aumento de la actividad, sin embargo se observó que el efecto del etefón se logró luego de 3 días de almacenamiento, mientras que el efecto de esta hormona sobre las enzimas MDS y clorofilasa fue más temprano.

III.5- CONCLUSIONES

- ❖ Los tratamientos con citoquininas retrasaron el amarillamiento postcosecha de brócoli, a través de una disminución de la actividad de enzimas involucradas en la degradación de clorofilas: clorofilasa, MDS y peroxidasa.

- ❖ Los tratamientos con etefón (etileno) aceleraron el amarillamiento postcosecha de brócoli, a través de un aumento de la actividad de las enzimas involucradas en la degradación de clorofilas: clorofilasa, MDS y peroxidasa.

- ❖ El efecto de la aplicación exógena de hormonas vegetales se observó solamente en la velocidad de degradación de clorofilas a, este resultado llevaría a pensar que la regulación hormonal sería en un paso anterior al comienzo de la degradación catalítica de clorofilas, posiblemente durante la desorganización de los complejos pigmento proteínicos.

Capítulo IV

Efecto del tratamiento
térmico de alta temperatura sobre la
degradación de clorofilas durante la
senescencia postcosecha
de brócoli



IV.1- INTRODUCCIÓN

Tratamientos térmicos de alta temperatura: Generalidades y Fundamentos

Los tratamientos térmicos de alta temperatura han sido utilizados como metodología de poscosecha útil para extender el tiempo de almacenamiento en diferentes productos. La utilización de estas metodologías puede apuntar a diferentes objetivos: control de insectos, control de hongos y bacterias patógenas, retraso en la maduración de frutos, disminución de diferentes fisiopatías, y/o retraso de la senescencia de tejidos. Numerosas publicaciones han demostrado los efectos benéficos de los tratamientos térmicos en cada uno de estos aspectos (Klein y Lurie, 1991; Conway y col., 1994; Lurie y Klein, 1990; Lurie, 1998; Ferguson y col., 2000;)

Los tratamientos térmicos de alta temperatura han sido utilizados para controlar larvas y huevos de insectos en cítricos (Hawkins, 1932); pimientos verdes (Sugimoto y col., 1983) y pepinos (Chang y Linse, 1989). Asimismo, estos tratamientos han dado buen resultado en el control de enfermedades poscosecha de frutillas y otros berries causados por *Botrytis cinerea* (Vicente y col., 2001). Se puede considerar que los tratamientos térmicos de alta temperatura presentan efectos directos y efectos indirectos sobre los patógenos. Los efectos directos se refieren a la acción de la temperatura elevada sobre la viabilidad de los mismos y, en el caso particular de hongos, sobre la capacidad de germinación de los mismos. En cambio, los efectos indirectos se refieren a cambios que se producen en los tejidos por la acción del tratamiento, los que permiten una mayor resistencia a la enfermedad por parte del producto durante el almacenamiento.

Por otro lado, se ha demostrado que los tratamientos térmicos de alta temperatura permiten retrasar desórdenes fisiológicos que ocurren durante el almacenamiento. Por ejemplo, permiten disminuir el daño por frío en tomates almacenados a bajas temperaturas (Lurie y Sabehat, 1997) y en paltas (Woolf, 1997); y disminuyen el pardeamiento enzimático en peras (Maxie y col., 1974) y lechugas (Salviet, 2000).

Los tratamientos térmicos afectan diversos aspectos de la maduración de los frutos. Se ha demostrado que pueden retrasar el ablandamiento durante el almacenamiento poscosecha de papayas, lo cual se correlaciona con una menor expresión de la enzima poligalacturonasa (Chan y col., 1981; Paull y Chan, 2000). El cambio de color también puede ser retrasado por la aplicación de este tipo de tratamientos, tal como ocurre en

bananas verdes tratadas con agua caliente a 50° C durante 45 min (Jacobi y col., 1995) En frutillas, se ha demostrado que la capacidad antioxidante se mantiene más elevada en los frutos tratados, detectándose un elevado nivel de ácido ascórbico y fenoles (Tesis Doctoral, Vicente 2004). Los tratamientos térmicos de alta temperatura producen una modificación reversible de la síntesis de proteínas. Klein y Lurie (1991), trabajando con manzanas encontraron que tratamientos térmicos de 38°C durante 4 días disminuyen la síntesis de proteínas totales, aunque se detectaron nuevos polipéptidos, las proteínas de shock térmico (HSP). Estas proteínas se sintetizan en todos los organismos vivos cuando se supera en 5°C su temperatura normal. Se ha propuesto que las HSP funcionan como chaperonas, es decir se unen a otras enzimas para evitar el agregamiento y plegamiento inadecuados (Vierling, 1997). En conjunto, se puede resumir que hay un “redireccionamiento” del metabolismo de proteínas como consecuencia del tratamiento térmico: disminuye la síntesis de algunas proteínas normales y necesarias para la maduración y aumenta la síntesis de proteínas de shock térmico y de diversos compuestos que modulan la respuesta frente al shock.

En cuanto a la metodología de aplicación de los tratamientos térmicos, se han desarrollado tres modalidades:

1. Agua caliente, utilizado fundamentalmente en el caso de control de insectos.
2. Vapor caliente: utilizado para control de insectos y de patógenos.
3. Aire caliente: utilizado para control de insectos y patógenos, y para retrasar alteraciones fisiológicas y maduración.

Uno de los objetivos principales de la utilización de tratamientos térmicos de alta temperatura es lograr un efecto diferencial sobre los tejidos y sobre los patógenos (insectos, hongos, bacterias). El tratamiento debe resultar agresivo para los patógenos pero no debe causar daño en el producto tratado. De esta manera, se logra que en el tejido se produzca una situación de estrés muy leve y reversible; pero suficientemente intensa de modo que el tejido se torne más resistente frente a una nueva situación de estrés, tal como un patógeno o bajas temperaturas. Por esta razón, antes de utilizar esta tecnología en un sistema determinado es muy importante seleccionar la temperatura y el tiempo de tratamiento que resulte adecuado para cada caso particular. El rango de temperaturas con las que se trabaja es entre 37 y 50°C, mientras que los tiempos de tratamiento dependen fundamentalmente del medio de calentamiento. En el caso de tratamientos con agua caliente se utilizan de 2 a 14 min, mientras que utilizando aire caliente se incuban de 1 a 3

horas, aunque en algunos casos particulares como tomate se puede incubar durante 3 días a 37°C (Lurie y Sabehat, 1997).

De forma análoga a lo que ocurre en maduración, durante senescencia se produce un importante redireccionamiento del metabolismo. Es de esperar que la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura pudiera generar un estrés leve que modifique las rutas metabólicas activas durante la senescencia, particularmente aquellas encargadas de la degradación de clorofilas.

Tratamientos térmicos de alta temperatura en brócoli

Desde hace aproximadamente diez años se ha comenzado a estudiar el efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura en brócoli. Se ha demostrado que tratamientos con agua caliente permiten retrasar el amarillamiento, desarrollo de enfermedades (Forney, 1995; Tian et al. 1997) y la producción de etileno (Tian et al., 1997). Los tratamientos a 45°C durante 10, 15 y 20 min y los de 52°C por 1 y 2 min retrasan el amarillamiento postcosecha de brócoli sin causar daño, mientras que los tratamientos a 52°C durante 3 min previenen el amarillamiento pero causan daño en los tejidos y provocan desarrollo de malos olores (Forney y Jordan 1998).

Tian y col. (1997) encontraron que algunas horas después de la cosecha se produce un aumento en la producción de etileno, lo que sería determinante en la aceleración de la senescencia durante la postcosecha. Este incremento de síntesis de etileno puede ser retrasado por la aplicación de tratamientos térmicos. Kazami y col. (1991), Tian y col. (1994) y Tian y col. (1997) demostraron que en muestras sometidas a diversos tratamientos por inmersión a 45 y 47°C durante 10 y 7,5 min, se logró una inhibición de la síntesis de etileno endógeno, lo que explicaría la conservación del color verde durante el almacenamiento. Más recientemente, Funamoto y col. (2002) analizaron el efecto de tratamientos térmicos con aire caliente sobre la degradación de clorofilas durante el almacenamiento a 15°C de cabezas centrales de brócoli variedad Haitzu. Se halló que un tratamiento a 50°C durante 2 horas retrasó la degradación de clorofilas, lo cual se correlacionó con una inhibición de la actividad de degradación de clorofilas mediada por peroxidasa.

IV.2- OBJETIVO

“Utilizar los tratamientos térmicos de alta temperatura como estrategia para retrasar la degradación de clorofilas durante la postcosecha de brócoli, variedad De Cicco.”

Actividades propuestas para cumplir el objetivo:

- A) Seleccionar un tratamiento térmico de alta temperatura adecuado para retrasar el amarillamiento postcosecha de brócoli.
- B) Analizar el efecto del tratamiento térmico seleccionado sobre la degradación de clorofilas.
- C) Analizar el efecto del tratamiento térmico seleccionado sobre otros parámetros de senescencia.

IV.3- MATERIALES Y METODOS

IV.3-1 Material vegetal y tratamientos térmicos aplicados

Se trabajó con cabezas centrales de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica, cv Cicco) cultivadas a campo en la zona de Arana, La Plata, Provincia de Buenos Aires. Inmediatamente después de la cosecha las muestras fueron llevadas al laboratorio y utilizadas en las experiencias. Para realizar los tratamientos se colocaron dos cabezas de brócoli por bandeja y se utilizaron seis bandejas para cada condición de tiempo/temperatura. Las bandejas se colocaron en una estufa y se trataron con aire caliente a 37, 42, 45, 48 ó 50°C por 1 ó 3 horas, asimismo se prepararon seis bandejas las que no recibieron ningún tratamiento. Luego de los tratamientos todas las bandejas se cubrieron con PVC para disminuir la pérdida de agua durante el almacenamiento y se almacenaron a 20°C por 4 días en oscuridad, durante los cuales se midió la pérdida de peso respecto al peso inicial de cada bandeja, el color superficial y el contenido de clorofilas.

Para el tratamiento seleccionado (48°C- 3 h), se utilizaron 50 bandejas, 25 tratadas y 25 controles. Se tomaron muestras en los días 0 (inicial para los controles e inmediatamente después del tratamiento para las muestras tratadas), 1, 2, 3 y 4 de almacenamiento a 20° C. Las muestras fueron analizadas inmediatamente o congeladas y almacenadas a -80° C hasta el momento del análisis. Para las determinaciones químicas (clorofilas, feofitinas, actividades enzimáticas, proteínas totales y solubles, azúcares, antioxidantes y TBARS) se separaron los tallos y se trabajó sólo con las inflorescencias.

IV.3-2 Medida del color superficial

Se cuantificó el color superficial a través de los parámetros L^* , a^* , y b^* los que se obtuvieron mediante un colorímetro (Minolta CR300, Osaka, Japón). Se calculó el valor del ángulo hue (h°) de acuerdo a: $\arctg b/a$, si a es positivo y $180 - \arctg b/a$ si a es negativo. Para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento se realizaron las medidas sobre 10 cabezas de brócoli y en cada cabeza se midieron 3 posiciones diferentes.

IV.3-3 Medida del contenido de clorofilas y feofitinas

Se trituraron ramilletes de brócoli congeladas con un molinillo y aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido fueron colocados en 5 ml de acetona, se agitaron para favorecer la extracción y se centrifugaron a $6000 \times g$ durante 15 min. El

sobrenadante fue utilizado para determinar el contenido de clorofilas totales, a y b por espectrofotometría según el método de Lichtenthaler (1987). Los resultados se expresaron como microgramos de clorofilas por gramo de tejido.

Para la medida del contenido de feofitinas (Pheo) se utilizó el mismo extracto de clorofilas. Todas las clorofilas presentes en el extracto fueron transformadas en feofitinas mediante el agregado de una gota de HCl 25% v/v cada 5 ml de extracto. La cantidad de Pheo iniciales se obtuvo por diferencia entre la cantidad de feofitinas obtenidas luego de agregar el ácido y la cantidad de clorofilas iniciales de cada extracto, de acuerdo al método de Lichtenthaler (1987). Los resultados se expresaron como microgramos de feofitinas por gramo de tejido. Para cada condición de tiempo y tratamiento se prepararon dos extractos y las medidas se realizaron por duplicado.

IV.3-4 Preparación del extracto enzimático

Aproximadamente 3 g de tejido congelado fue homogeneizado en un Omnimixer durante 3 minutos a 4°C en presencia de 20 ml de buffer de extracción de la siguiente composición: NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0.1 M pH 6, Triton X-100 0,1% v/v, PVPP 1% p/v, cisteína 1 mM. El homogenato fue llevado a agitación por 1 hora a 4°C y luego centrifugado a 10000 \times g durante 20 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante se filtró por vacío a través de papel. El extracto así obtenido se microfugó, se alicuotó y se guardó a -20°C hasta el momento de realizar las medidas de actividad. Se prepararon dos homogenatos para cada muestra y las medidas de actividad se realizaron por duplicado en cada homogenato.

IV.3-5 Preparación de los sustratos de las enzimas

Aproximadamente 6 g de hojas de acelga (*Beta vulgaris* var. cicla L.) se homogeneizaron con 60 ml de una mezcla acetona/agua (80/20) en Omnimixer. La suspensión obtenida se filtró a través de papel utilizando vacío. Al filtrado se le adicionaron 40 ml de éter de petróleo para extraer las clorofilas.

Para obtener las clorofilas utilizadas como sustrato de clorofilasa y peroxidasa, se eliminó el éter de petróleo por evaporación con N_2 y el residuo sólido conteniendo las clorofilas se disolvió con acetona.

Para obtener la clorofilina, sustrato de Mg - dequelatasa (MDS), la fase etérea se trató con KOH 30% p/v en metanol, se dejó precipitando en oscuridad y se centrifugó.

Se eliminó el sobrenadante y el precipitado de clorofilina se resuspendió en tricina 1 M, pH 9. Ambos sustratos se conservaron a -20°C .

IV.3-6 Medida de la actividad clorofilasa

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo: buffer fosfato de sodio (fórmulas_{ij}) 0,1 M pH 7, Triton X-100 0,15% v/v, clorofilas (aproximadamente 10 mM de modo de lograr una absorbancia inicial igual a 0,45 a 663 nm y acetona 16% v/v, siendo el volumen final de la mezcla de reacción de 13 ml. En esta mezcla se agregó 2 ml del extracto enzimático preparado de acuerdo a IV.3- 4 y se incubó a 40°C . Luego de 0, 1, 2, 4, 8 y 18 horas se tomó 1 ml de la mezcla de reacción y se agregó sobre 3 ml de una mezcla hexano/acetona (70/30) previamente enfriada a 0°C , se agitó vigorosamente hasta la formación de una emulsión y finalmente se centrifugó a $9000 \times g$ durante 10 min a 4°C para separar las fases. Se midió la absorbancia a 663 nm en ambas fases, la desaparición de clorofila en la fase superior y la aparición de clorofilidos en la fase inferior. Las mezclas de reacción se mantuvieron durante la medida al resguardo de la luz. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de aparición de clorofilico en la fase acuosa por gramo de tejido: $\delta A_{663 \text{ nm}}, \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

IV.3-7 Medida de la actividad Mg-dequelatasa (MDS)

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por buffer Tris/tricina 0,1 M pH 9, 50 μl clorofilina ($\text{DO}_{687\text{nm}} = 0,3$), 150 μl extracto enzimático preparado de acuerdo a IV.3- 4 en un volumen final de 500 μl . Se incubó a 37°C determinándose la producción del derivado sin Mg^{+2} de la clorofilina mediante la medida de la absorbancia a 687 nm durante 10 min. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de formación de feoforbido por gramo de tejido: $\delta A_{687 \text{ nm}}, \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

IV.3-8 Medida de la actividad peroxidasa

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M, 0,2 M pH 5, tritón X-100 0,2% v/v, ácido p-cumárico 5 mM, H_2O_2 60 mM, 25 μl de extracto enzimático preparado de acuerdo a IV.3-4 y 10 μl de clorofila (de modo que la

DO_{648nm} inicial sea cercana a 1), en un volumen total de 600 μ l. Se estimó la degradación de clorofila por la acción de peroxidasa a través del descenso de absorbancia a 648 nm. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de desaparición de clorofilas por gramo de tejido: $\delta A_{659nm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

IV.3-9 Medida de la velocidad de respiración

Se colocaron cabezas de brócoli (aproximadamente 120 g) en jarras selladas de 1000 ml y se incubaron a 20°C durante 1 h. Se utilizó una cabeza por jarra. Se tomaron muestras de 1 ml de la atmósfera mediante una jeringa a través de un septum. El contenido de CO_2 y O_2 fue determinado mediante cromatografía en fase gaseosa, utilizando un equipo Varian, CX 3400, CA, USA, equipado con una columna Alltech CTRI y un detector de conductividad térmica. La temperatura del inyector, columna y detector fueron 120, 30 y 120°C respectivamente. Se utilizó helio como gas portador y la velocidad de flujo fue de 20 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Se analizaron tres jarras para cada condición y se midió dos veces cada jarra. Los resultados se expresaron como mL de CO_2 producidos por gramo de tejido por hora.

IV.3-10 Medida del contenido de azúcares totales

Se trituraron inflorescencias de brócoli congeladas con un molinillo y aproximadamente 0,4 g del polvo obtenido fue homogeneizado con 6 ml de etanol. El homogenato se centrifugó a 9000 $\times g$ durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se llevó a un volumen final de 50 ml con agua. Se tomaron muestras de 0,1 ml y se mezclaron con 1 ml de antrona 0,2 % p/v en H_2SO_4 72% p/v. La mezcla se agitó y se trató a 100°C durante 12 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron en baño de hielo y se midió la absorbancia a 625 nm. Se utilizó glucosa como patrón. Para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento se prepararon dos extractos y las medidas se realizaron por duplicado en cada extracto. Los resultados se expresaron como miligramos de glucosa por gramo de tejido.

IV.3-11 Medida del contenido de proteínas totales

Se trituraron inflorescencias de brócoli congeladas con un molinillo y aproximadamente 0,2 g del polvo resultante se homogeneizó con 10 ml de NaOH 0,1 M y dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 % p/v y se colocó en un baño de agua a 100°C durante 10 min. El homogenato se centrifugó a 10000 $\times g$ durante 20 min a 4°C. Se tomó el sobrena-

dante y en el mismo se precipitaron las proteínas mediante el agregado de 2 ml de 25 % p/v de ácido tricloroacético (TCA). Las muestras fueron colocadas en un baño de hielo-agua durante 1 hora y luego centrifugadas a $15000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El precipitado se redisolvió en 0,2 ml de NaOH 0,1 M; SDS 1 % (p/v) y las proteínas fueron dosadas utilizando el método de Lowry (1951). Se utilizó seroalbúmina bovina como patrón. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento y las medidas fueron realizadas por duplicado en cada extracto. Los resultados se expresaron como miligramos de proteínas por gramo de tejido.

IV.3-12 Medida del contenido de proteínas solubles

Se trituraron inflorescencias de brócoli congeladas con un molinillo, aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido fueron homogeneizados con 1,5 ml de buffer 50 mM Tris-HCl, 0,04 % v/v mercaptoetanol, 2 mM EDTA; pH 7,5. El homogenato se centrifugó a $10000 \times g$ durante 20 min a 4°C , y las proteínas se dosaron en el sobrenadante de acuerdo al método de Bradford (1976). Se utilizó seroalbúmina bovina como patrón. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento y las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Los resultados se expresaron como miligramos de proteínas por gramo de tejido.

IV.3-13 Medida del poder antioxidante

El poder antioxidante de las muestras de brócoli fue determinado mediante el procedimiento descrito por Brand-Williams y col. (1995). Se trituraron inflorescencias de brócoli congelado con un molinillo y aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido se colocaron en 6 ml de etanol. La mezcla homogeneizada se centrifugó a $9000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sobrenadante se llevó a un volumen final de 100 ml con agua. Alícuotas del extracto etanólico (5, 10, 20, 40, 80 y 120 μL) se agregaron a tubos que contenían 3,9 ml de $0,025 \text{ g L}^{-1}$ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en metanol recién preparado. Se midió la absorbancia a 515 nm luego del tiempo de reacción necesario para que todos los tubos alcancen un estado estacionario de la reacción. El porcentaje de DPPH remanente para cada alícuota de extracto etanólico se utilizó para determinar la cantidad de muestra necesaria para disminuir la absorbancia inicial de DPPH en un 50%, lo que se define como EC_{50} . El poder antioxidante fue expresado como EC_{50}^{-1} . Se prepararon dos extractos para

cada tratamiento y tiempo de almacenamiento y cada medida se realizó por duplicado en cada extracto.

IV.3-14 Medida del contenido de TBARS

Las sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS) se midieron de acuerdo a Page y col. (2001). Se trituraron inflorescencias de brócoli congelado con un molinillo y aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido se homogeneizaron con 1 ml de ácido tricloroacético 10 % p/v, se lavó 4 veces con 10 ml de acetona y se centrifugó a 1300 xg durante 15 min. Se eliminó el solvente del pellet bajo N₂ e incubado a 100°C durante 30 min con 3 ml de H₃PO₄ 1% p/v y 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,6 % p/v. Para frenar la reacción se colocaron las muestras rápidamente en un baño de hielo y se agregó 3 ml de 1-butanol. Se agitaron las muestras vigorosamente para lograr una emulsión y luego se centrifugaron para separar las fases. Se midió la absorbancia a 530 nm en la fase acuosa. Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento y las medidas se realizaron por duplicado en cada extracto. Los resultados se expresaron como Abs a 530 nm por gramo de tejido.

IV.3-15 Análisis estadístico

La experiencia completa se realizó tres veces y las tendencias encontradas fueron similares. Los resultados que se presentan corresponden a una de las experiencias completa. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de ANOVA, las medias fueron comparadas mediante un test de LSD a un nivel de significancia de 0,05.

IV.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.4- A) Selección del tratamiento térmico

Las cabezas centrales de brócoli se trataron con distintas combinaciones tiempo/temperatura y se almacenaron a 20°C en oscuridad de modo de inducir el proceso de senescencia. Inmediatamente después del tratamiento todas las muestras tratadas presentaron una pérdida de peso entre 1 y 2 %, sin embargo no presentaron síntomas visibles de deshidratación. Durante el almacenamiento se observó una pérdida de peso de aproximadamente 1,5 % por día, pero no se detectaron diferencias significativas entre las muestras control y las tratadas térmicamente (datos no mostrados).

Para la selección del tratamiento térmico adecuado se utilizaron como parámetros la medida del color superficial (hue) y el contenido de clorofilas de las muestras tratadas. El valor inicial de hue fue aproximadamente 120 y dicho valor disminuyó durante el almacenamiento a 20° C en todas las muestras (**Tabla IV.1**). En todos los casos los datos del día 0 corresponden a los valores obtenidos en las muestras luego del tratamiento indicado.

Tabla IV. 1- Cambios en el valor de hue durante el almacenamiento a 20°C para los distintos tratamientos aplicados. LSD = 0.98

DIA	Control	37°C 1h	37°C 3h	42°C 1h	42°C 3h	45°C 1h	45°C 3h	48°C 1h	48°C 3h	50°C 1h	50°C 2h
0	118.22	119.00	118.45	119.02	118.89	118.74	118.58	119.00	118.77	118.43	119.02
1	117.89	114.87	116.22	117.10	116.74	117.90	118.34	116.88	118.00	117.96	117.12
2	115.81	110.21	111.20	112.68	113.41	114.23	117.54	116.02	117.29	112.67	115.53
3	102.30	98.64	110.56	111.25	112.31	112.41	110.21	111.02	116.34	109.41	110.11
4	97.32	89.54	92.41	96.47	97.88	100.02	109.00	102.31	113.10	101.57	102.22

En el caso de las muestras no tratadas los valores de hue fueron cercanos a 97 luego de 4 días a 20°C, indicando un importante amarillamiento de las inflorescencias.

Las muestras que fueron tratadas a 37°C durante 1 y 3 h (**Tabla IV.1**) presentaron una disminución del valor de hue más rápida que los controles, alcanzando

menores valores en el día 4. Los tratamientos de 42°C presentaron valores de hue similares a los controles, mientras que para los tratamientos a 45°C por 1 y 48°C por 1 h y 50°C por 1 y 3 h, los valores de hue fueron ligeramente superiores respecto al control.

Los tratamientos que mostraron mayor retención del color verde fueron los de 45°C 3 h y 48°C 3 h. En el primer caso, las muestras presentaron valores de hue cercanos a 109 en el día 4, mientras que en el segundo caso las muestras no presentaron cambios significativos del valor de hue hasta el día 3, y en el día 4 presentaron un ligero amarillamiento.

Los cambios en el contenido total de clorofilas (**Tabla IV.2**) fueron similares a los cambios observados en el color superficial. En las muestras controles se observó una disminución del 40% en su contenido de clorofilas después de 3 días de almacenamiento a 20°C. Las inflorescencias tratadas a 37°C 1 h mostraron menores niveles de clorofilas que los controles. Los tratamientos de 37°C durante 3 h, 42°C 1 h y 45°C 1 h no retrasaron la pérdida de clorofila respecto al control, mientras que los tratamientos 42°C 3 h, 48°C 1 h y 50°C 1 y 3 h disminuyeron su contenido de clorofilas en aproximadamente 35 %. El mayor retraso en la degradación de clorofilas fue observado en las cabezas tratadas a 45°C y 48°C durante 3 horas las que presentaron una disminución de sólo un 35 y 20 % respectivamente, del contenido de clorofilas inicial, luego de tres días de almacenamiento a 20°C.

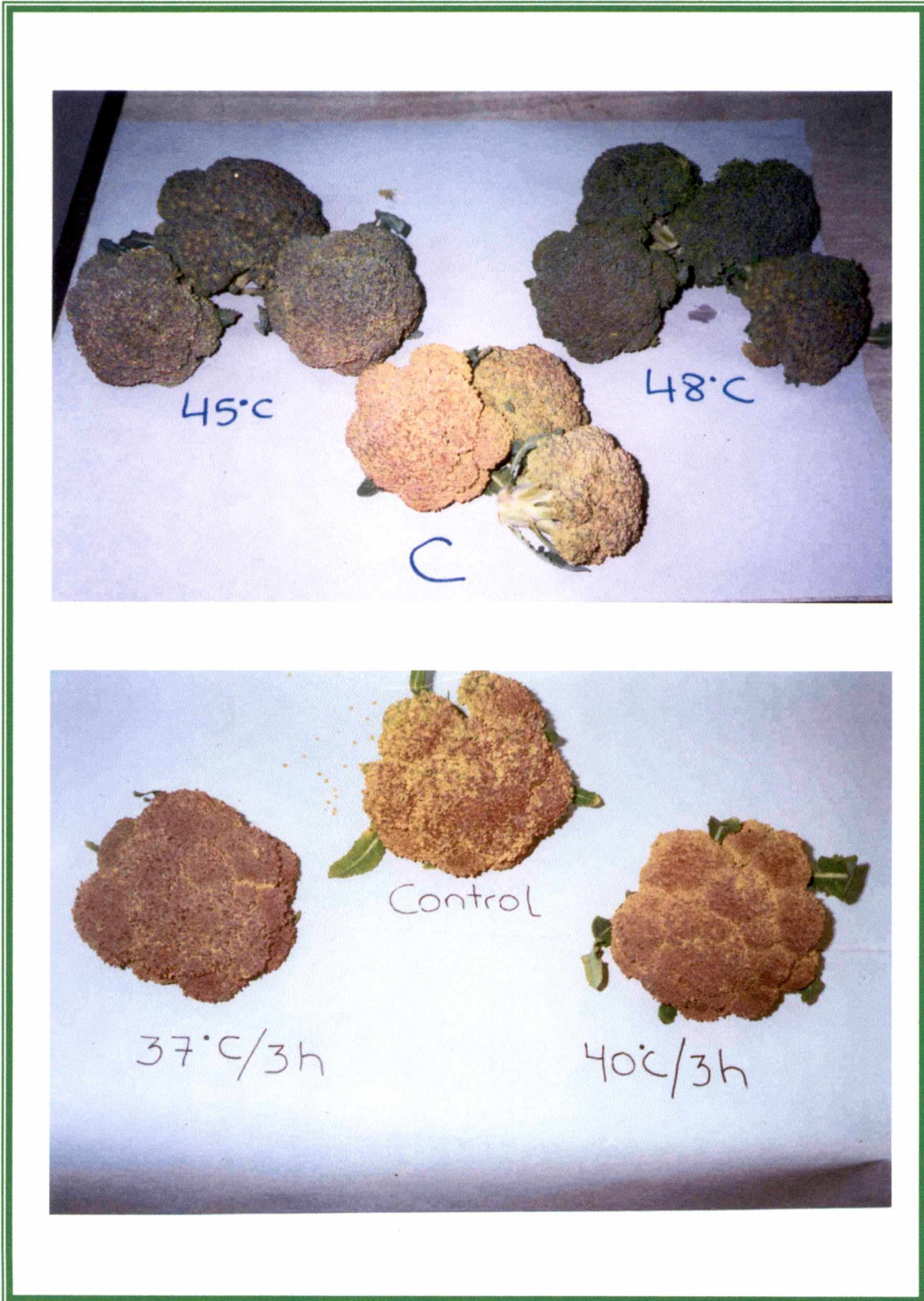
Tabla IV. 2- Cambios en el contenido de clorofilas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) luego de 3 días de almacenamiento a 20°C. LSD = 2.68

DIA	Tratamiento										
	Control	37°C 1h	37°C 3h	42°C 1h	42°C 3h	45°C 1h	45°C 3h	48°C 1h	48°C 3h	50°C 1h	50°C 3h
0	111.57	111.22	111.00	110.99	110.78	111.30	110.97	110.89	110.98	111.22	110.96
3	67.13	61.34	67.44	66.74	70.42	68.25	73.85	70.12	90.58	70.15	69.68

De acuerdo a los resultados obtenidos en la medida del color superficial (hue) y en el contenido de clorofilas, el tratamiento de 48°C durante 3 horas resultó ser el más efectivo para retrasar la pérdida de color verde y por lo tanto fue seleccionado para analizar el efecto del tratamiento térmico con aire caliente sobre la degradación de clorofilas y la senescencia postcosecha de brócoli. Todos los resultados que se presentan a continuación se refieren a este tratamiento seleccionado.

Fotos correspondientes a la selección del tratamiento térmico adecuado

Las fotos fueron tomadas luego de 4 días de almacenamiento a 20° C en oscuridad.



IV.4-B) Efecto del tratamiento de 48°C durante 3 h sobre la degradación de clorofilas

Una vez seleccionado el tratamiento térmico de 48°C durante 3 horas, se realizó otra experiencia en la que se estudió el efecto de este tratamiento sobre la degradación de clorofilas y sobre otros parámetros característicos de senescencia poscosecha de brócoli.

1. Medida del color superficial y observación visual de las muestras

Para la medida del color superficial se utilizó el valor de hue de acuerdo a lo que se explicó en el capítulo I . Se encontró que dicho valor disminuyó a mayor velocidad en las muestras controles que en las tratadas térmicamente (Figura IV.1). La disminución del valor de hue se detectó más tempranamente (día 2) en las muestras controles con respecto a lo observado en las tratadas térmicamente (día 4).

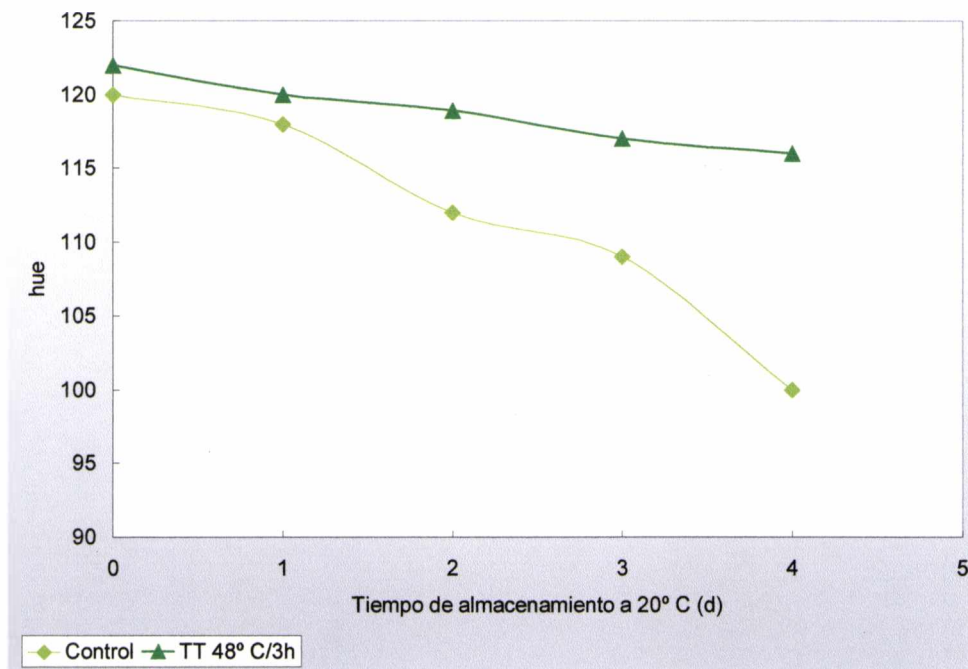


Figura IV.1- Cambios del valor de hue durante el almacenamiento a 20° C para las muestras control y tratadas a 48° C durante 3 horas. LSD: 0.9

2. Contenido de clorofilas y feofitinas

El nivel de clorofilas totales (a+b) disminuye continuamente durante el almacenamiento a 20°C en las muestras control, siendo el contenido de clorofilas un 50 % menor que el inicial luego de 4 días. Por el contrario, las muestras tratadas térmicamente mantuvieron altos niveles de clorofilas hasta el día 2. El tratamiento térmico no sólo retrasó el comienzo de la degradación de clorofilas por un día sino que además disminuyó la velocidad de degradación (**Figura IV.2**). El retraso en la degradación de clorofilas presentó correlación directa con la observación visual de los ramilletes.

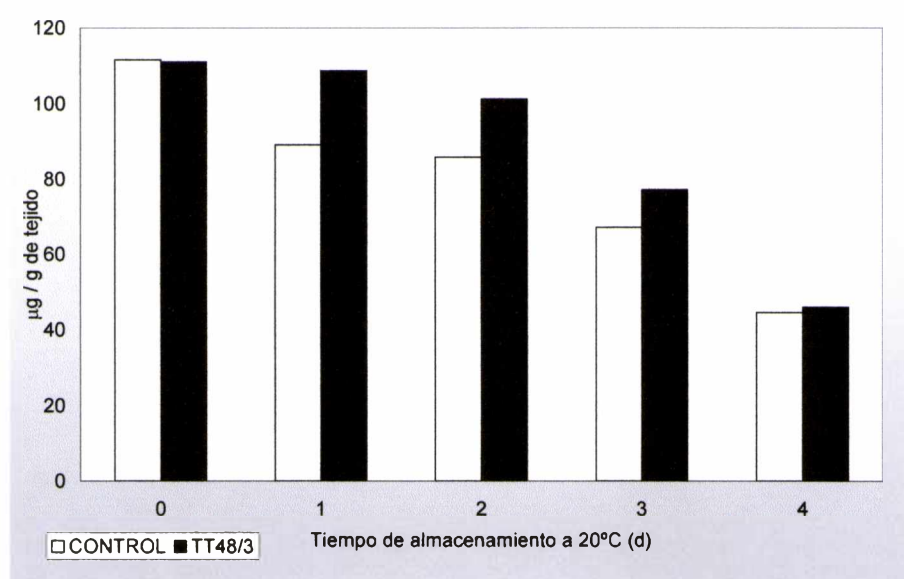
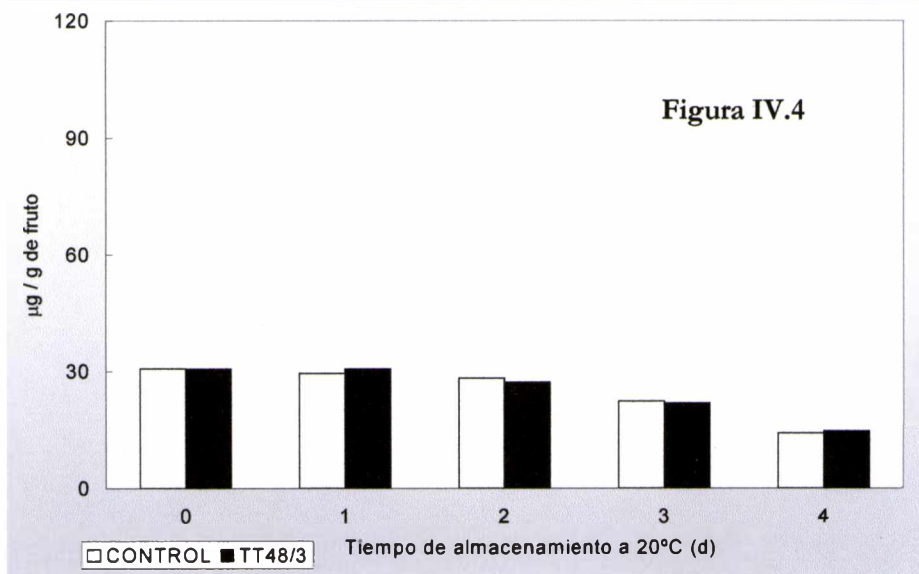
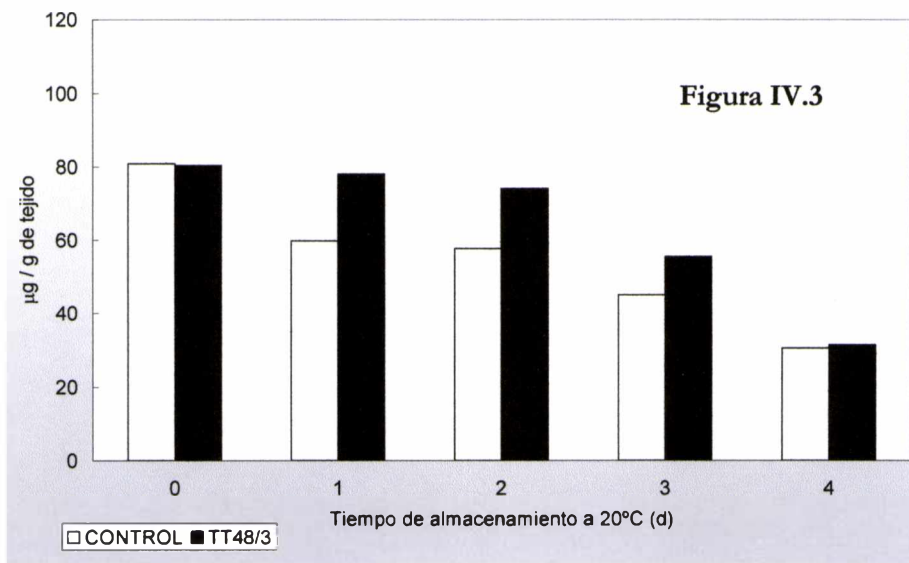


Figura IV.2 - Cambios en el contenido de clorofilas totales, expresado como µg de pigmento/g de tejido, durante la postcosecha de brócoli almacenado a 20°C en oscuridad. LSD = 2.5

Cuando se analizó la degradación de cada tipo de clorofilas (a y b) por separado, se encontró que el contenido de ambas disminuyó durante la senescencia a 20°C (**Figuras IV.3 y 4, controles**), pero la velocidad de degradación de clorofilas a fue mayor que la de clorofilas b. Este comportamiento ha sido descrito en otros sistemas, por ejemplo en hojas de arroz (Kura-Hotta y col., 1987). El tratamiento térmico provocó un retraso en la degradación de clorofilas a, mientras que no tuvo efecto sobre la degradación de las clorofilas b (**Figuras IV. 3 y 4**). Se ha postulado que todos los metabolitos de degradación de las clorofilas son derivados de la clorofila a y que la clorofila b se convierte en clorofila a por acción de la enzima “Clorofila b reductasa” que transforma clorofilido b en clorofilido a (Matile y col., 1999). El efecto que se observó sobre la degradación de las clorofilas a

pero no sobre clorofilas b, fue coincidente con el resultado mostrado en el capítulo III, donde se encontró que las enzimas que regulan la senescencia tienen efecto sobre la velocidad de degradación de clorofilas a, pero no sobre la velocidad de degradación de clorofilas b, estos resultados sugieren que el tratamiento térmico retrasa la degradación de



Figuras IV.3 y 4 Cambios en el contenido de clorofilas a (3) y b (4) expresadas como µg de pigmento/g de tejido, durante el almacenamiento a 20° C en las muestras control y tratadas a 48° C 3 horas. LSD: 2.3 y 2.2 para clorofilas a y b respectivamente.

clorofilas a ejerciendo su efecto en algún punto de regulación anterior a la conversión de clorofilas b en a.

Respecto a la evolución del contenido de feofitinas, un pigmento derivado de clorofilas, se encontró una acumulación de feofitinas durante los dos primeros días de almacenamiento en las muestras controles, y un descenso en el día 3 (Figura IV.5). Las muestras tratadas térmicamente presentaron una acumulación de feofitinas 50 % menor que los controles luego de dos días de almacenamiento.

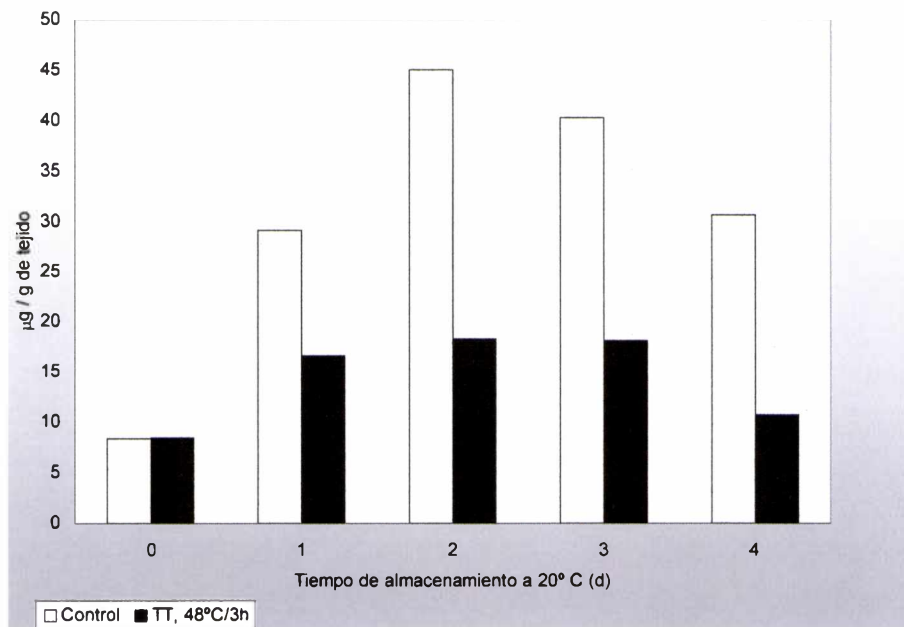


Figura IV.5 - Variación del contenido de feofitinas expresadas como µg de pigmento/g de tejido, durante la senescencia poscosecha de brócoli almacenado a 20° C en oscuridad. LSD = 2,7

De acuerdo con el mecanismo de degradación de clorofilas propuesto por Matile y col. (1999), el primer paso en la degradación de clorofilas sería la remoción del fitol y el segundo paso la remoción del catión central del anillo tetrapirrólico (Mg^{+2}), lo que conduce a la formación de clorofilidos en el primer paso y feofórbido en el segundo, por lo que no se estarían formando feofitinas de acuerdo a esta vía de degradación. Sin embargo, la acumulación transitoria de feofitinas durante la postcosecha de brócoli ha sido un resultado recurrente en este trabajo de tesis. La acumulación de feofitinas podría deberse a una remoción del Mg^{+2} directamente de las clorofilas intactas. Se ha descrito acumulación de feofitinas durante la senescencia de otros sistemas tales como hojas de perejil (Amir-Shapira y col., 1987) y hojas de *Ginkgo biloba* (Tang *et al.*, 2000). Los autores han sugerido que la eliminación del átomo de Mg^{+2} podría ocurrir antes de la defitilización de las clorofilas. La remoción de Mg^{+2} a partir de clorofilas y sus derivados puede ocurrir

mediante un mecanismo enzimático, por acción de la enzima MDS u otra enzima aún no estudiada o bien mediante un mecanismo no enzimático, la acidificación. Se ha sugerido que algunas moléculas de clorofilas intactas abandonan los cloroplastos dentro de plastoglobulos que son exportados hacia las vacuolas durante la senescencia de hojas de soja (Guiamet y col., 1999). Las condiciones de pH dentro de las vacuolas pueden favorecer la formación de feofitinas mediante el mecanismo no enzimático.

3. Medida de la actividad de las enzimas que degradan clorofilas.

Se analizó la actividad de algunas enzimas relacionadas con la degradación de clorofilas en las muestras control y tratadas durante el almacenamiento a 20°C.

3.1 Clorofilasa

La actividad clorofilasa de las muestras control aumentó durante el almacenamiento alcanzando el valor máximo en el día 3 y luego disminuyó (**Figura IV.6**). Las muestras tratadas no presentaron cambios en la actividad clorofilasa hasta el día 3 y luego la actividad aumentó alcanzando valores significativamente menores que los controles. Los estudios realizados hasta el momento acerca de la actividad clorofilasa durante la senescencia han arrojado resultados contradictorias. Durante mucho tiempo se ha considerado que se trata de una proteína hidrofóbica ubicada en la membrana de cloroplastos, sin embargo la clonación de algunos genes de clorofilasa han revelado que podría tener diferentes ubicaciones celulares y por lo tanto diferentes regulaciones (Takamiya *et al.*, 2000). Por estas razones es posible que la actividad clorofilasa presente distintos patrones de comportamiento en distintos sistemas lo que explicaría las diferencias que se encuentran en la bibliografía.

En algunas especies la actividad clorofilasa no varía durante la senescencia y se ha sugerido que la enzima estaría en forma latente, en una concentración estacionaria pero poniéndose en contacto con el sustrato sólo durante el período de senescencia (Matile y col., 1999). Sin embargo, en otros casos la actividad clorofilasa puede aumentar durante la senescencia (Sabater y Rodríguez, 1978; Yamauchi y Watada, 1991), o bien tal como ocurre en olivas, hay un aumento de la actividad clorofilasa en dos momentos del desarrollo: en

una etapa de crecimiento y posteriormente en una etapa degradativa (Minguez-Mosquera y Gallardo –Guerrero, 1995).

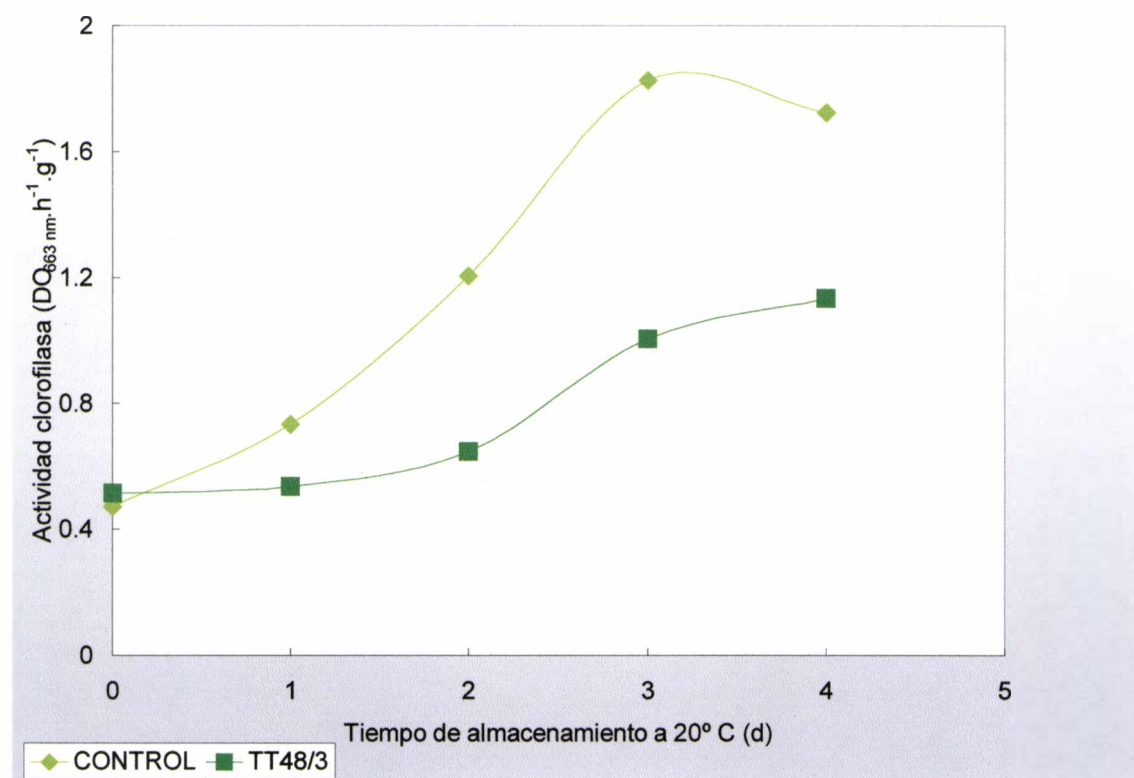


Figura IV.6- Cambios en la actividad clorofilasa durante el almacenamiento a 20° C para las muestras control y tratadas a 48° C durante 3 horas. La actividad clorofilasa se midió como el aumento de absorbancia a 663 nm por hora y por gramo de tejido.

LSD: 0.018

En el caso de brócoli se encontró que la actividad clorofilasa aumentó durante la senescencia poscosecha a 20°C al menos en dos variedades distintas: Cicco y Shogún (resultados del capítulo I y III) y que dicha actividad estaría influenciada por la acción de las hormonas que regulan la senescencia, etileno y citoquininas (resultados del capítulo III). Funamoto y col. (2002), trabajando con la variedad Haitzu, no detectaron cambios significativos de la actividad clorofilasa durante la senescencia, sin embargo encontraron una inhibición similar de la actividad clorofilasa como consecuencia del tratamiento térmico aplicado (50°C, 2h). Podemos suponer que las diferencias encontradas se deberían a diferencias genéticas ya que se trabajó con diferentes cultivares de brócoli y los mecanismos de degradación de clorofilas podrían ser diferentes en cada caso. En este sentido, Toivonen y Sweeney (1998) demostraron que diferentes variedades de brócoli

presentaron diferencias en su tasa de degradación de clorofilas durante la postcosecha a 13°C, lo que fue asociado con diferencias en la capacidad antioxidante de cada variedad.

Por otra parte es bien conocido que el etileno regula la expresión de clorofilasa, por lo tanto es de esperar que si el tratamiento térmico afecta a la síntesis de etileno debería afectar la degradación de clorofilas, al menos a nivel de clorofilasa.

3.2 Mg-Dequelatasa

La actividad MDS aumentó durante la senescencia postcosecha de brócoli en las muestras control y alcanzó valores tres veces superior respecto al valor inicial luego de 4 días de almacenamiento a 20°C (Figura IV.7). Las muestras que fueron tratadas térmicamente presentaron una tendencia similar pero el aumento de la actividad fue menor y hacia el final del almacenamiento la actividad MDS fue 50% menor que la correspondiente de los controles.

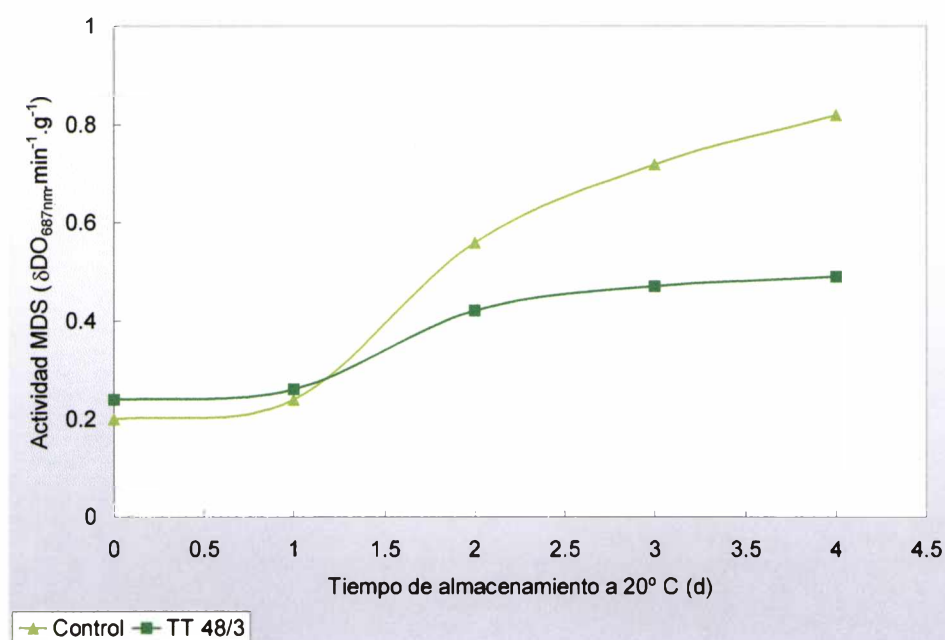


Figura IV.7- Cambios de la actividad MDS durante el almacenamiento a 20° C para las muestras control y tratadas a 48°C/3h. La actividad se expresó como el aumento de la absorbancia a 687 nm por minuto y por gramo de tejido. LSD: 0.22

La eliminación de Mg⁺² de los clorofilidos es un paso necesario para generar feoforbido, sustrato de la enzima feoforbido a oxigenasa, enzima que cataliza el clivaje del anillo tetrapirrólico (Matile *et al.*, 1999). Se ha publicado que durante el amarillamiento de las hojas de *Ginkgo biloba* (Tang *et al.*, 2000) aparece una acumulación de feofitinas

acompañada de un aumento de la actividad MDS, los autores han sugerido que la remoción del Mg^{+2} podría ser un paso clave en la degradación de clorofilas ya que hay un aumento de la actividad MDS pero no hay un aumento de clorofilasa

La actividad MDS aumenta durante la senescencia poscosecha de brócoli, éste aumento está bajo la influencia de las hormonas que regulan la senescencia (etileno y citoquininas), de manera similar a clorofilasa (resultados del capítulo I y III). La caracterización de extractos con actividad MDS permitió establecer que la remoción del Mg^{+2} ocurre sólo a partir de los compuestos defitilados (Shioi *et al.*, 1996). El hecho de que las hojas de *Ginkgo* (Tang y col., 2000), perejil (Amir-Shapira y col., 1987) e inflorescencias de brócoli acumulen feofitinas soportarían la posibilidad de que se pueda eliminar el Mg^{+2} a partir de compuestos fitilados. Los tratamientos térmicos inhibieron la acumulación de feofitinas desde el día 1, y el aumento de la actividad MDS desde el día 2, lo que indicaría que la acumulación de feofitinas se debería a otro mecanismo de remoción de Mg^{+2} que no implica la acción de MDS.

3.3 Peroxidasa

Numerosos trabajos realizados han mostrado que en presencia de fenoles las peroxidasas pueden tener una acción de blanqueamiento sobre clorofilas. El mecanismo propuesto sugiere que la enzima cataliza la oxidación con agua oxigenada de compuestos fenólicos generando un radical fenólico que es el responsable del blanqueo de la clorofila (Kato and Shimizu, 1985; Yamauchi *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1998). Estos trabajos fueron realizados “in vitro”, por lo que aún resta esclarecer la posible participación “in vivo” de la enzima.

En las muestras control la actividad de degradación de clorofilas mediada por peroxidasa se mantuvo sin cambios durante los primeros días de almacenamiento y aumentó considerablemente a partir del día 2, siendo su valor 3 veces superior al inicial en el día 4 (**Figura IV.8**). En las muestras tratadas térmicamente la actividad mediada por peroxidasa aumentó desde el día 2 pero siempre se mantuvo en valores inferiores a los correspondientes controles.

Funamoto y col. (2002) mostraron un resultado similar trabajando con brócolis de la variedad Haitzu tratados a 50°C durante 2h. Los autores sugieren que la menor velocidad de degradación de clorofilas provocada por el tratamiento estaría relacionada directamente con la menor actividad de peroxidasa. En este sentido, trabajando con un sistema de

degradación de clorofilas “in vitro” preparado a partir de extracto de brócoli (Yamauchi y col., 1997) se detectó un producto de oxidación de clorofilas, Clorofila a-1, el cual deriva de la acción de peroxidasa. En las muestras tratadas térmicamente se detectó una menor acumulación de Clorofila a-1, por lo que los autores proponen que la peroxidasa juega un rol importante en la degradación de clorofilas.

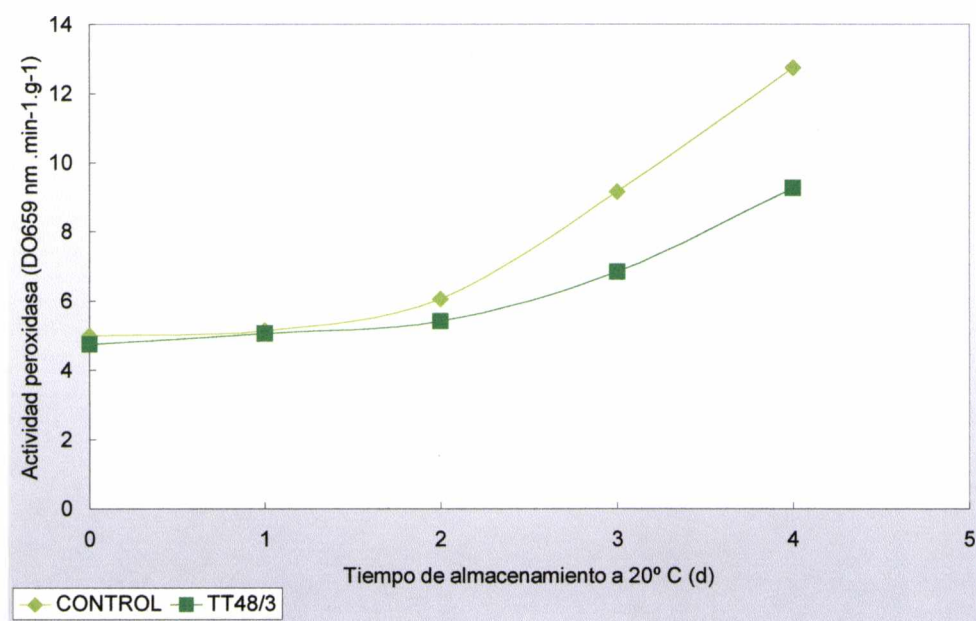


Figura IV.8- Cambios en la actividad de degradación de clorofilas mediada por peroxidasa durante el almacenamiento a 20° C en las muestras control y tratadas a 48° C durante 3 horas. La actividad se expresó como la disminución de la absorbancia a 659 nm por minuto y por g de tejido. LSD: 0.8.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que el aumento de la actividad mediada por peroxidasa sería un evento relativamente tardío de la senescencia poscosecha de brócoli. En los estadios más avanzados de senescencia la desorganización de cloroplastos permitiría el contacto entre los pigmentos, los compuestos fenólicos y la enzima, permitiendo la degradación de clorofilas por este mecanismo. Por otra parte, durante la senescencia se exportan desde cloroplastos plastoglobulos conteniendo moléculas intactas de clorofilas que serán finalmente incluidas en vacuolas (Guiamet y col., 1999), allí en presencia de peroxidasa y peróxido de hidrógeno se realizaría una intensiva degradación de clorofilas por este mecanismo.

Los tratamientos térmicos aplicados en la dosis adecuada, causan una situación de estrés transitoria en los tejidos, lo que conduciría posiblemente a la inhibición de algunas

reacciones que se producen durante la senescencia. Luego de esa situación de transición los tejidos continúan su desarrollo normal pero los efectos causados por el tratamiento se detectan algunos días después. Los resultados de este trabajo tales como la degradación de clorofilas, la acumulación de feofitinas y el aumento de la actividad clorofilasa, se detectaron un día después del tratamiento aplicado. El efecto de inhibición de la actividad MDS y degradación de clorofilas mediada por peroxidasa fue observado luego de tres días de almacenamiento a 20°C.

IV.4-C) Estudio del efecto del tratamiento térmico de alta temperatura sobre otros parámetros de senescencia.

1. Velocidad de respiración

La velocidad de respiración de las muestras tratadas y controles no presentó diferencias inmediatamente después del tratamiento (**Figura IV.9-**). La producción de CO₂ aumentó aproximadamente 1,5 veces después de 2 días a 20°C y luego disminuyó. Las muestras tratadas no presentaron cambios en la producción de CO₂ durante el almacenamiento.

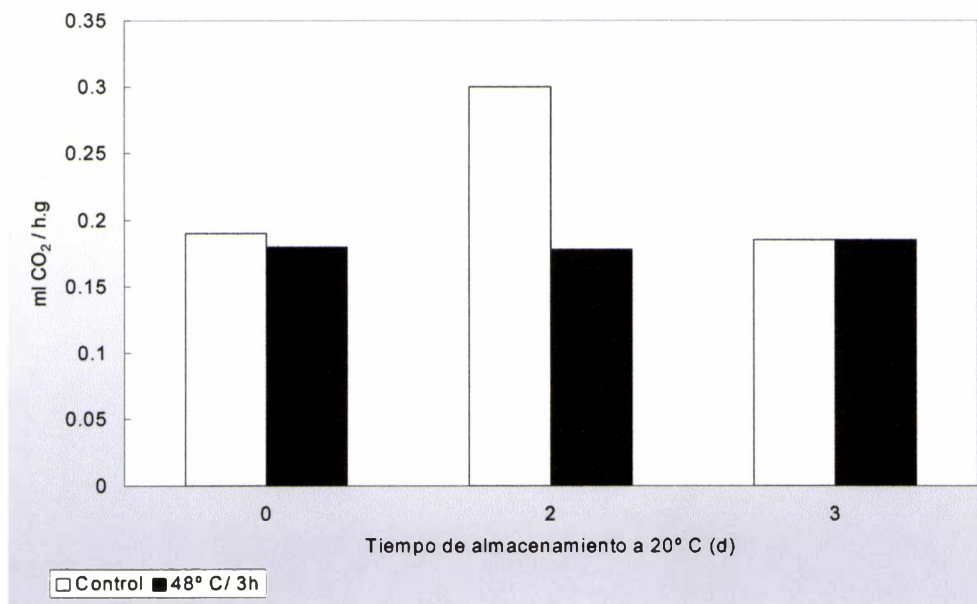


Figura IV.9- Velocidad de producción de CO₂ durante el almacenamiento a 20°C de muestras de brócoli control y tratadas a 48°C/3h. LSD = 0,068

Durante la senescencia de tejidos vegetales la velocidad de respiración y la producción de etileno aumentan considerablemente (Makhoulf y col., 1989). En brócoli, particularmente, la senescencia poscosecha está claramente relacionada con un aumento en la producción de etileno (Tian y col., 1994). Los tratamientos térmicos con agua caliente, de 47°C durante 7 min, producen una disminución en la velocidad de respiración y en la producción de etileno (Tian y col., 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que la velocidad de respiración fue menor para las muestras tratadas térmicamente, al menos luego de dos días de almacenamiento a 20°C, cuando las muestras aún no presentaban modificaciones en su apariencia externa. Las medidas de respiración no pudieron realizarse a tiempos mayores a 3 días ya que los controles presentaban hongos lo que anuló el valor de la medida de producción de CO₂ por parte de los tejidos. El resultado obtenido llevó a suponer que la senescencia estaría retrasada por efecto del tratamiento térmico de alta temperatura (TTAT) ya que los tejidos estarían menos dañados y por lo tanto tendrían menor actividad respiratoria.

2. Azúcares solubles

Durante el almacenamiento a 20°C, los azúcares disminuyeron tanto en las muestras controles como en las tratadas (Figura IV.10).

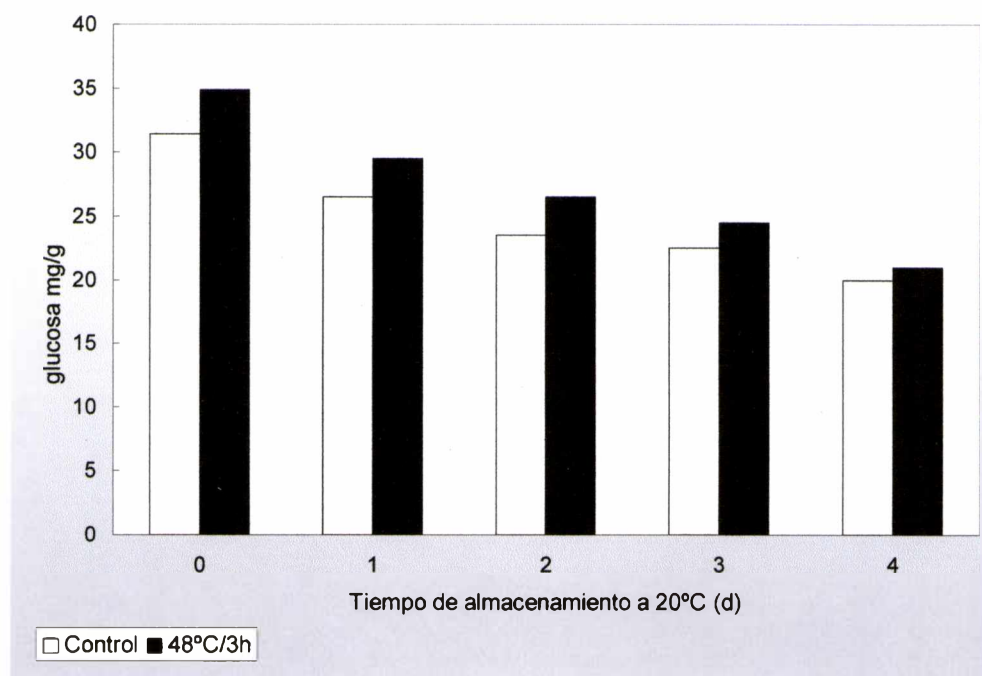


Figura IV.10- Cambios en el contenido de azúcares totales, expresados como mg de glucosa por g de tejido, durante el almacenamiento a 20°C de muestras de brócoli control y tratadas a 48°C/3h. LSD = 1,12

Inmediatamente después del tratamiento el contenido de azúcares totales fue aproximadamente 11 % mayor en las muestras tratadas. Tian y col. (1997) encontraron un resultado similar trabajando con ramilletes de brócoli tratados con agua a 47° C durante 7,5 min caliente, quienes encontraron un aumento en el nivel de sacarosa inmediatamente después del tratamiento.

Los tejidos inmaduros necesitan los azúcares simples para mantener la respiración y de esta manera conservar la calidad y retrasar la senescencia. Downs y col. (1997) encontraron un ligero aumento del contenido de glucosa y fructosa acompañado de un descenso de sacarosa inmediatamente luego de la cosecha de brócoli. Recientemente se ha detectado un incremento en la actividad de la enzima invertasa y un aumento en la expresión de dos genes que la codifican durante la senescencia poscosecha de brócoli (Coupe y col., 2002). Los genes aumentan su expresión seis o doce horas después de la cosecha y aumentan durante la senescencia. Probablemente el aumento de azúcares totales luego del tratamiento se debería a un menor consumo por respiración y una inhibición de la hidrólisis de sacarosa.

3. Contenido de proteínas solubles y totales

Durante la senescencia se produce una intensa degradación de proteínas, cuyos aminoácidos liberados son utilizados en la respiración. El contenido de proteínas solubles está relacionado con una alteración de la distribución compartamental de las moléculas dentro de las células. El contenido de proteínas solubles de las muestras control aumentó luego de 3 días de almacenamiento a 20° C y se mantuvo constante hasta el final del almacenamiento, mientras que en las muestras tratadas térmicamente no se observaron cambios. Al finalizar el almacenamiento el nivel de proteínas solubles fue un 24% mayor en las muestras control que en las tratadas (**Figura IV.11 A**).

Por otro lado, el contenido de proteínas totales se relaciona con el avance de la senescencia ya que durante la misma se produce una importante degradación, lo cual se considera un síntoma del proceso.

El contenido de proteínas totales disminuyó tanto en las muestras controles como en las muestras tratadas térmicamente durante el almacenamiento a 20°C (**Figura IV.11 B**).

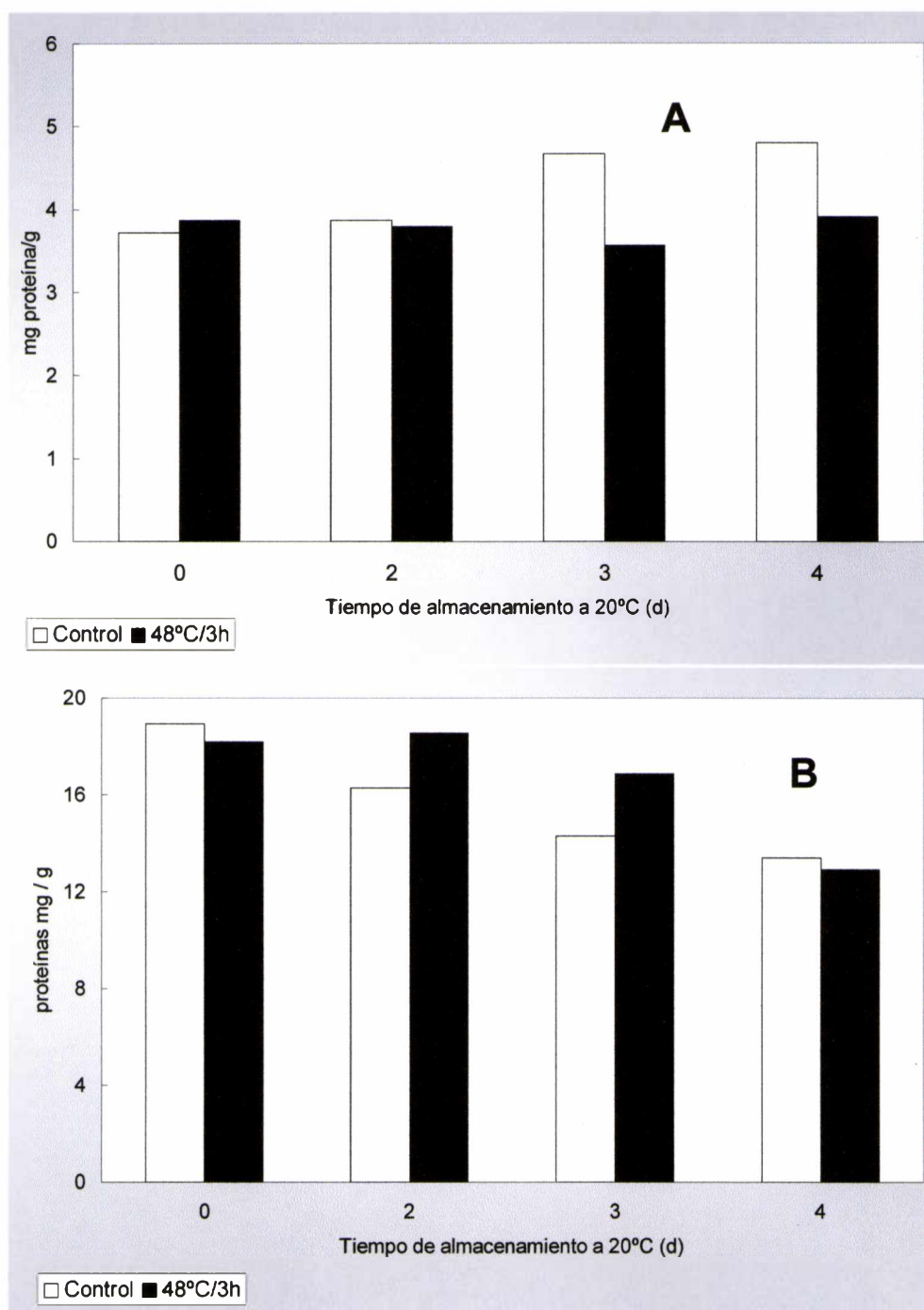


Figura IV.11- Cambios en el contenido de proteínas solubles (A) y totales (B) durante el almacenamiento a 20°C de muestras de brócoli control y tratados a 48°C/3h. Los valores de LSD fueron 0,3 y 0,9 respectivamente.

Sin embargo, en las muestras tratadas el contenido de proteínas totales se mantuvo constante hasta el día 2 a partir del cual disminuyó pero a menor velocidad que los controles, y se mantuvo siempre en niveles mayores que los respectivos controles.

De todos modos se presentó una disminución muy importante en el día 4 alcanzando valores similares a los controles.

Durante la senescencia poscosecha de brócoli se produce una disminución importante del contenido de proteínas totales (Pogson y Morris, 1997; Page y col., 2001). En este trabajo encontramos una disminución del contenido de proteínas totales, y un ligero aumento de las solubles luego de tres días de almacenamiento. En estadíos avanzados de senescencia posiblemente la pérdida de integridad de las membranas llevaría a la solubilización de las proteínas de membrana (Dangl y col., 2000). El tratamiento térmico no sólo retrasó la proteólisis generalizada que acompaña a la senescencia sino que inhibió la solubilización de proteínas.

4. Contenido de antioxidantes y TBARS

El nivel de antioxidantes disminuye durante el almacenamiento a 20°C (Figura IV.12). Las muestras control disminuyeron continuamente su poder antioxidante durante el almacenamiento a 20°C conservando sólo el 30% del valor inicial.

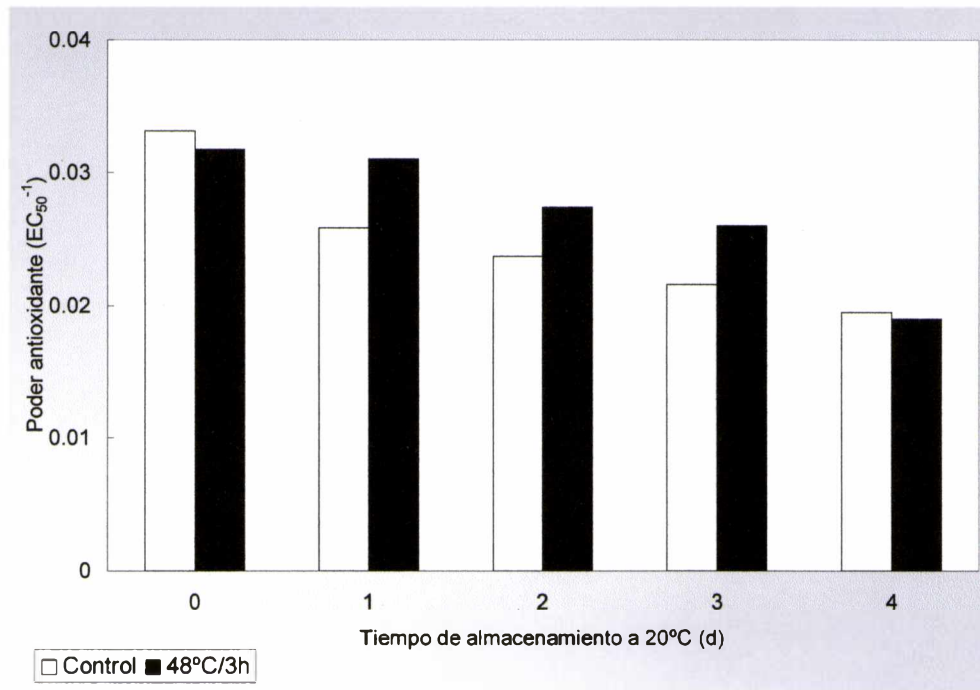


Figura IV.12- Cambios del poder antioxidante durante el almacenamiento a 20°C de muestras de brócoli control y tratadas a 48°C/3h. El poder antioxidante se expresa como EC₅₀⁻¹. LSD = 0,002

Las muestras que fueron tratadas térmicamente mantuvieron altos niveles de poder antioxidante luego de 3 días de almacenamiento a 20°C. En el día 4 no se presentaron diferencias entre las muestras control y las tratadas térmicamente.

El contenido de TBARS aumentó en las muestras controles durante el almacenamiento a 20°C (Figura IV.13), mientras que las muestras que fueron sometidas al tratamiento térmico presentaron sólo un leve aumento. Luego de 4 días de almacenamiento el nivel de TBARS fue 40% menor en las muestras tratadas respecto a los controles.

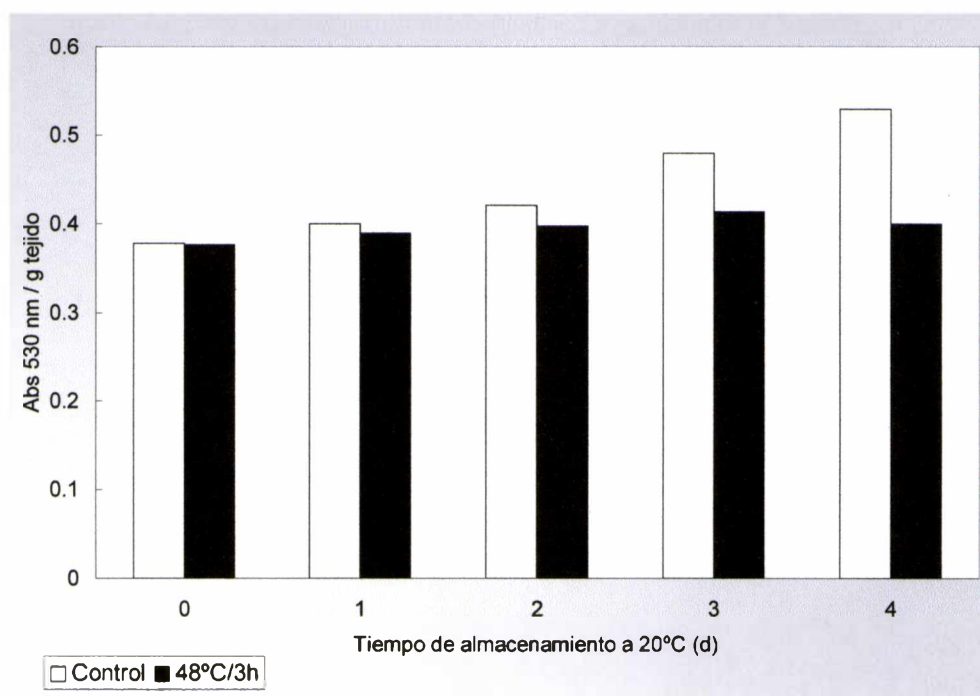


Figura IV. 13- Cambios en el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante el almacenamiento a 20°C de muestras de brócoli control y tratadas a 48°C/3h. LSD = 0,012

La peroxidación de lípidos está relacionada con el deterioro de los vegetales verdes durante el almacenamiento. En brócoli, la actividad lipooxigenasa y el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que representan la peroxidación de lípidos y otras macromoléculas, aumentan durante la senescencia (Zhuang y col., 1995; Page y col., 2001). Además, el contenido de ácido ascórbico, que representa el principal compuesto antioxidante presente en este producto, también disminuye durante la senescencia (Barth y col., 1993). En este último trabajo se encontró una importante reducción del contenido de ácido ascórbico acompañado de un incremento en el contenido

de productos de peroxidación de macromoléculas durante durante el almacenamiento. En nuestro caso, el tratamiento térmico retrasó la disminución del poder antioxidante de las muestras e inhibió el incremento de TBARS. Por lo tanto, se puede aseverar que el tratamiento térmico aplicado contribuyó a mantener el nivel antioxidante de brócoli y la integridad de los tejidos.

IV. 5 CONCLUSIONES

- ❖ La pérdida de color verde es el problema más importante durante la vida poscosecha de brócoli ya que el amarillamiento de las inflorescencias reduce la calidad del producto. La aplicación de un tratamiento térmico adecuado, 48°C durante 3 h, resultó efectivo para retrasar el amarillamiento de las inflorescencias de brócoli almacenado sin refrigeración.
- ❖ El retraso en el amarillamiento se correlacionó con un retraso en el aumento de la actividad de las enzimas que degradan clorofilas (clorofilasa, MDS y peroxidasa), manteniendo elevado el contenido de clorofilas y el color de las inflorescencias durante más tiempo.
- ❖ El tratamiento térmico permitió prevenir el deterioro de los tejidos manteniendo la integridad de membranas. Esto contribuyó a mantener elevado los niveles de clorofilas por un segundo factor distinto a la disminución de la actividad de las enzimas. Se mantuvo la integridad de la célula, evitando la pérdida de compartimentalización y el consecuente contacto de las clorofilas con pH bajos y con H₂O₂ presentes en vacuola, lo que aceleraría la degradación de los pigmentos.
- ❖ El tratamiento térmico no sólo retrasó la degradación de clorofilas, sino que retrasó otros síntomas de senescencia, como la pérdida de proteínas, la peroxidación de macromoléculas y la disminución de antioxidantes. Estos resultados llevarían a pensar que el tratamiento térmico afecta a alguna regulación general de senescencia, como podría ser la producción de etileno, o algún otro factor que esté relacionado con la integridad de los tejidos y mantenimiento de la compartimentalización.

Capítulo V

Efecto del tratamiento
con luz UV-C sobre la degradación de
clorofilas durante la senescencia
postcosecha de brócoli



V.1- INTRODUCCIÓN

Características de la radiación UV

La región del espectro electromagnético que corresponde a la luz UV puede ser dividida en tres partes:

UV-A	315 - 400 nm
UV-B	280 – 315 nm
UV-C	< 280 nm

La luz UV-C sólo puede ionizar determinadas moléculas y en determinadas condiciones por lo tanto se la considera radiación no ionizante. Los fotones UV-C tienen energía suficiente para destruir uniones químicas causando reacciones fotoquímicas que serían las responsables de los efectos biológicos que producen las radiaciones UV.

Efectos de la radiación UV B/C en plantas

Las radiaciones UV pueden causar daños a la mayoría de las macromoléculas que componen las células vegetales. El ADN, particularmente, es una de las moléculas blanco de las radiaciones UV-C. Cuando este tipo de radiación es absorbida por el ADN se producen numerosas reacciones fotoquímicas, entre las que se destaca la dimerización de timinas, lo que llevaría a una menor actividad biológica del ADN. Las proteínas que poseen grupos aromáticos que absorben a estas longitudes de onda también son dañadas por las rad UV. La luz UV-C produce también reacciones de fotooxidación en plantas a través de la producción de radicales libres y generación de especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres y superóxidos cuando están en alta concentración en los tejidos pueden dañar membranas celulares, ácidos nucleicos, pared celular y proteínas, resultando en una aceleración del proceso de senescencia (Kon and Schwimmer, 1977; Leshem y col., 1986).

Los estudios realizados acerca de los efectos de la radiación UV sobre la fisiología de plantas presentan resultados coincidentes, que permiten resumir dichos efectos de la siguiente manera:

- 1. Efecto sobre la fisiología de cloroplastos**
- 2. Efecto sobre el metabolismo de flavonoides**
- 3. Efecto sobre la estructura de membranas**
- 4. Efecto sobre la producción de etileno**

1. Efecto de la luz UV sobre la fisiología de cloroplastos

Los fotones de luz UV-C son absorbidos por las clorofilas, pigmentos fotosintéticos. La energía absorbida es utilizada por los electrones de las moléculas para pasar a un nivel de mayor energía (electrones excitados) generando radicales libres, los que pueden producir daños en los tejidos.

Las clorofilas están asociadas a proteínas formando complejos altamente organizados ubicados en las membranas tilacoidales y que cumplen la función vital de absorber la energía solar para ser utilizada en la fijación del CO₂ a través de la fotosíntesis. Los carotenoides son pigmentos accesorios que absorben la energía de excitación de las clorofilas evitando la generación de radicales libres que pueden dañar a las proteínas cuando la fotosíntesis está saturada de luz. Un exceso de radiación UV-C daña la estructura de los cloroplastos ya que desorganiza los tilacoides, y produce una progresiva desorganización de los complejos pigmento proteínas y de la doble membrana de cloroplastos. Se ha demostrado que este daño es producido por una excesiva acumulación de radicales libres, principalmente hidroxilos y metilos, como consecuencia de la situación de estrés. Estos efectos fueron observados tanto en membranas tilacoidales aisladas (Kovács y col., 2002) como en hojas enteras (Hideg y Vass, 1996) tratados con UV-C.

Altos niveles de radiación UV-B pueden tener profundos efectos sobre las proteínas ya que afectan directamente a los residuos de amino ácidos aromáticos que absorben fuertemente en esta región del espectro. Los efectos nocivos de las radiaciones UV sobre las proteínas de cloroplastos han sido estudiados y se ha demostrado que el fotosistema II es el más sensible (Wilson y col., 1995)

Cuando las plantas son sometidas a una situación de estrés con luz UV, se produce una reorganización de la estructura de las células vegetales, aparece una acumulación de carotenoides secundarios, se forman cuerpos lipídicos que contienen carotenoides primero

dentro de los cloroplastos los que se convierten en cromoplastos y se ubican en la periferia de las células y finalmente forman una capa lipídica rica en carotenoides secundarios dentro de la pared celular. La capa lipídica cumple funciones de filtro de luz, protege a los componentes celulares del daño fotooxidativo y de las pérdidas de agua (Bar y col., 1995)

2. Efecto de la luz UV sobre el metabolismo de Flavonoides

La irradiación de *Arabidopsis* con luz UV-C resulta en un aumento de una familia de flavonoides que absorben luz UV-C y que se acumulan en las partes aéreas de las plantas. Los flavonoides acumulados protegen a las hojas de *Arabidopsis* frente al daño fotooxidativo (Lois, 1994 a y b). También se ha observado que en manzanas rojas Royal Gala, el color de la piel se intensifica cuando se iluminan con luz UV en comparación a las iluminadas con luz blanca, la composición de flavonoides es similar, pero en las irradiadas con luz UV presentaron inducción de la síntesis de los mismos (Dong y col., 1995).

3. Efectos de la luz UV a nivel de membranas

Los citocromos-b que forman parte de las membranas plasmáticas de las células de plantas superiores podrían ser reducidos mediante la radiación con luz UV-C. Se ha demostrado que esta reducción puede prevenirse utilizando inhibidores de reacciones fotoquímicas de flavinas, lo que sugiere que la radiación UV utilizaría una flavina como receptor (Asard y col., 1995).

Muchos genes de plantas que responden a distintos tipos de estrés ambiental son regulados por el ácido jasmónico. Este compuesto deriva del ácido linolénico, que es un ácido graso componente de las membranas en la mayoría de las especies de plantas y su nivel intracelular se incrementa frente a ciertas señales. Cuando se irradian hojas de tomate con luz UV se induce la expresión de algunos genes de defensa en plantas, que son normalmente activados por el ácido jasmónico en respuesta a un daño. La respuesta a la luz UV puede ser bloqueada mediante un inhibidor de jasmónico pero esta inhibición no se logró en tomates mutantes con defecto en la vía de jasmónico (Conconi y col., 1996).

4. Efecto de la luz UV sobre la producción de etileno

El último paso en la síntesis de etileno es la conversión de ácido 1 aminociclopropano 1 carboxílico (ACC) en etileno. Se ha estudiado que la producción de etileno endógeno ACC dependiente puede estimularse con luz UV (Corbineau y col., 1995).

La radiación con luz UV genera radicales libres: ¿ Cuáles son sus consecuencias ?

El exceso de radiación UV genera la producción de radicales libres, los que como se ha mencionado anteriormente , pueden causar daños en macromoléculas y alterar la organización de los tejidos. Las plantas tienen mecanismos de defensa que actúan frente a estos radicales libres, pero si la producción de los mismos supera la capacidad de detoxificación que tienen los tejidos se producirán daños irreparables.

Por otra parte, los radicales libres formados por el exceso de radiación pueden actuar como señales de numerosos procesos en plantas, si las cantidades generadas son pequeñas. Estas señales pueden disparar mecanismos de defensa que modifican el metabolismo de modo de adaptarse a la situación de estrés.

En consecuencia, el exceso de radiación induce la producción de radicales libres, los cuales generan una respuesta en el tejido de modo de adaptarse a la nueva situación de estrés (ej. estimulación de la síntesis de sustancias antioxidantes). Pero si la producción de radicales libres supera a los mecanismos de defensa entonces se producirá daño (Foyer y col., 1994), que si es excesivo puede llegar a ser irreversible, por lo tanto, si bien las radiaciones UV-C en exceso pueden resultar perjudiciales para los tejidos, si se utilizan bajas dosis o más precisamente dosis adecuadas se pueden lograr determinados efectos deseados en los tejidos (Calabrese y col., 1987).

En el año 1980, Luckey (1980) introdujo el concepto de “hormesis”, definido como la estimulación de un efecto beneficioso en los tejidos en respuesta a dosis bajas o subletales de un agente causante de estrés físico o químico. Es por ello que en los últimos años se comenzó a utilizar las radiaciones con luz UV-C como posible estrategia en la tecnología de poscosecha. Se ha demostrado que la radiación UV induce el sistema antioxidante de defensa en cotiledones de girasol, posiblemente como respuesta al estrés oxidativo que se produce como

consecuencia de la radiación aplicada (Costa H. y col., 2002). Trabajando con pulsos de radiación UV-C Marquenie y col. encontraron que se inducen los mecanismos de defensa que aumentan la resistencia frente a hongos patógenos en frutillas (Marquenie D. Y col, 2003).

Tratamientos poscosecha con luz UV-C

Los primeros estudios realizados con tratamientos de luz UV-C estaban relacionados con la acción germicida de estas radiaciones en el rango entre 200-280 nm, con un pico máximo de emisión en 254 nm. Las radiaciones UV-C eran utilizadas como un tratamiento superficial ya que sólo penetran entre 50 y 300 nm en los tejidos (Jagger, 1965). Sin embargo, pronto se encontró que el efecto no era sólo sobre los microorganismos sino que el tratamiento generaba una respuesta activa en el tejido vegetal. Se ha demostrado que estos tratamientos inducen resistencia en cebollas (Lu y col., 1987), papas cortadas (Cheema y Haard, 1978) y en zanahorias cortadas (Mercier y col., 1993). Particularmente, puede inducirse la formación de fitoalexinas, compuestos que participan activamente en mecanismos de defensa frente a enfermedades, como por ejemplo resveratrol en uvas (Langcake y Pryce 1997) y hidroxifaseolina en soja (Bridge y Klarman, 1973).

Asimismo, se ha descrito que los tratamientos con UV-C retrasan la maduración de frutos climatéricos tales como manzanas y duraznos (Lu y col., 1991), pero los mecanismos biológicos involucrados en dicho retraso aún no se han caracterizado. La radiación UV-C (254 nm) ha sido utilizada con éxito como tratamiento poscosecha para retrasar la maduración y senescencia en tomate (Maharaj R. y col, 1999). Hasta el momento no se han publicado trabajos donde se estudie el efecto de esta tecnología poscosecha sobre senescencia de productos hortícolas.

Dado que la radiación UV-C es relativamente fácil de aplicar a gran escala y que requiere una inversión de bajo costo si la comparamos con otras alternativas, nos resulta interesante estudiar el efecto de la radiación UV-C sobre la vida poscosecha de brócoli, y analizar cuales serían los mecanismos mediante los cuales se produce un atraso en la senescencia.

V.2- OBJETIVO

“Utilizar los tratamientos con luz UV-C como estrategia para retrasar la degradación de clorofilas durante la postcosecha de brócoli.”

Actividades propuestas para cumplir el objetivo:

- A) Seleccionar una dosis de radiación con luz UV-C que sea adecuada para retrasar el amarillamiento poscosecha de brócoli.
- B) Analizar el efecto de la dosis seleccionado sobre la degradación de clorofilas.
- C) Analizar el efecto de la dosis seleccionado sobre otros parámetros que son afectados por la radiación UV.

V.3- MATERIALES Y MÉTODOS

V.3-1 Material vegetal y selección del tratamiento con luz UV-C

Se trabajó con cabezas centrales de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica, cv Cicco) cultivadas a campo, las que fueron adquiridas en una quinta de la zona de Arana, La Plata. Inmediatamente después de la cosecha las muestras fueron llevadas al laboratorio para utilizarlas en las experiencias. Para seleccionar la dosis de luz UV-C (máximo de emisión a 254 nm) adecuada, se ordenaron dos cabezas de brócoli por bandeja y se prepararon 10 bandejas para cada dosis de radiación ensayada. Las bandejas se colocaron bajo 4 lámparas de UV-C (TUV G30T8, 30W, Philips) a una distancia de radiación de 30 cm. Se ensayaron dosis de 0, 4, 7, 10 y 14 KJ/m², la que fueron medidas utilizando un radiómetro digital (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, Illinois, USA). Luego de los tratamientos las bandejas se cubrieron con PVC perforado para disminuir la pérdida de agua durante el almacenamiento, el cual se realizó a 20° C durante 6 días. El efecto de la dosis aplicada fue evaluado midiendo el color superficial y el contenido de clorofilas y feofitinas luego de 5 días de al finalizar el almacenamiento a 20°C. Se realizó además la medida de pérdida de peso de las muestras durante el almacenamiento. La experiencia de selección de tratamiento fue realizada tres veces y en todos los casos las tendencias fueron iguales, los resultados que se presentan corresponden a una de las experiencias.

Para realizar los estudios del efecto del tratamiento con luz UV-C sobre degradación de clorofilas y otros parámetros de senescencia se utilizaron 80 cabezas centrales de brócoli, 40 fueron irradiadas con la dosis seleccionada (10 kJ.m⁻²) y 40 no se irradiaron (controles). Luego de los tratamientos las muestras fueron cubiertas con PVC perforado y almacenadas durante 6 días a 20°C. Las muestras fueron analizadas inmediatamente o congeladas y almacenadas a -80° C hasta el momento del análisis. Para las determinaciones químicas (clorofilas, feofitinas, actividades enzimáticas, fenoles, flavonoides y antioxidantes) se separaron los tallos y se trabajó sólo con las inflorescencias.

V.3-2 Medida del color superficial

La medida del color superficial se realizó mediante un colorímetro (Minolta CR300, Osaka, Japón). Se obtuvieron los parámetros L*, a*, y b* y se calculó el valor del ángulo hue (h°) según $h^{\circ} = \arctg b/a$, cuando a es positivo y $h^{\circ} = 180 - \arctg b/a$, cuando a es

negativo. Para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento se realizaron las medidas sobre 20 cabezas de brócoli y en cada cabeza se midieron 3 posiciones diferentes.

V.3-3 Medida del contenido de clorofilas y feofitinas

Aproximadamente 0.5 g de tejido de brócoli congelado y triturado (con un molinillo) se colocaron en 5 ml de acetona. La suspensión se agitó para favorecer la extracción y se centrifugó a 6000 x g durante 15 min. El sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de clorofilas por espectrofotometría según el método de Lichtenthaler (1987). Los resultados se expresaron como microgramos de clorofilas por gramo de tejido. Para la medida del contenido de feofitinas (Pheo) se utilizó el extracto de clorofilas obtenido. Todas las clorofilas presentes en el extracto se transformaron en feofitinas mediante el agregado de una gota de HCl 25% v/v cada 5 ml de sobrenadante. La cantidad de Pheo iniciales se obtuvo por diferencia entre la cantidad de feofitinas obtenidas luego de agregar el ácido y la cantidad de clorofilas iniciales de cada extracto, de acuerdo al método de Lichtenthaler (1987). Para cada condición de tiempo y tratamiento se prepararon dos extractos y las medidas se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como microgramos de clorofilas por gramo de tejido.

V.3-4 Preparación del extracto enzimático

El tejido congelado se homogeneizó en un Omnimixer a máxima velocidad durante 3 minutos a 4°C en presencia de buffer de extracción: fosfato de sodio 0,1 M pH 6, Triton X-100 0,1% v/v, PVPP 1% p/v, cisteína 1mM. El homogenato se mantuvo en agitación por 1 hora a 4°C y luego se centrifugó a 10000xg durante 20 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante se filtró por vacío a través de papel. El extracto así obtenido se microfugó, se alicuotó y se almacenó a -20°C hasta el momento de realizar las medidas de actividad. Se prepararon dos homogenatos para cada muestra y las medidas de actividad se realizaron por duplicado en cada homogenato.

V.3-5 Preparación de los sustratos de las enzimas

Aproximadamente 6 g de hojas de acelga (*Beta vulgaris* var. cicla L.) se homogeneizaron con 60 ml de una mezcla acetona/agua (80/20) en Omnimixer. La suspensión obtenida se filtró a través de papel utilizando vacío. Al filtrado se le adicionaron 40 ml de éter de petróleo para extraer las clorofilas. Para obtener las clorofilas que se usaron como sustrato de clorofilasa

y peroxidasa, se eliminó el éter de petróleo por evaporación bajo corriente de N_2 y se reemplazó el solvente por acetona. Para obtener la clorofilina, sustrato de Magnesio dequelatasa (MDS), la fase etérea se trató con KOH 30% p/v en metanol, se dejó precipitando en oscuridad y se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado de clorofilina se resuspendió en tricina 1 M, pH 9. Ambos sustratos se conservaron a -20°C .

V.3-6 Medida de la actividad clorofilasa

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo: buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7, Triton X-100 0,15% v/v, clorofilas (aproximadamente 10 mM de modo de lograr una absorbancia inicial a 663 nm de 0,45) y acetona 16% v/v, siendo el volumen final de la mezcla de reacción de 13 ml. A esta mezcla se le agregaron 2 ml del extracto enzimático preparado de acuerdo a V.3-d y se incubó a 40°C . Luego de 0, 1, 2, 4, 8 y 18 horas se tomó 1 ml de la mezcla de reacción y se agregó sobre 3 ml de una mezcla hexano/acetona (70/30) previamente enfriada a 0°C , se agitó vigorosamente hasta la formación de una emulsión y finalmente se centrifugó a $9000\times g$ durante 10 min a 4°C para separar las fases. Se midió la absorbancia a 663 nm en ambas fases, la desaparición de clorofila en la fase superior y la aparición de clorofilidos en la fase inferior. Las mezclas de reacción se mantuvieron durante la medida al resguardo de la luz. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de aparición de clorofilico en la fase acuosa por gramo de tejido: $\delta A_{663\text{ nm}}, \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

V.3-7 Medida de la actividad Mg-dequelatasa (MDS)

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por buffer Tris/tricina 0,1 M pH 9, 50 μl clorofilina ($\text{DO}_{687\text{ nm}} = 0,3$), 150 μl extracto enzimático preparado de acuerdo a V.3-d en un volumen final de 500 μl . La mezcla de reacción se incubó a 37°C determinándose la producción del derivado sin Mg^{+2} de la clorofilina mediante la medida de la absorbancia a 687 nm durante 10 min. La actividad enzimática se expresó como la velocidad de formación de feoforbido por gramo de tejido: $\delta A_{687\text{ nm}}, \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

V.3-8 Medida de la actividad peroxidasa

Se preparó una mezcla de reacción compuesta por buffer fosfato 0,2 M pH 5, tritón X-100 0,2% v/v, ácido p-cumárico 5 mM, H_2O_2 60 mM, 25 μl de extracto enzimático preparado de acuerdo a V.3-d y 10 μl de clorofila (de modo que la $\text{DO}_{648\text{ nm}}$ inicial sea cercana a 1). Se midió

el descenso de absorbancia a 648 nm (disminución de la concentración de clorofilas). La actividad enzimática se expresó como la velocidad de desaparición de clorofilas por gramo de tejido: $\delta A_{659\text{ nm}}, \text{.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$.

V.3-9 Medida de la velocidad de respiración

Aproximadamente 120 g de cabezas de brócoli se ubicaron en jarras selladas de 1000 ml y se incubaron a 20°C durante 1 h. Se tomaron muestras de 1 ml del espacio cabeza mediante una jeringa a través de un septum. El contenido de CO₂ y O₂ se determinó utilizando cromatografía en fase gaseosa (Varian, CX 3400) equipado con una columna Alltech CTRI y un detector de conductividad térmica. La temperatura del inyector, columna y detector fueron 120, 30 y 120°C respectivamente. Se utilizó helio como gas portador y la velocidad de flujo fue de 20 ml.min⁻¹. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se midió dos veces cada jarra. Los resultados fueron expresados como mL de CO₂ producidos por Kg de tejido y por hora (mL.Kg⁻¹.h⁻¹).

V.3- 10 Pérdida de electrolitos

Aproximadamente 10 g de tejido fresco se incubó en 30 mL de agua bidestilada durante 1 hora a 20°C. La conductividad de la solución resultante se midió con un conductímetro, la medida se realizó al tiempo inicial y luego de 1 hora de incubación. Cada medida se realizó por triplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento. Se realizó una curva de calibración utilizando KCl de diferentes concentraciones. Los resultados se expresaron como $\mu\text{S}.\text{g}^{-1}$ de tejido.

V.3-11 Medida del poder antioxidante

El poder antioxidante de las muestras de brócoli se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Brand-Williams y col. (1995). Se trituraron inflorescencias de brócoli congelado con un molinillo y aproximadamente 0,5 g del polvo obtenido se colocó en 6 ml de etanol. La mezcla homogeneizada se centrifugó a 9000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se llevó a un volumen final de 100 ml con agua. Alícuotas del extracto etanólico (5, 10, 20, 40, 80 y 120 μL) se agregaron a tubos conteniendo 3,9 ml de 0,025 g L⁻¹ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en metanol. Se midió la absorbancia a 515 nm luego del tiempo de reacción necesario para que todos los tubos alcancen un estado estacionario de la

reacción. El porcentaje de DPPH remanente para cada alícuota de extracto etanólico se utilizó para determinar la cantidad de muestra necesaria para disminuir la absorbancia inicial de DPPH en un 50%, lo que se define como EC_{50} . El poder antioxidante fue expresado EC_{50}^{-1} . Se prepararon dos extractos para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento y cada medida se realizó por duplicado en cada extracto.

V.3- 12 Medida del contenido de compuestos fenólicos

Se trituraron inflorescencias de brócoli congelado con un molinillo y aproximadamente 1 g del polvo obtenido se colocó en 6 ml de etanol. El homogenato se centrifugó a $9.000 \times g$ durante 15 min a $4^{\circ} C$. Tres mililitros del sobrenadante se llevaron a 100 mL con agua destilada. A partir de estos extractos se realizó la medida de fenoles utilizando 100 microlitros de muestra, 1,11 mL de agua y 200 microlitros de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. Luego de 3 min a $25^{\circ} C$, se agregó 1,5 mL de solución saturada de Na_2CO_3 . Se incubó durante una hora a $25^{\circ} C$ y se midió la absorbancia a 760 nm. El contenido de fenoles totales se calculó mediante el empleo de fenol como patrón. Para cada condición se prepararon 4 extractos, los resultados se expresaron como mg de fenol por g de tejido.

V.3- 13 Medida del contenido de flavonoides

Se prepararon extractos etanólicos de acuerdo a lo descrito en 4.10. Se utilizó 1 mL de muestra adecuadamente diluida y se adicionó a 4 mL de agua destilada. A tiempo 0 se agregaron 0,3 mL de $NaNO_2$ 5%. Luego de 6 min se adicionan 2 mL de NaOH 1M. La mezcla de reacción fue diluida mediante el agregado de 2,4 mL de agua destilada. Se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 515 nm y se utilizó una solución de catequina como patrón. El contenido de flavonoides se expresó como mg de catequinas equivalentes por gramo de tejido. Para cada condición se realizaron 4 determinaciones.

V.3- 14 Análisis estadístico

La experiencia completa se realizó tres veces y las tendencias encontradas fueron similares. Los resultados que se presentan corresponden a una de las experiencias completa. Las experiencias se realizaron según un diseño factorial, con 2 tratamientos y 4 tiempos como factores. Los resultados se analizaron mediante un análisis de ANOVA y la comparación de medias se realizó mediante el test LSD con un nivel de significancia de 0.05.

V.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.4- A) Selección del tratamiento UV-C

Se aplicaron distintas dosis de radiación UV-C (0, 4, 7, 10 y 14 kJ.m⁻²) con el fin de seleccionar una que sea efectiva para retrasar el amarillamiento postcosecha de brócoli almacenado a 20° C. Para seleccionar el tratamiento adecuado se utilizó la medida del color superficial (hue y L) y del contenido de pigmentos (clorofilas y feofitinas) luego de 5 días de almacenamiento a 20° C. Inmediatamente después del tratamiento las muestras irradiadas no presentaron pérdida de peso ni síntomas visibles de deshidratación o deterioro. Durante el almacenamiento la pérdida de peso fue aproximadamente de 1,5 % por día, y no se observaron diferencias entre las muestras tratadas y los controles.

El valor de hue inicial fue cercano a 126 y disminuyó durante el almacenamiento; mientras que el valor de L*, inicialmente fue cercano a 40 y aumentó durante el almacenamiento, tanto en las muestras control como en las tratadas (Tabla V.1).

Tabla V.1- Cambios de los valores de L* y de Hue para las muestras control y tratadas con diferentes dosis de luz UV-C luego de 5 días de almacenamiento a 20°C.

Tratamiento		Días a 20° C	
		0	5
L*	Control	39.2	53.8
	4 kJ.m-2	41.8	48.1
	7 kJ.m-2	41.2	45.8
	10 kJ.m-2	40.7	44.2
	14 kJ.m-2	40.7	45.7
Hue	Control	127.1	112.5
	4 kJ.m-2	126.8	116.6
	7 kJ.m-2	127.4	120.3
	10 kJ.m-2	126.3	116.2
	14 kJ.m-2	126.8	113.7

Como ya ha sido mencionado previamente, el aumento de L está relacionado con el cambio de color de verde a amarillo, que representa un color más luminoso. Luego de 5 días a 20°C los valores L* aumentaron en todos los casos, pero todas las dosis de luz UV-C ensayadas presentaron menor aumento de luminosidad, siendo las dosis de 4, 7 y 10 kJ.m⁻² las que produjeron menor aumento de L*.

La pérdida de color verde está relacionada con la disminución del parámetro hue, las dosis de 4, 7 y 10 kJ.m⁻² presentaron los menores descensos de éste parámetro. Por lo tanto, el menor aumento de luminosidad acompañado de un menor descenso de hue sugiere que las dosis de 4, 7 y 10 kJ.m⁻² produjeron un menor amarillamiento de las inflorescencias.

Las muestras tratadas con alta dosis de luz UV-C (14 kJ.m⁻²) presentaron desarrollo de un color verde parduzco. Por esta razón se planteó utilizar, además del color superficial, el contenido de pigmentos, clorofilas y feofitinas, para seleccionar la dosis adecuada.

Se realizó la medida del contenido de clorofilas luego de 5 días de almacenamiento a 20°C (**Figura V.1**)

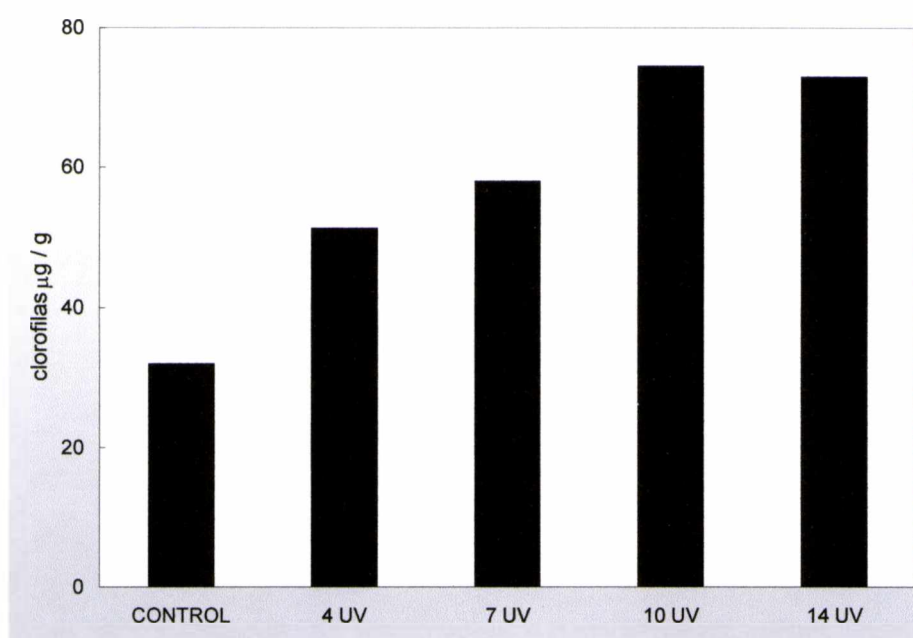


Figura V.1- Contenido de clorofilas totales de muestras de brócoli tratadas con diferentes dosis de UV-C luego de 5 días de almacenamiento a 20°C. LSD = 2.81

El análisis del contenido de clorofilas de las muestras tratadas con diferentes dosis de radiación UV-C luego de 5 días de almacenamiento demostró que las dosis de 10 y 14 kJ.m⁻²

fueron las que provocaron mayor retención de clorofilas (**Figura V.1**). Los resultados obtenidos para la dosis de 14 kJ.m^{-2} indicaron que si bien hay una menor degradación de clorofilas, los valores de hue obtenidos fueron similares a los valores de los correspondientes controles.

Se realizó la medida del contenido de feofitinas luego de 5 días de almacenamiento a 20°C (**Figura V.2**).

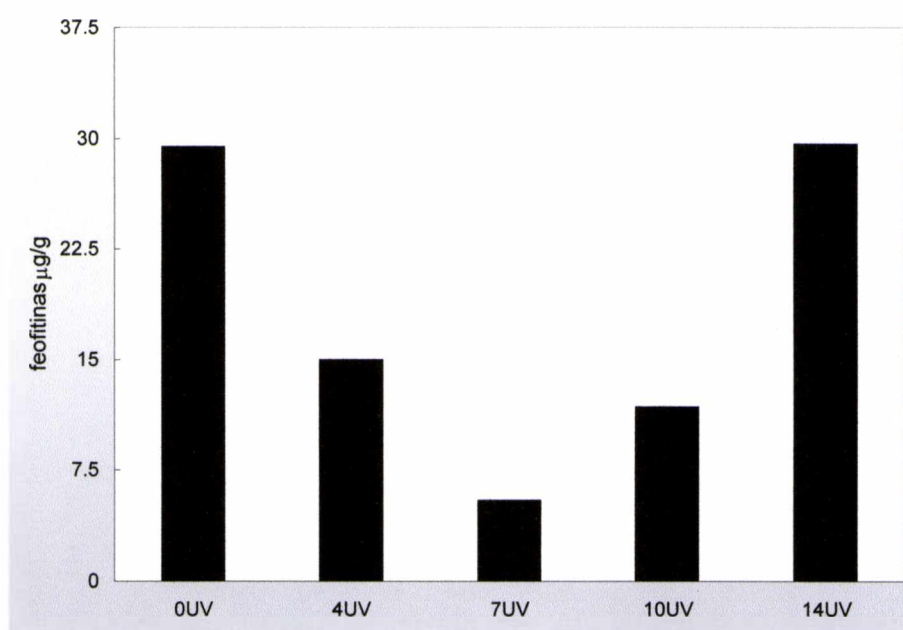


Figura V.2- Contenido de feofitinas totales de muestras de brócoli tratadas con diferentes dosis de luz UV-C luego de 5 días de almacenamiento a 20°C . LSD: 3.24

Durante la senescencia poscosecha de brócoli se produce una acumulación transitoria de feofitinas. Se encontró que las dosis de 4, 7 y 10 kJ.m^{-2} provocaron menor acumulación de feofitinas, mientras que las muestras tratadas con una dosis de 14 kJ.m^{-2} no presentó diferencias en la acumulación de feofitinas con respecto a las muestras control. Las feofitinas son pigmentos que derivan de las clorofilas y que dan un aspecto verde pardo a las muestras, el que fue muy evidente en las muestras tratadas con altas dosis de UV-C (14 kJ.m^{-2}).

Para seleccionar la dosis de luz UV-C que resulta efectiva para retrasar la senescencia poscosecha de brócoli, pero que además no modifique la apariencia del producto, se combinaron los resultados obtenidos de la observación visual de las muestras, los valores de color superficial, y el contenido de pigmentos clorofilas y feofitinas. Se seleccionó la dosis de $10 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ya que provocó la mayor retención de clorofilas, pero sin mayor acumulación de feofitinas, por lo que no se modificó la apariencia del producto.

Fotografías tomadas a cabezas centrales de brócoli variedad De Cicco sin tratamiento (A) y tratadas con la dosis de $10\text{kJ}/\text{m}^2$ (B), luego de 6 días de almacenamiento a 20°C .



A



B

V.4- B) Efecto del tratamiento seleccionado sobre la degradación de clorofilas.**1. Medida del contenido de pigmentos durante el almacenamiento a 20° C**

Se analizó el contenido de clorofilas en las muestras control y las tratadas con la dosis de 10 kJ.m^{-2} durante el almacenamiento a 20°C (Figura V. 3). El contenido de estos pigmentos disminuyó en ambos casos, pero la velocidad de degradación de las muestras irradiadas fue menor que la de los controles. Luego de 4 días de almacenamiento a 20°C las inflorescencias tratadas presentaron un nivel de clorofilas aproximadamente 53 % superior a los respectivos controles.

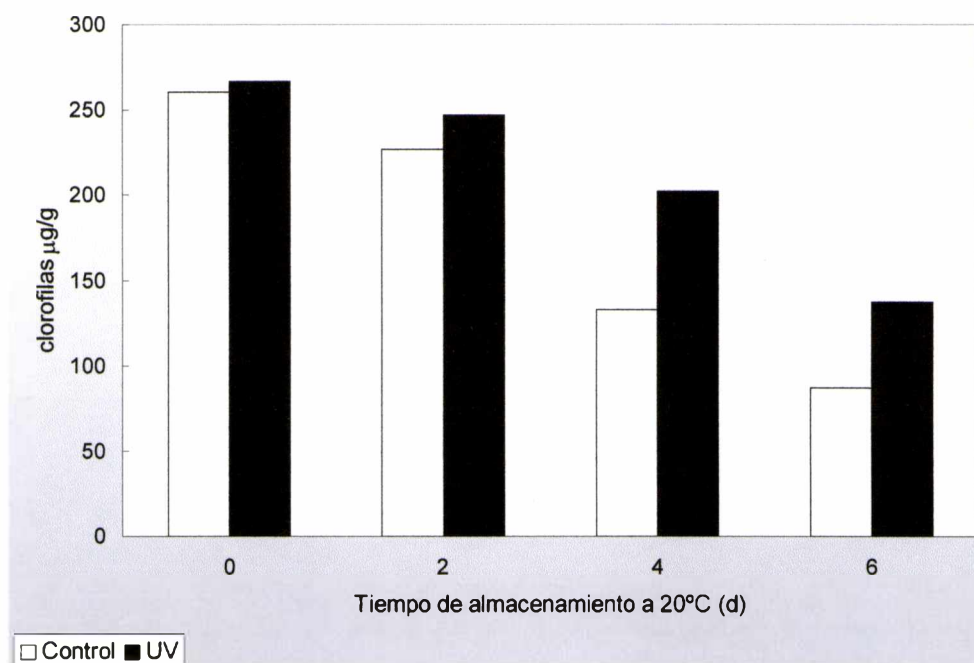


Figura V.3- Cambios en el contenido de clorofilas de muestras de brócoli control y tratadas con 10 kJ.m^{-2} durante el almacenamiento a 20°C . LSD = 3,29

Se realizó la medida del contenido de feofitinas en las muestras control y tratadas con 10 kJ.m^{-2} durante el almacenamiento a 20°C (Figura V.4). Se observó una acumulación de feofitinas durante los 4 primeros días de almacenamiento, seguido de un marcado descenso en el día 6 tanto en muestras control como tratadas con UV-C. No se encontraron diferencias en

el contenido de feofitinas entre las muestras control y las tratadas hasta el día 2, posteriormente las muestras tratadas mostraron menor acumulación transitoria de éstos pigmentos que los controles. Esta acumulación transitoria de feofitinas que acompaña la degradación de clorofilas durante la senescencia se encontró en todas las experiencias realizadas (Capítulo I, III y IV).

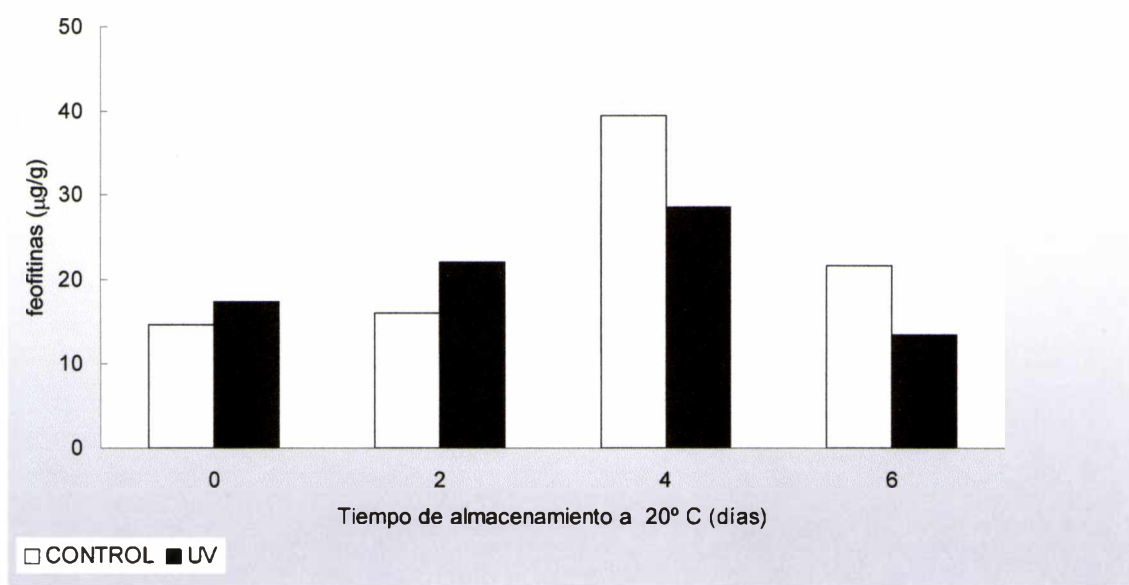


Figura V.4- Cambios en el contenido de feofitinas de muestras de brócoli control y tratadas con 10 kJ.m^{-2} durante el almacenamiento a 20°C . LSD = 3,42

Cuando se analizó la degradación de clorofilas a y b separadamente (**Figuras V.5 A y B**), se encontró que el tratamiento con luz UV-C retrasó la velocidad de degradación de ambos tipos de clorofilas. Este resultado fue diferente al obtenido cuando se utilizó tratamiento térmico de alta temperatura (capítulo IV) y en el caso de tratamiento con hormonas vegetales (capítulo III) ya que en ambos casos los tratamientos afectaban la velocidad de degradación de clorofilas a pero no tenían efecto sobre la velocidad de degradación de clorofilas b.

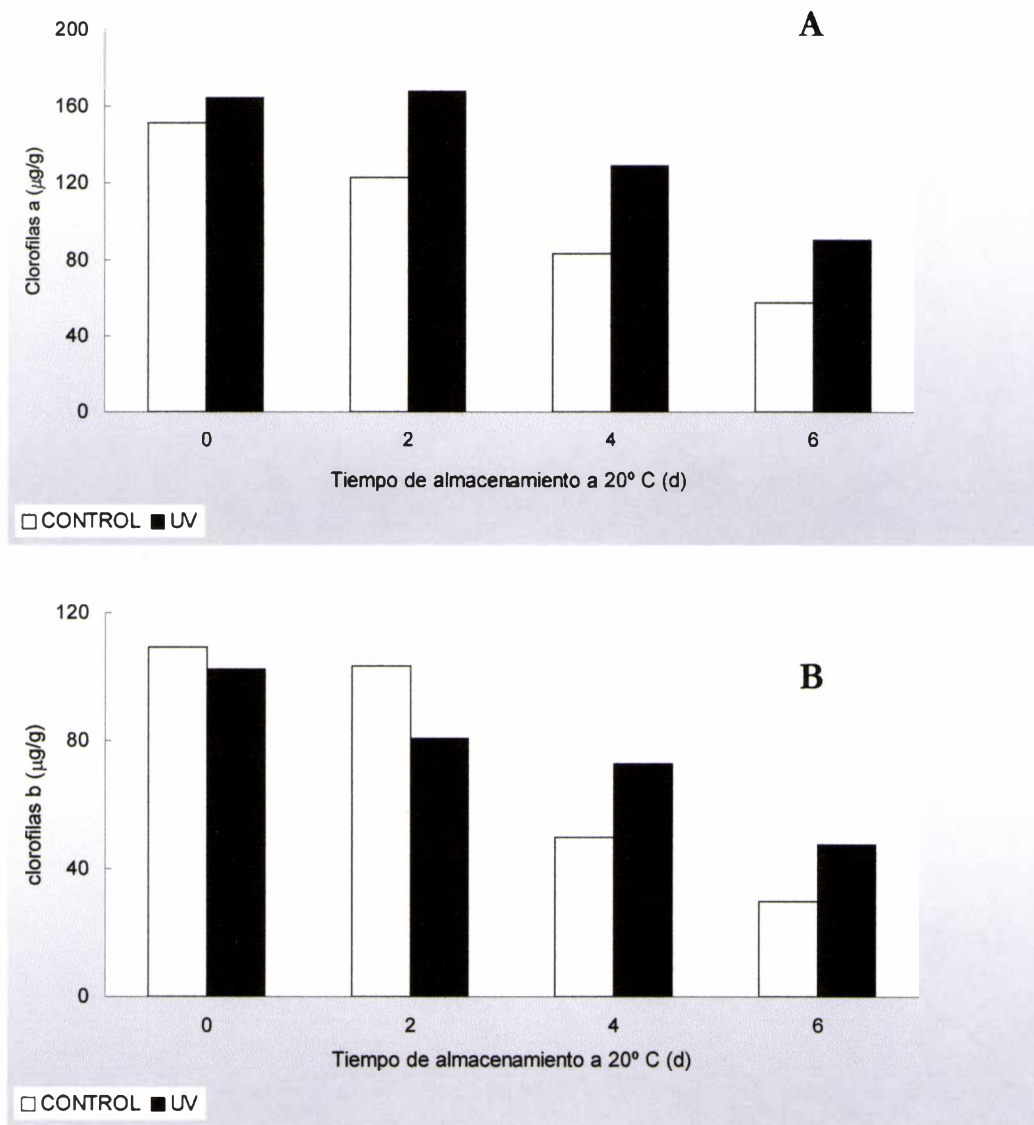


Figura V.5- Cambios en el contenido de clorofilas a (A) y b (B) de muestras de brócoli control y tratadas con 10 kJ.m^{-2} durante el almacenamiento a 20°C . LSDa = 3,29. LSDb = 3,29

2 Efecto del tratamiento UV-C sobre las enzimas que degradan clorofilas

Como vimos en el capítulo I, durante la senescencia postcosecha de brócoli se produce un aumento en la actividad de enzimas que participan en la degradación de clorofilas: clorofilasa, Mg-dequelatasa (MDS) y peroxidasa. Con el fin de estudiar si existe algún efecto de la radiación UV-C sobre estas enzimas, se realizó la medida de sus actividades durante el período de senescencia tanto en muestras controles como en las que fueron tratadas.

La actividad clorofilasa aumentó durante el almacenamiento en las muestras control y la mayor actividad se encontró luego de 6 días de almacenamiento a 20°C (**Figura V.6**). Las muestras irradiadas con luz UV-C no presentaron cambios en la actividad clorofilasa durante el almacenamiento y los niveles fueron menores a los controles durante toda la experiencia.

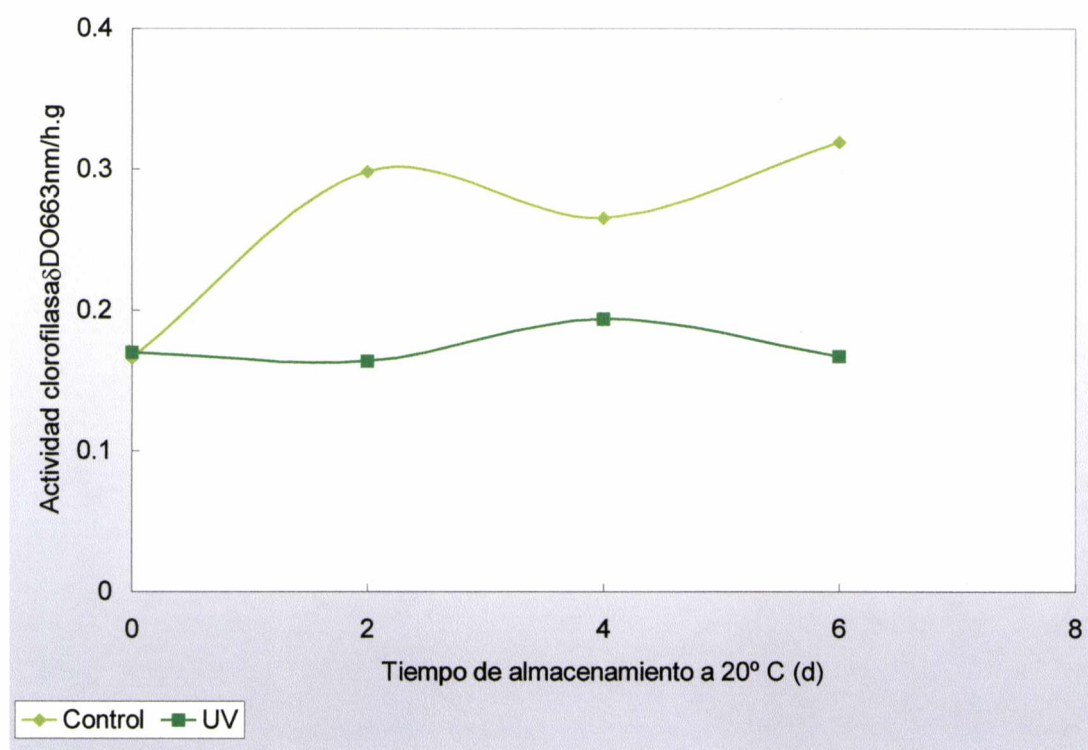


Figura V.6- Cambios de la actividad clorofilasa durante el almacenamiento a 20° C.
LSD: 0.06

La actividad MDS no presentó cambios en las muestras control durante los primeros días de almacenamiento y aumentó a partir del día 4. En las muestras tratadas con luz UV-C se observó un aumento de la actividad inmediatamente después del tratamiento y la actividad se

mantuvo hasta el día 2, pero los niveles de actividad en las muestras tratadas fue menor que los controles luego de 4 y 6 días de almacenamiento a 20°C (Figura V.7).

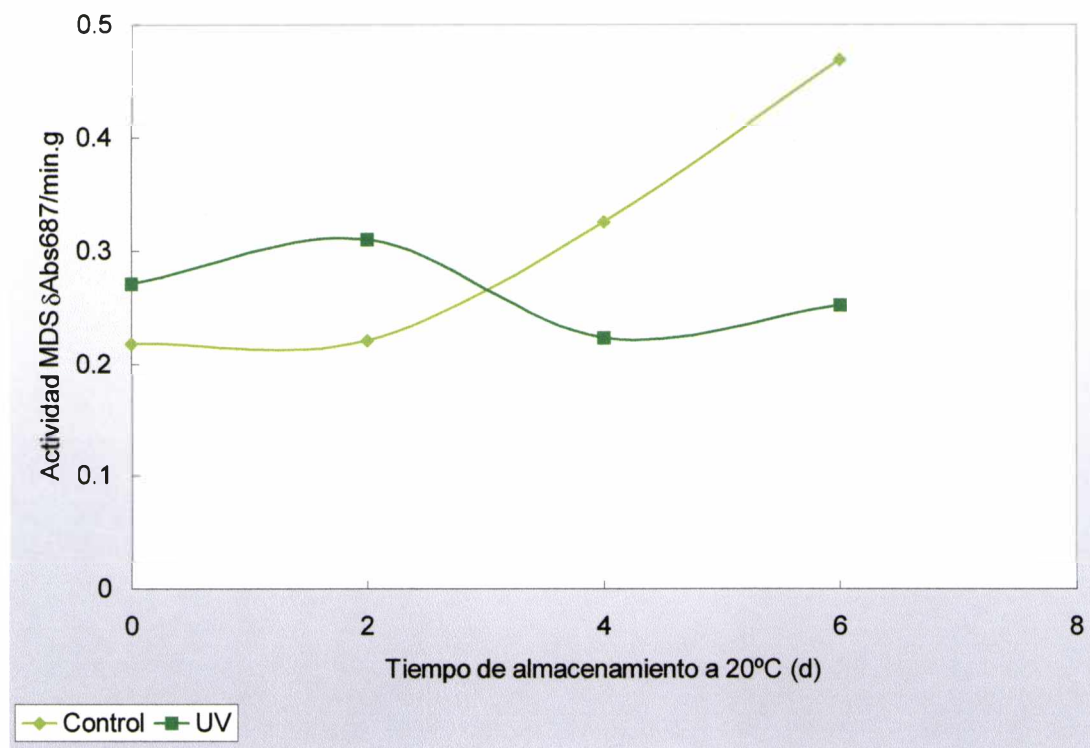


Figura V.7- Cambios de la actividad MDS durante el almacenamiento a 20° C. LSD: 0.08

La actividad de degradación de clorofilas mediada por peroxidasa aumentó durante el almacenamiento tanto en las muestras control como en las tratadas, pero no se observaron diferencias hasta el día 4. Luego de 6 días de almacenamiento a 20°C las muestras tratadas presentaron menor actividad peroxidasa (Figura V.8).

Los resultados obtenidos indicaron que como resultado del tratamiento se produjo una fuerte inhibición de la activación que sufren tanto clorofilasa como peroxidasa durante la senescencia a 20° C (Figuras V. 6 y 8). Con respecto a MDS los resultados mostraron un aumento de la actividad de la enzima hasta el día 2 como consecuencia del tratamiento, mientras que a tiempos más largos de almacenamiento el comportamiento fue similar al observado en las otras enzimas.

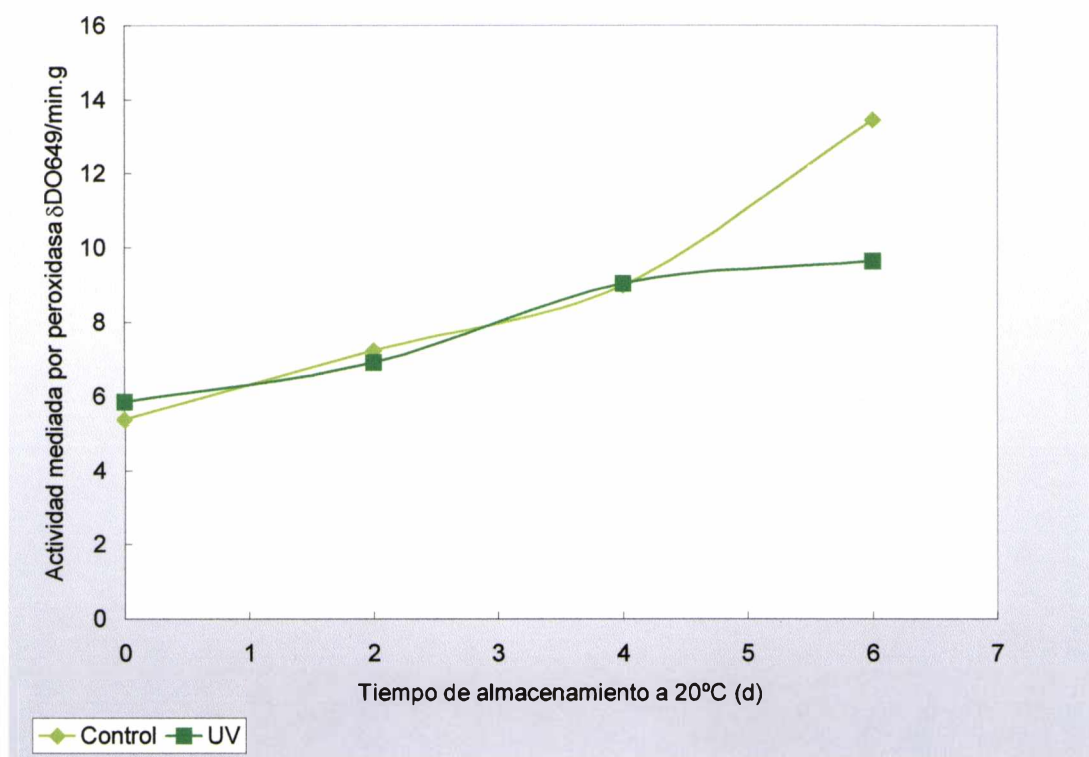


Figura V.8- Cambios en la actividad de degradación de clorofilas mediada por peroxidasa durante el almacenamiento a 20° C. LSD: 1.22

La dosis de 10 kJ/m² mantuvo altos niveles de clorofilas ya que retrasó la degradación tanto de clorofila a como de clorofila b. Como se mostró en el capítulo V, la degradación de clorofilas durante la senescencia poscosecha de brócoli puede retrasarse mediante un tratamiento térmico de alta temperatura, pero en ese caso sólo la degradación de clorofilas a fue retrasada mientras que no se encontró efecto del tratamiento sobre la velocidad de degradación de clorofilas b, esto sugiere que si bien los dos tratamientos físicos retrasaron la velocidad de degradación de clorofilas los mecanismos mediante los que actúan no serían los mismos.

La actividad de las enzimas clorofilasa y MDS fue menor en las muestras irradiadas que en los controles luego de 4 y 6 días de almacenamiento, mientras que la actividad peroxidasa fue menor en el día 6. Numerosos estudios muestran que las radiaciones con luz UV-C

podrían afectar la actividad de enzimas involucradas en la fisiología poscosecha de diversas especies. Por ejemplo, poligalacturonasa y celulasa vinculadas con procesos de ablandamiento, y proteasas vinculadas con procesos de senescencia (Barka y col., 2000). . Nuestros resultados sugieren que algo similar podría ocurrir con las enzimas que participan en el catabolismo de clorofilas. Trabajos previos han demostrado que las enzimas clorofilasa y peroxidasa son estimuladas por etileno (Maeda y col, 1998; Jacob-Wilk y col., 1999) y que esta hormona no es necesaria para la senescencia pero que claramente es un acelerador del proceso (Buchanan-Wollaston y col., 2003). En el capítulo III de esta tesis se mostró que las tres enzimas fueron estimuladas por la aplicación exógena de etileno. Se ha demostrado que los tratamientos con luz UV-C reducen la producción de etileno en muchas hortalizas (Stevens y col., 1996; Maharaj y col., 1999) y por ello se podría obtener menor actividad de las enzimas que responden a etileno. De todos modos existen otros procesos muy importantes que ocurren durante la senescencia que podrían también ser afectados por las radiaciones, además de la producción de etileno, tales como la degradación de proteínas y la sensibilidad al etileno. Posiblemente el mecanismo de acción de la radiación UV-C para retrasar la senescencia será una combinación de numerosos efectos sobre muchas vías metabólicas y no podemos reducirlo simplemente a una disminución en la producción de etileno.

En el caso particular de MDS, se encontró un aumento de la actividad inmediatamente después del tratamiento lo que sugiere un efecto directo de las radiaciones sobre la enzima. La actividad MDS aumenta notablemente en presencia de H_2O_2 mientras que se inhibe en presencia de glutatión reducido y de $HgCl_2$ (capítulo II). En base a esto se propuso que para la actividad enzimática MDS serían necesarios grupos sulfhidrilos presentes en el sitio activo y que el estado redox de estos grupos sería crucial para la actividad catalítica. Ha sido demostrado que las radiaciones UV-C estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como H_2O_2 los que podrían modificar el estado redox de ciertos grupos dentro de las proteínas y esto podría conducir a una mayor actividad MDS inmediatamente después del tratamiento.

3. Efecto del tratamiento seleccionado sobre otros parámetros de senescencia

Disminución del poder antioxidante: Durante la senescencia poscosecha de brócoli se produce una disminución del contenido de ácido ascórbico (Nishikawa y col., 2003) por lo que disminuye el poder antioxidante del tejido. Se midió el efecto del tratamiento seleccionado sobre la disminución del poder antioxidante.

Daño de los tejidos: Durante la senescencia aumenta la formación de radicales libres los que conduce a la degradación de macromoléculas y, la alteración del funcionalismo de las membranas. Se midió el efecto del tratamiento seleccionado sobre la pérdida de electrolitos y sobre la velocidad de producción de CO₂, parámetros relacionados con el daño de tejidos.

Aumento de fenoles y flavonoides: Durante la senescencia poscosecha de brócoli se produce un aumento del nivel de fenoles y flavonoides en respuesta al estrés oxidativo que acompaña al proceso de senescencia. Se midió el efecto del tratamiento seleccionado sobre el aumento de fenoles y flavonoides durante el almacenamiento a 20°C.

Capacidad antioxidante

Inmediatamente después del tratamiento con luz UV-C las muestras presentaron mayor capacidad antioxidante que los controles (**Figura V.9-**). Durante el almacenamiento se encontró una disminución del valor de EC₅₀⁻¹ en las muestras control, indicando una disminución del contenido de antioxidantes. Luego de 6 días a 20°C se encontró una disminución de 40 % en la capacidad antioxidante de las muestras control mientras que no se observaron diferencias durante el almacenamiento en las muestras irradiadas.

El aumento o mantenimiento de la capacidad antioxidante durante la postcosecha ha sido mostrado en otros sistemas por ejemplo uvas (Adrian y col., 2000 y Douillet-Breuil y col., 1999). Por otra parte, la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), una de las enzimas clave en el metabolismo de polifenoles, es estimulada por las radiaciones UV, aumentando de ésta manera el contenido de polifenoles, los cuales actúan como antioxidantes y capturan de radicales libres.

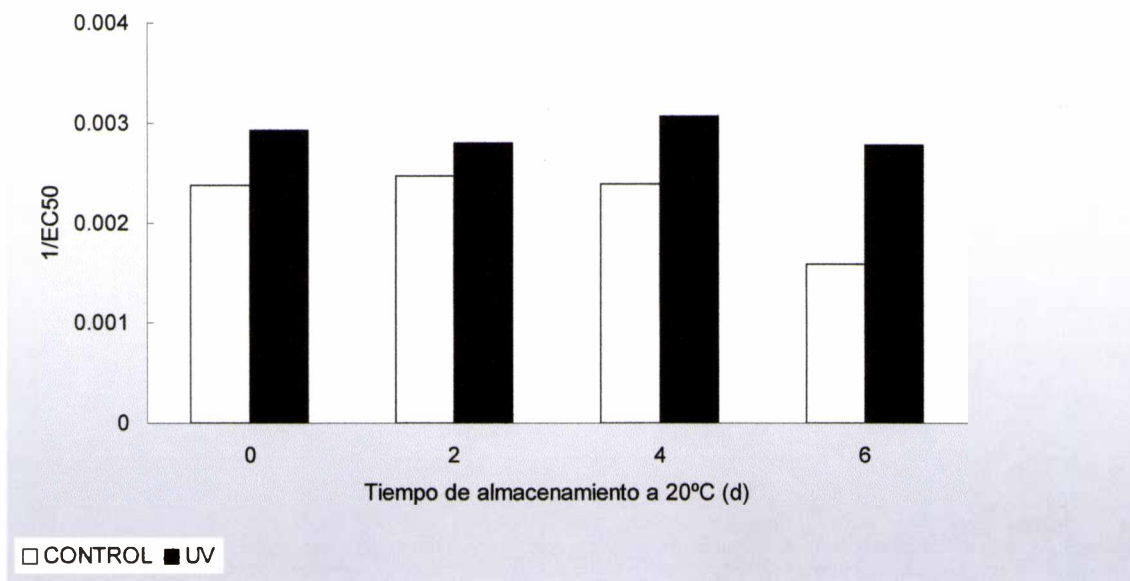


Figura V.9- Cambios del poder antioxidante (expresado como EC_{50}^{-1}) de muestras de brócoli control v tratadas con UV-C durante el almacenamiento a 20°C. LSD = 0,0008

Velocidad de producción de CO_2 y pérdida de electrolitos

Inmediatamente después del tratamiento no hay diferencias en la producción de CO_2 entre las muestras control y las tratadas con luz UV-C (**Figura V.10-**). Durante el almacenamiento a 20°C la producción de CO_2 aumentó marcadamente en los controles mientras que en las muestras irradiadas el aumento fue menor.

La pérdida de electrolitos aumentó durante el almacenamiento tanto en los controles como en las muestras tratadas (**Figura V.11-**). Luego de 2 y 6 días de almacenamiento a 20°C las muestras tratadas con UV-C presentaron menor pérdida de electrolitos que las no tratadas.

La pérdida de electrolitos es un parámetro que se utiliza como una medida del daño que sufren los tejidos. Cuanto mayor es el daño, mayor será la pérdida de electrolitos. Los resultados obtenidos indican que si bien inmediatamente después del tratamiento, las muestras tratadas presentaron una pérdida de electrolitos ligeramente superior a la de los controles, durante el almacenamiento no hay diferencias significativas en este parámetro hasta el día 6, en

el que los valores nos indican un daño importante en las muestras controles mientras que las tratadas mantendrían sus tejidos en mejores condiciones.

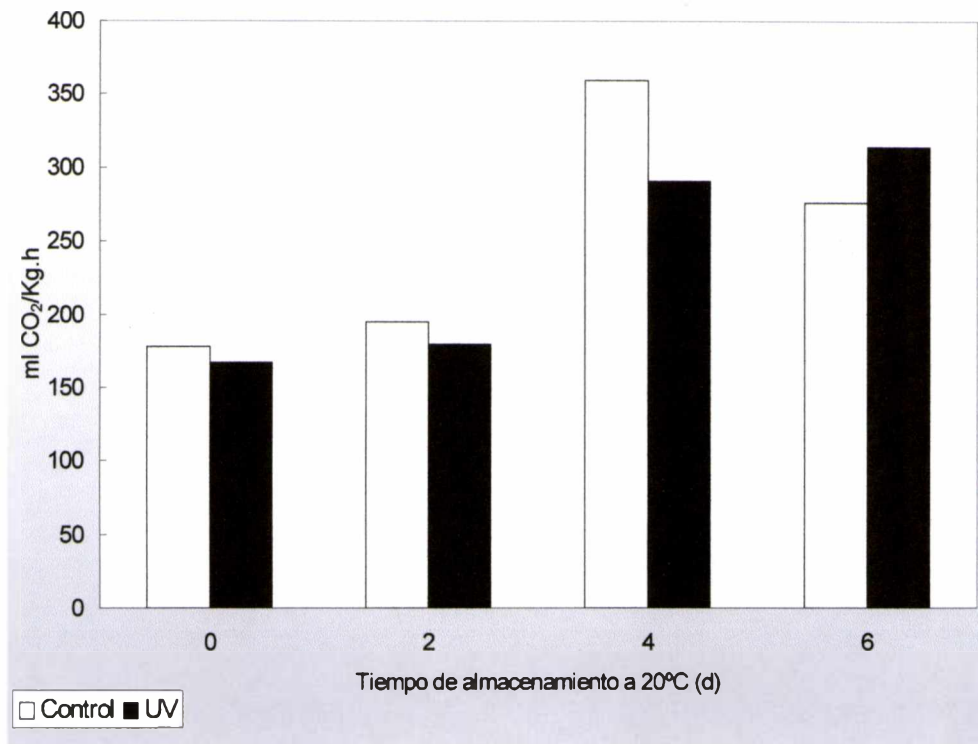


Figura V.10- Cambios en la velocidad de producción de CO₂ de muestras de brócoli control y tratadas con luz UV durante el almacenamiento a 20°C LSD = 18,69

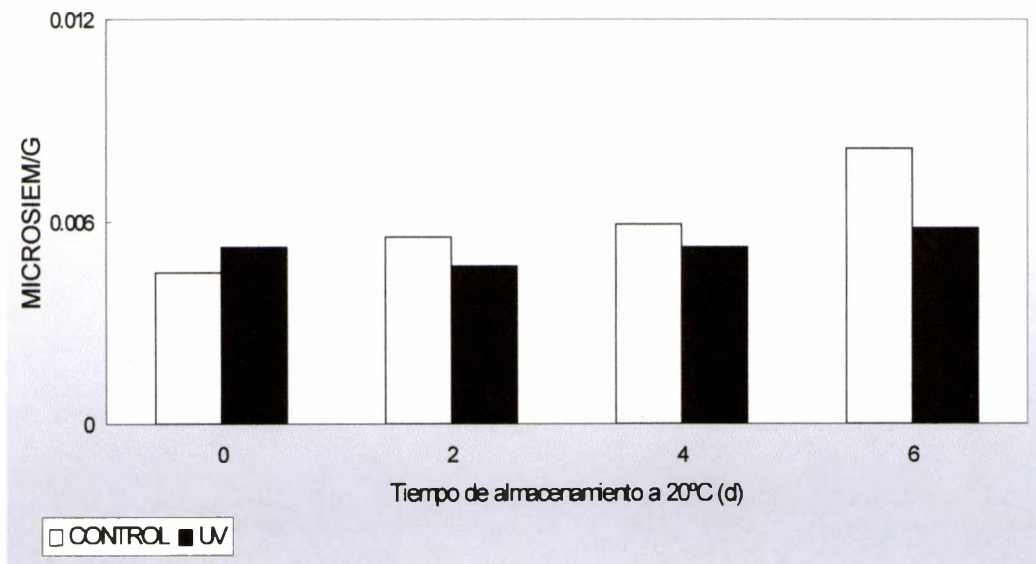


Figura V.11- Cambios en la pérdida de electrolitos durante el almacenamiento a 20° C para las muestras control y tratadas con luz UV-C. LSD: 0.0008

Los resultados que se encontraron para la velocidad de producción de CO₂ y pérdida de electrolitos sugieren que el tratamiento utilizado retrasa el daño en los tejidos que acompaña a la senescencia poscosecha de brócoli.

Efecto del tratamiento con radiación UV-C sobre el contenido de compuestos fenólicos

Se realizó la medida de contenido de compuestos fenólicos el almacenamiento a 20°C. Los resultados indicaron que se produce un aumento del contenido de fenoles y flavonoides durante este período, posiblemente en respuesta al estrés oxidativo que acompaña a la senescencia (Figuras V. 12 y 13-). Se observó que el tratamiento con radiación UV-C retrasó el aumento de estos compuestos durante el almacenamiento lo que se podría interpretar como una disminución de un síntoma de senescencia.

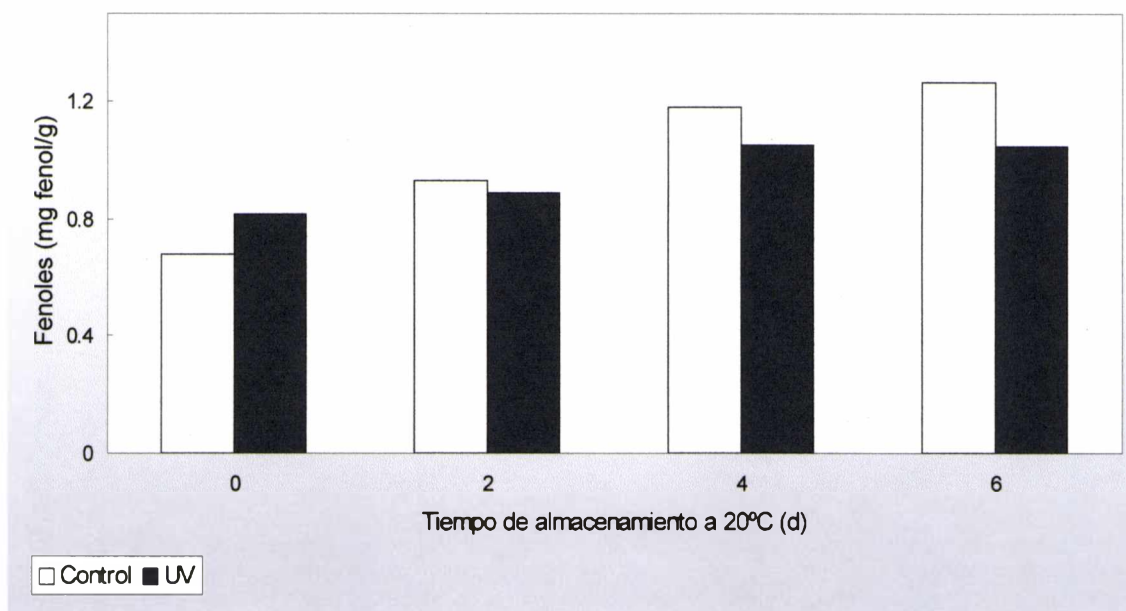


Figura V.12- Cambios en los niveles de fenoles totales de muestras control y tratadas con luz UV durante el almacenamiento a 20°C LSD = 0,12

En el caso de fenoles se encontró un aumento en el nivel de fenoles inmediatamente después del tratamiento. Se conoce que los compuestos fenilpropanoides son sintetizados en respuesta a los tratamientos UV, esto posiblemente forma parte del mecanismo de protección de las plantas frente a un exceso de radiación (Bieza y col., 2001). Trabajos previos han

demostrado que los tratamientos con luz UV inducen la enzima PAL, clave en el metabolismo de los compuestos fenilpropanoides (Stevens y col., 1990; Chalutz y col., 1992).

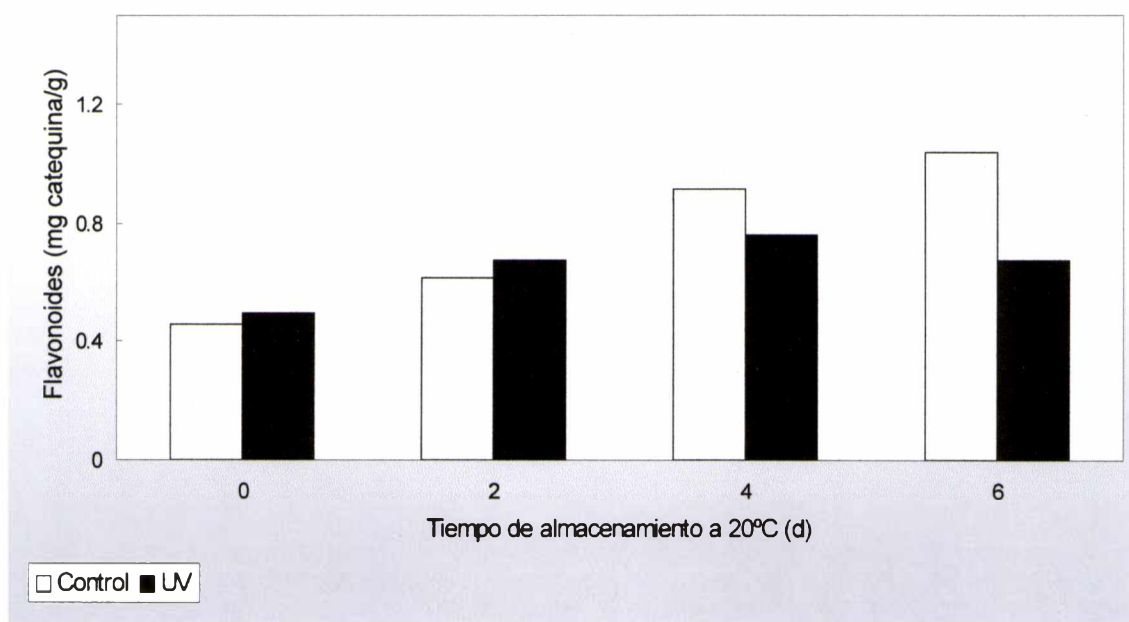


Figura V.13- Cambios en el contenido de flavonoides de muestras de brócoli controles y tratadas con luz UV-C durante el almacenamiento a 20°C. LSD = 0,15

Aunque el tratamiento con radiación UV-C produjo un retraso en el aumento de compuestos fenólicos, fenoles y flavonoides durante el almacenamiento, las muestras tratadas mantuvieron mayores niveles de poder antioxidante que los controles (**Figura V. 9**). En el caso de brócoli el antioxidante más abundante es el ácido ascórbico, por lo que posiblemente el tratamiento UV retrasaría la disminución de su contenido durante la senescencia, generando un mayor poder antioxidante en las muestras tratadas respecto a los controles.

Por otra parte si consideramos que el aumento de fenoles y flavonoides se produce en respuesta al estrés oxidativo que acompaña a la senescencia poscosecha de brócoli podemos decir que el tratamiento UV-C disminuyó la velocidad de aparición de este síntoma de senescencia.

V. 5 CONCLUSIONES

- ❖ Una dosis adecuada de radiación UV-C, permite utilizar esta tecnología como herramienta para retrasar la senescencia postcosecha de brócoli, ya que:
Retrasa la degradación de clorofilas
Retrasa el daño de los tejidos
Retrasa el aumento de fenoles y flavonoides que acompaña al daño oxidativo.
- ❖ El mecanismo de acción del tratamiento UV sobre la degradación de clorofilas afecta por igual a las clorofilas a y b.
- ❖ Una dosis adecuada de luz UV-C retrasa la degradación de clorofilas en brócoli a través de una modificación de la actividad de las enzimas clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasa durante la senescencia poscosecha.
- ❖ El mecanismo de acción sobre la enzima MDS es diferente a tiempos cortos y a tiempos largos: inmediatamente después del tratamiento y durante 2 días de almacenamiento a 20°C el tratamiento UV-C aumentó la actividad MDS, pero luego de 4 y 6 días de almacenamiento la actividad MDS de las muestras tratadas fue menor que los controles.
- ❖ Finalmente, una dosis adecuada de luz UV-C permite mantener mayores niveles de clorofilas (mejor calidad comercial de las muestras) y mayores niveles de antioxidantes (mejor calidad nutricional del producto) en brócoli durante el almacenamiento a 20°C.

Conclusiones generales



CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS

El planteo general de la tesis se basó en las siguientes ideas principales:

- 1- Para el consumo de brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras, por lo tanto como consecuencia del severo estrés que causa la cosecha se induce rápidamente la senescencia.
- 2- El síntoma más evidente de senescencia es la degradación de clorofilas, proceso que lleva a la pérdida del color verde, y es precisamente el amarillamiento de las inflorescencias lo que causa la pérdida de calidad comercial de este producto.
- 3- Las tecnologías de postcosecha que se utilicen en brócoli deberán tener como objetivo principal retrasar el amarillamiento de las inflorescencias, es decir retrasar la degradación de clorofilas.

Basándonos en esta ideas se decidió realizar una caracterización de la senescencia postcosecha de brócoli y particularmente estudiar la degradación de clorofilas. Asimismo se propuso analizar si la aplicación postcosecha de métodos físicos (TTAT y radiaciones con luz UV-C) podría utilizarse efectivamente para retrasar el amarillamiento de las inflorescencias.

El presente trabajo permitió obtener las siguientes conclusiones generales:

Caracterización de la senescencia postcosecha de brócoli

- Durante la senescencia postcosecha de brócoli se observaron modificaciones del color superficial que se correlacionaron con el amarillamiento de las inflorescencias: disminución del valor de hue y aumento del valor de L*.
- Se observó la disminución del contenido de clorofilas, tanto a como b, siendo la velocidad de degradación de clorofilas a el doble de la de clorofilas b (capítulo I). Si bien la disminución del contenido de clorofilas se correlacionó con las modificaciones del color superficial, la disminución del contenido de clorofilas se detectó antes que la disminución del color superficial (resultados de los capítulos I, III y IV).

- Se demostró que la disminución del contenido de pigmentos se correlaciona con un aumento de la actividad de las enzimas clorofilasa, MDS y Peroxidasa (Capítulo I). Estos resultados llevaron a suponer que durante la senescencia postcosecha de brócoli, para la degradación de clorofilas estarían involucradas enzimas que pertenecen a la vía de degradación propuesta por Matile y col, (1999), pero también otras enzimas oxidativas, tal como peroxidasa. Durante la senescencia postcosecha de brócoli se observó además una acumulación transitoria de feofitinas, la que podría deberse a un efecto inespecífico ya que se observó frecuentemente que el aumento de feofitinas no se correspondió con un aumento de actividad MDS.

- La correlación entre los cambios de color superficial, disminución del contenido de clorofilas, acumulación transitoria de feofitinas y aumento de la actividad de las enzimas durante la senescencia postcosecha de brócoli se mantuvo cuando se realizaron las aplicaciones exógenas de las hormonas citoquininas y etileno. La aplicación de BAP (citoquinina) retrasó el amarillamiento de las inflorescencias, la disminución del contenido de clorofilas, la acumulación transitoria de feofitinas y el aumento de la actividad de las enzimas, mientras que los tratamientos con etefón (etileno) aceleraron todos estos procesos (resultados del capítulo III). El efecto de la aplicación exógena de hormonas vegetales se observó solamente en la velocidad de degradación de clorofilas a, este resultado llevaría a pensar que la regulación hormonal no afecta a la conversión de clorofilas b en a.

- Se observó un aumento de: contenido de proteínas solubles, peroxidación de lípidos y pérdida de electrolitos durante la senescencia. Todos estos parámetros indican daño en los tejidos. Por otra parte se observó un aumento de fenoles y flavonoides, estos compuestos suelen aumentar en respuesta al daño de tejidos. Estos resultados permitirían afirmar que durante la senescencia postcosecha de brócoli los tejidos se dañaron, y que cualquiera de estos parámetros puede ser utilizado para analizar el daño en los tejidos (Capítulos I, IV y V).

- Se observó una disminución del contenido de proteínas totales y del poder antioxidante. Posiblemente el poder antioxidante disminuye en función de una disminución del contenido de ácido ascórbico ya que es el antioxidante más abundante presente en esta hortaliza (capítulo I, IV y V).

- El análisis temporal de todas estas características permitió concluir que la degradación de clorofilas y el consecuente amarillamiento de las inflorescencias es el síntoma más evidente de la senescencia postcosecha de brócoli, pero el amarillamiento es un síntoma más tardío que otros cambios metabólicos tales como la degradación de proteínas, la disminución de poder antioxidante y la oxidación de lípidos.

Caracterización de la actividad MDS de brócoli

Los resultados obtenidos permitieron establecer que:

- La actividad MDS de brócoli está relacionada con un compuesto de naturaleza proteica termoestable y de muy baja masa molecular, 2180 Da. Sin embargo según la fuerza iónica del medio, se especula que el compuesto se asocia a otras moléculas y que esta unión le impide atravesar filtros de 10000 Da y le confiere inestabilidad al calor.

- En el sitio activo de la actividad MDS participaría alguna función orgánica susceptible de ser oxidada y reducida. El estado redox de este grupo sería importante para la actividad de MDS.

Aplicación postcosecha de tratamientos físicos

- Las dos tecnologías de postcosecha analizadas resultaron efectivas para retrasar la senescencia postcosecha de brócoli. No sólo retrasaron el amarillamiento de las inflorescencias sino que permitieron retrasar la aparición de otros síntomas de senescencia:

▸ El tratamiento de 48°C durante 3 h, resultó efectivo para retrasar el amarillamiento y todos los parámetros asociados (degradación de clorofilas, acumulación transitoria de feofitinas y aumento de la actividad de clorofilasa, MDS y Peroxidasa). Asimismo, el tratamiento retrasó la aparición de otros síntomas de senescencia como la degradación de proteínas, pérdida del poder antioxidante y daño en los tejidos. Estos resultados llevarían a sugerir que el tratamiento térmico afecta a alguna regulación general de senescencia, ya que incide en varios de los síntomas estudiados.

▸ La dosis de 10 kJ/m² de radiación con luz UV-C resultó efectiva para retrasar el amarillamiento postcosecha de las inflorescencias de brócoli almacenado a 20° C y todos los parámetros asociados. Asimismo retrasó la aparición de otros síntomas de senescencia como la disminución de poder antioxidante y la aparición de síntomas de daño en los tejidos. Estos resultados llevarían a sugerir que el tratamiento con luz UV-C, también afecta a una regulación de senescencia.

▸ Los dos tratamientos postcosecha estudiados provocaron un retraso general de la senescencia, aunque se observaron diferencias en los efectos provocados por los mismos en parámetros particulares. En el caso del tratamiento térmico solamente se observó efecto directo (entendiendo como tal el detectado inmediatamente después del tratamiento) en la medida de azúcares totales. Los otros parámetros analizados no mostraron diferencias entre las muestras control y las tratadas inmediatamente después del tratamiento. En el caso del tratamiento con luz UV-C se observó un efecto directo sobre el contenido de fenoles y sobre el poder antioxidante (ambos parámetros fueron mayores en las muestras irradiadas). Asimismo se detectó un efecto directo de la radiación sobre la actividad MDS (gráf. V.7, día 0). Otra diferencia importante entre ambas tecnologías fue a nivel del retraso en la velocidad de degradación de clorofilas. En el caso del tratamiento térmico se encontró un retraso en la velocidad de degradación de clorofilas a, pero no de clorofilas b (gráf. IV.3 y 4), mientras que en el caso del tratamiento con luz UV-C el efecto fue notable en ambos tipos de clorofilas (gráf. V.5).

Bibliografía



Able, A.J., Wong, L.S., Prasad, A., O'Hare, T.J., 2002. 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *chinensis*). *Postharv. Biol. Technol.* 26, 147-155.

Adrian, M., Jeandet, P., Douillet Breuill, A.C., Tesson, L., Bessis, R., 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6103-6105.

Aharoni N., Philosoph-Hadas S. y Barkai-Golan R., 1985. Modified atmospheres to delay senescence and decay of broccoli. En Proceedings of the 4th National Controlled Atmosphere Conference, Department of Horticultural Science, Raleigh, NC. *Hort.Rep.* 126, 169-177.

Amir-Shapira, D., Goldschmidt, E., Altman, A., 1987. Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: in vivo breakdown intermediates suggest different degradative pathways for *Citrus* fruits and parsley leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 84, 1901-1905.

Asard H., Horemans N., Briggs, W.R. y Caubergs R.J., 1995. Blue light perception by endogenous redox components of the plant plasma membrane. *Photochemistry and Photobiology*, 61 (5), 518-522.

Badenoch-Jones J, Parker CW, Letham DS y Singh S., 1996. Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and wheat. *Plant Cell Environ* ;19:504-516.

Baka, M., Mercier, J., Corcuff, F., Castaigne., F., Arul, J., 1999. Photochemical treatment to improve storability of fresh strawberries. *J. Food Sci.* 64, 1068-1072.

Ballantyne, A., Stark, R., Selman, J.D., 1988. Modified atmosphere packaging of broccoli florets. *Int. J. Food Sci. Tech.* 23, 353-360

Bar E., Rise M., Vishkautsan M. y Arad S., 1995. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J. Plant Physiol.* 146 (4), 517-534.

Barka, E.A., Kalantari S., Makhlouf, J., Arul J., 2000. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 48, 667-671.

Baron C., Maradei F. y Barés C, 2001. Revista de divulgación : *Manejo pocosecha de brócoli*, Corporación del Mercado Central de Buenos Aires.

Barth MM, Kerbel EL, Broussard S and Schmidt SJ, 1993. Modified atmosphere packaging protects market quality in broccoli spears under ambient temperature storage. *J Food Sci.* 58:1070-1072.

Barth M.M., y Zhuang H.,1996. Packaging desing affects antioxidant vitamin retention and quality of broccoli florets during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 9, 141 – 150.

Benedetti C.E. y Arruda P., 2002. Altering the Expression of the Chlorophyllase Gene *ATHCOR1* in Transgenic *Arabidopsis* Caused Changes in the Chlorophyll-to-Chlorophyllide Ratio, *Plant Physiology* 128, 1255 – 1263.

Benedetti C.E., Costa C.L., Turcinelli S.R.y Arruda P., 1998. Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *coi1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116: 1037 – 1042.

Bianco V.V., 1990. Cavolo broccolo. En: V.V. Bianco, F. Pimpini (ed.). *Orticoltura*. Patron Editore, Bologna, Italia, 381-402.

Bieza K y Lois, R., 2001. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol* 126, 1105-1115.

Bleecker, A.B., Schaller, G.E., 1996. The mechanism of ethylene perception. *Plant Physiol.* 111, 653-660.

Bortlik K., Piesker C. y Matile P., 1990. Chlorophyllabbau: Charakterisierung von Kataboliten in seneszenten Gerstenblättern. *Journal Plant Physiol.* 136, 161.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Brand Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25-30.

Brandis A. Y col, 1996. Distribution of chlorophyllase among components of chloroplasts membranes in *Citrus sinensis* organs. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 49 – 54.

Bridge M.A.y Klarman W.L., 1973. Soybean phytoalexin hydroxyphaseollin induced by ultraviolet irradiation. *Phytopathology* 63, 606-609.

Brosché, M., Fant, C., Bergkvist, S.W., Strid, H., Svensk, A., Olsson, O., Strid, A., 1999. Molecular markers for UV-B stress in plants: alteration of the expression of four classes of genes in *Pisum sativum* and the formation of high molecular mass RNA adducts. *Biochim. Biophys. Acta* 1447, 185-198.

Brown S.B., Houghton J.D. y Hendry G.A .F., 1991. Chlorophyll breakdown. In *Chlorophylls*, Scheer H., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 465 – 489.

Buchanan-Wollaston V. y Ainsworth C., 1997. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol. Biol.* 33, 821 – 834.

Buchanan-Wollaston V., 1994. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 105, 839 – 846.

Buchanan-Wollaston V., 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J.Exp.Bot.* 48, 181 – 199.

Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabdour, S., Page, T., Pink, D., 2003. The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1, pp. 3-22.

Calabrese E.J., McCarthy M.E. y Kenyon E., 1987. The occurrence of chemically induced hormesis. *Health Phys.*, 52, 531-541.

Chalutz, E., Droby, S., Wisniewski, M.E., 1992. UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruits. *J. Phytochem. Photobiol.* 15, 367-374.

Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.Bmeyerowitz, E.M., 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR 1: Similarity of product to two-component regulators. *Science* 262, 539-544.

Cheemea A.S., y Harard N.F., 1978. Induction of rishitin and lubimin in potato tuber discs by non-specific elicitors and the influence of storage conditions. *Physiol. Plant Pathol.* 13, 233-240.

Chen, L.O., Hwang, J., Charng, Y., Sun, C., Yang, S., 2001. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea var. italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. *Molecular Breeding*. 7, 243-257.

Civello PM, Martínez GA, Chaves AR and Añón MC, 1997. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. *J Agric Food Chem.* 45:4589-4594.

Civello P.M., Martínez G.A., Chaves A.R., Añón M.C., 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa Duch.*): partial purification and determination of some properties. *J.Agric. Food Chem.* 43, 2596 – 2601.

Clarke, S.F., Jameson, P.E., Downs, C.G., 1994. The influence of 6-benzylaminopurine on post-harvest senescence of floral tissues of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Plant Growth Regul.* 14, 21-27.

Conconi A., Smerdon M.J., Howe G.A. y Ryan C.A., 1996. The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* 383, (6603), 826-829.

Corbineau F., Rudnicki R.M., Goszczynska D.M. y Come D., 1995. The effect of light quality on ethylene production in leaves of oat seedlings (*Avena sativa* L.) *Environ. Exp. Bot.* 35 (2), 227-233.

Coupe S.A., Sinclair B.K., Watson L.M., Heyes J.A. y Eason J.R., 2003. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 54, N° 384, 1045 – 1056.

Costa H., 2002. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science*, 162, 939-945.

Curry C., 1996. Evidence for a mono-oxygenase catalysed primary process in the catabolism of chlorophyll. *FEBS Lett.* 364, 41 – 44.

D'hallewin, G., Schirra, M., Pala, M., Ben-Yehoshua, S., 2000. Ultraviolet C irradiation at 0.5 kJ m⁻² reduces decay without causing damage or affecting postharvest quality of star ruby grapefruit (*C. paradisi* Macf.) *J. Agric. Food. Chem.* 48, 4571-4575.

Dangl J.L., Dietrich R.A. and Thomas H., Senescence and Programmed Cell Death. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Buchanan B, Gruissem B, Jones R, Eds. Rockville, Maryland. 1044-1100 (2000).

Danon, A., Gallois, P., 1998. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 437, 131-136.

Dong Y.H., Mitra D, Kootstra A., Lister C. y Lancaster J. , 1995. Postharvest stimulation of skin color on Royal Gala apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120 (1), 95-100.

Douillet-Breuil, A.C., Jeandet, P., Adrian, M., Bessis, R., 1999. Changes in phytoalexin content of various *Vitis* Spp. in response to Ultraviolet C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4456-4461.

Downs, C.G., Somerfield, S.D., Davey, M.C., 1997. Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. *Post. Biol. Technol.* 11, 93-100.

Fang, Z., Bouwkamp, J.C., Solomos, T., 1998. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 49, 503-510.

Forney CF, 1995. Hot-water dips extend the shelf life of fresh broccoli. *HortScience* 30:1054-1057.

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

Francis, F. J. 1995. Quality as influenced by color. *Food Quality and Preference*, 6: 149-155.

Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I. y Watanabe, A., 2001. Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiologia Plantarum*, 111, 345 – 352.

Funamoto Y, Yamauch N, Shigenaga T and Shigyo M, 2002. Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biol Technol.* 24:163-170

- Gan S. y Amasino R.M., 1997. Making sense of senescence. *Plant Physiol.* 113, 313 – 319.
- Gan S. y Amasino R.M., 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270, 1966 – 1967.
- Gebhardt S.E. y Matthews R.H., 1988. *Nutritive value of foods*. USDA-HNIS, Home and Garden Bull. 72, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, U.S.A., 72p.
- Gepstein S., 2004. 2004; Leaf senescence - not just a 'wear and tear' phenomenon. *Genome Biol.* 5(3): 212. Published online, Faculty of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa 32000, Israel
- Gillies SL and Toivonen PMA, 1995. Cooling method influences the postharvest quality of broccoli. *HortScience* 30:313-315.
- Ginsburg S. y Matile P., 1993. Identification of catabolites of chlorophyll porphyrin in senescent rape cotyledons. *Plant Physiol.* 102, 512 – 527.
- Ginsburg S., Schellenberg M., Matile P., 1994. Cleavage of chlorophyll-porphyrin. Requirement for reduced ferredoxin and oxygen. *Plant Physiol.*, 105, 545 – 554.
- Gnanasekharan, V., Shewfelt, R. L., Chinnan, M. S. 1992. Detection of color changes in green vegetables. *J. Food Sci.* 57 (1): 149-154.
- Gonzalez-Aguilar, G., Wang, C.Y., Buta, G.J., 2004. UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *J. Sci. Food Agric.* In press.
- Graham I.A. y Eastmond P.J., 2002. Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog. Lipid. Res.* 41, 156 – 181.
- Guiamet, J.J., Pichersky, E., Nooden, L.D., 1999. Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 40, 986-992.

Haidl H., Knodlmayr K., Rüdiger W., Scheer H., Schoch S. y Ullrich J., 1985. Degradation of bacteriochlorophyll a in *Rhodospseudomonas spaeroides* R26.Z. **Naturforsch**, 40 C, 685 – 692.

Hansen M., Buttery R.G., Stern D.J., Cantwell M.I. y Ling L.C., 1992. Broccoli storage under low-oxygen atmosphere: identification of higher boiling volatiles. **J. Agric. Food Chem.**40, 850 – 852.

He Y., Fukushige H., Hildebrande D. y Gan S., 2002. Evidence supporting a role for jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. **Plant Phys.** 128, 876 – 884.

He, J., Hung, L.K., Whitecross, M.L., 1994. Chloroplast ultrastructure changes in *Pisum sativum* associated with supplementary ultraviolet (UV-B) radiation. **Plant. Cell. Environ.** 17, 771-775.

Hensel L.L., Grbic V., Baumgarten D.A. y Bleecker A.B., 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 5, 553 – 564.

Henzi M.X., Christey, M.C., y McNeil, D.L., 2000. Morphological characterization and agronomic evaluation of transgenic broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) containing an antisense ACC oxidase gene. **Euphytica**, 113, 9-18.

Hideg E. y Vass I., 1996. UV-B-induced free radical production in plant leaves and isolated thylacoid membranes. **Plant Sci.** 115 (2), 251-260.

Hidema J, Makino A, Mae T y Ojima K., 1992. Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of PSII in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. **Plant Cell Physiology** 33, 1209–1214.

Hinder B., Schellenberg M., Rodoni S., Ginsburg S., Vogt E., Martinola E., Matile P. y Hörtensteiner S., 1996. How plants dispose of chlorophyll catabolites. Directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products into isolated vacuoles. *J. Biol. Chem.* 271, 27233 – 27236.

Hörtensteiner S., Vicentini F. y Matile P., 1995. Chlorophyll breakdown in senescent leaves: enzymatic cleavage of pheophorbide a in vitro. *New. Phytol.* 129: 237 – 246.

Hörtensteiner S. y Feller U., 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* 53, 927 – 937.

Hortensteiner, S., Wuthrich, K.L., Matile, P., Ongania, K.H., Krautler, B., 1998. The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. Cleavage of pheophorbide a macrocycle by a monooxygenase. *J Biol Chem* 273, 15335-15339.

Huff, A., 1982. Peroxidase-catalyzed oxidation of chlorophyll by hydrogen peroxide. *Phytochemistry* 21, 261-265.

Hidema J, Makino A, Mae T y Ojima K., 1992. Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of PSII in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant Cell Physiology* 33, 1209–1214.

Humbeck K, Quast S y Krupinska, K., 1997. Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell Environ*;19:337–344.

Ishida H., Anzawa D., Kokubun N., Makino A y Mae T., 2002. Direct evidence for non-enzymatic fragmentation of chloroplastic glutamine synthetase by a reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.* 25, 625 – 631.

Ito y col., 1996. Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *J. Biol. Chem.* 271, 1475 – 1479.

Jacobsson, A., Nielsen, T.,M, Sjöholm, I., Wendin, K., 2004. Influence of packaging material and storage condition on the sensory quality of broccoli. *Food Qual. Pref.* 15, 301–310.

Jacob-Wilk, D., Holland, D., Goldschmidt, E.E., Riov, J., Eyal, Y., 1999. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the *Chlase1* gene from ethylene-treated *Citrus* fruit and its regulation during development. *Plant J.* 20, 653-661.

Jagger J., 1965. Solar-UV Actions on Living Cells. *Praeger Publishers*, New York.

Janave M.T., 1997. Enzymic degradation of chlorophyll in cavendish bananas: In vitro evidence for two independent degradative pathways. *Plant Physiol. Biochem.* 35 (11), 837 - 846

Jeffery E.H., Brown A.F., Kurilich A.C., Keck A.S., Matusheski N., Klein B.P. y Juvik J.A., y col, 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 323 – 330.

John C.F., Morris K., Jordan B.R., Thomas B y Mackerness S., 2001. Ultraviolet-B exposure leads to upregulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. *J.Exp.Bot.* 52, 1367 – 1373.

Kato M., Kamo T., Wang R., Nishikawa F., Hyodo H., Ikoma Y., Sugiura M. y Yano M., 2002. Wound-induced ethylene syntesis in stem tissue of harvested broccoli and its effect on senescence and ethylene synthesis in broccoli florets. *Postharvest Biology and technology*, 24, 69-78.

King, G.A., Morris, S.C., 1994. Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119, 1000-1005.

Klein JD and Lurie S, 1991. Postharvest heat treatment and fruit quality. *Postharvest News Info.* 2:15-19.

Kon S y Schwinner S, 1977. Depolymerization of polysaccharides by active oxygen species derived from a xanthine oxidase system. *J.Food Biochem.* 1, 141-144.

Kovács, E., Keresztes, A., 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cell. *Micron* 33, 199-210.

Krarup C. y Alvarez X., 1997. Requerimientos y variedades de brócoli para la industria del congelado. *Agroeconómico* 44: 20-27.

Ku, V.V.V Wills, R.B.H., 1999. Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. *Postharv. Biol. Technol.* 17, 127-132.

Kura-Hotta M, Satoh K y Katoh S., 1987. Relationship between photosynthesis and Chl content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant Cell Physiol*;28:1321-1329.

Langmeir M., Ginsburg S. y Matile P., 1993. Chlorophyll breakdown in senescent leaves: Demonstration of magnesium-dechelataze activity. *Physiol. Plant.*, 89, 347 - 353.

Langcake R. y Pryce R.J.,1997. The production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry.* 16, 1193-1196.

Lazcano-Ferrat I., 1996. Cultivo de brócoli. *Informaciones agronómicas.* Vol.1, N° 7.

Leshem Y.Y, Halevy A.H. y Frenkel C., 1986. Processes and Control of Plant Senescence. Elsevier , Amsterdam.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzymol.* 148, 350-382.

Lois R., 1994. Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 4:498-503. (a)

Lois R., Buchanan B.B, 1994. Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an Arabidopsis mutant deficient in flavonoid accumulation. *Planta*, 4:504-509. (b)

Lowry O.H, Rosebrought N.J., Farr A.L., Randall R., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Lu J.Y., Stevens C., Yakabu P. , Loretan P.A., y Eakin D., 1987. Gamma, electron beam and ultraviolet radiation on control of storage rots and quality of Walla Walla onions. *J.Food Process Pres.* 12, 53-62.

Lu J.Y, Stevens C., Khan V.A. y Kabwe M, 1991. The effect of ultraviolet irradiation on shelf-life and ripening of peaches and apples. *Food Qual.* 14, 299-305.

Luckey T.D., 1980. Hormesis with Ionizing Radiation. *CRC Press*, Boca Raton, Florida, 222 pp.

Lurie S, 1998. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol Technol.* 14:257-269.

Maeda, Y., Kurata, H., Adachi, M., Shimokawa, K. 1998. Chlorophyll catabolism in ethylene-treated *Citrus unshiu* fruits. *JJap. Soc. Hort. Sci.* 67, 497-502.

Maharaj, R., Arul, J., Nadeau P., 1999. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. *Postharv. Biol. Technol.* 15, 13-23.

Makhlouf J, Castaigne F, Arul J, Willemot C and Gosselin A, 1989. Long-term storage of broccoli under controlled atmosphere. *HortScience* 24:322-328.

Marquenie D., Michiels C.W., Geeraerd A.H., Schenk A, Soontjens C, Van Impe J.F y Nicolai B.M., 2002. Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 187-196.

Martínez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R., Añón, M.C., 2001. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry*. 58, 379-387.

Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H., Fernández-Busquets X., Moncaleán P., Fernández B., Cunillera N., Boronat A. Y Ferrer A., 2002. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthases (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis sp.* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant J.* 30, 123 – 132.

Matile P., Hörtensteiner H., Thomas H. y Kräutler B., 1996. Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol.* 112, 1403 – 1409.

Matile P., Hörtensteiner S y Thomas H., 1999. Chlorophyll Degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50, 67 – 95.

Matile y col., 1997. Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. *Planta* 201, 96 – 99.

Matile, P., 1990. Catabolism of chlorophyll. Involvement of peroxidase. *Z. Pflanzenphysiol.* 99, 475-478.

Matile, P., Hörtensteiner, S., Thomas, H., 1999. Chlorophyll degradation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 50, 67-95.

Matile, P., Schelleberg, M., 1996. The cleavage of phaeophorbide *a* is located in the envelope of barley gerontoplasts. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 55-59.

Mercier J. y Arul J., 1993. Induction of systemic disease resistance in carrot roots by pre-inoculation with storage pathogens. *Canadian J.Pl.Pathol.* 15, 281-283.

Minguez-Mosquera M. I. y Gallardo-Guerrero L., 1996. Role of chlorophyllase in chlorophyll metabolism in olives cv. Gordal. *Phytochemistry*, 41, 691 – 697.

- Morris K.A-H., Mackerness S., Page T., Jhon C.F., Murphy A.M., Carr J.P. t Buchanan-Wollaston V., 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* 23, 677 – 685.
- Mühlecker W. Y Kräutler B., 1996. Breakdown of chlorophyll: constitution of nonfluorescing chlorophyll catabolites from senescent cotyledons of the dicot rape. *Plant. Physiol. Biochem.* 34, 61 - 75.
- Nigro, F., Ippolito, A., Lattanzio, V., Venere, D.D., Salerno, M., 2000. Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. *J. Plant Pathol.* 82, 29-37.
- Nigro, F., Ippolito, A., Lima, G., 1998. Use of UV-C light to reduce Botrytis rot of table grapes. *Postharvest Biol. Technol.* 13, 171-181.
- Nishikawa F., Kato M., Hyodo H., Ikoma Y., Sugiura M. Y Yano M., 2003. Ascorbate metabolism in harvested broccoli. *Journal of Experimental Botany* 54, 392, 2448-2458.
- Noh Y-S. y Amasino R., 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Mol.Biol.* 41, 181 – 194.
- Noodén, L.D., Singh, S., y Letham, D.S., 1990. Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant Physiol.* 93:33-39.
- Oh S.A., Park J-H, Lee G.I, Paek K.H., Park S.K. y Nam H.G., 1997. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 12, 527 – 535.
- Owens T.G. y Falkowski P.G., 1982. Enzymatic degradation of chlorophyll a by marine phytoplankton in vitro. *Phytochemistry*, 21, 979 – 984.
- Page T, Griffiths G and Buchanan-Wollaston V, 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* 125:718-727.

Parthier B., 1990. Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in a leaf senescence.

J. Plant Growth Regul. 9, 445 – 454.

Paull RE, 1990. Postharvest heat treatments and fruit ripening. *Postharvest News Info.* 1:355-363.

Perez-Amador M.A., Abler M.L., de Rocher E.J., Thompson D.M., van Hoof A., LeBrasseur N.D., Lers A y Green P.J., 2000. Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122, 169 – 180.

Pic E., de la Serve B.T., Tardieu F. y Turc O., 2002. Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiol.* 128, 236 – 246.

Picton S., Barton S.L., Bouzayen M., Hamilton A.J. y Grierson D., 1993. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene forming enzyme transgene. *Plant J.* 3, 469 – 481.

Pogson BJ and Morris SC, 1997. Consequences of cool storage of broccoli on physiological and biochemical changes and subsequent senescence at 20°C. *J Amer Soc Hort Sci.* 122:553-558.

Pogson, B.J., Downs, C.G., Davies, K.M., 1995. Differential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes in broccoli after harvest. *Plant Physiol.* 108, 651-657.

Pyung Ok Lim, Hye Ryun Woo y Hong G.N., 2003. Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, Vol 8. N° 6.

Quirino B.F., Reiter W.D. y Amasino R.M., 2001. One of two tandem Arabidopsis genes homologous to monosaccharide transporters is senescence – associated. *Plant Mol. Biol.* 46, 447 – 457.

Quirino B.F., Normanly J., y Amasino R.M., 1999. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol. Biol.* 40, 267 – 278.

Quirino B.F., Noh Y-S., Himelblau E. y Amasino R.M., 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* 5, 278 – 282.

Rolland F., Moore B y Sheen J., 2002. Sugar sensing and signalling in plants. *Plant cell Suppl.* 14, S185 – S205.

Roulin S. y Feller U., 1998. Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Planta*, 205, 297 – 304.

Sabater, B., Rodríguez, M.T., 1978. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase. *Physiol. Plant.* 43, 274-276.

Saniewsky y Miyamoto, 1998. "Interaction of ethylene with Jasmonates in the regulation of some physiological processes in Plants". In. *Biology and Biotechnology of the plant Hormone Ethylene II*, A. K. Kanellis y col. Eds, NATO-ASI Series Kluwer Law International.

Sato H., 1998. Molecular cloning and functional expression of a water-soluble chlorophyll protein, a putative carrier of chlorophyll molecules in cauliflower. *J. Biol. Chem.* 273, 30568 – 30575.

Schellenberg M. y Matile P., 1995. Association of components of the chlorophyll catabolic system with pigment-protein complexes from solubilized chloroplast membranes. *J. Plant Physiol* 146: 604 – 608.

Schoch S. y Vielwerth F.X., 1983. Chlorophyll degradation in senescent tobacco cell culture (*Nicotiana tabacum* var. "Samsun"). *Z. Pflanzenphysiol.*, 110, 309 – 317.

Shioi Y., Masuda T., Takamiya K. y Shimokawa K., 1995. Breakdown of chlorophylls by soluble proteins extracted from leaves of *Chenopodium album*. *J.Plant Physiol.* 145, 416 – 421.

Shioi Y., Tatsumi Y. y Shimokawa K., 1991. Enzymatic degradation of chlorophyll in *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol.* 32: 87 – 93.

Shioi Y., Tomita N., Tsuchita T. y Takamiya K., 1995. Conversion of chlorophyllide to pheophorbide by Mg-dechelating substance in extracts of *Chenopodium album*, *Plant Physiol. Biochem.* 34, 41 – 47.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymol.* 299, 152-153.

Smart C.M, Hosken S.E., Thomas H., Greaves J.A., Blair B.G. y Schuch W., 1995. The timing of maize leaf senescence and characterization of senescence-related cDNAs. *Physiologia Plantarum*, 93, 673 – 682.

Sodmergen S, Kawano S., Tano S. y Kuroiwa T., 1991. Degradation of chloroplast DNA in second leaves of rice (*Oryza sativa*) before leaf yellowing. *Protoplasma* 160: 89 – 98.

Stevens, C., Khan, V.A., Tang, A.Y., Lu, J.Y., 1990. The effect of ultraviolet irradiation on mold rots and nutrients of stored sweet potatoes. *J. Food Pro.* 53, 223-226.

Stevens, C., Wilson, C.L., Lu, J.Y., Khan, V.A., Chalutz, E., Droby, S., Kabue, M.K., Haung, Z., Adeyeye, O., Pusey, L.P., Wisniewski, M.E., West, M. 1996. Plant hormones induced by ultraviolet light-C for controlling postharvest diseases of tree fruits. *Crop Protection* 15, 129-134.

Stoddart J.L. y Thomas H., 1982. Leaf senescence. In: Boulter, D., Parthier D., (eds) *Nucleic Acids and Proteins in Plants I. Structure, Biochemistry and Physiology of*

Proteins. Berlin, Germany; Springer-Verlag. pp 592 – 636.

Suzuki, Y., Uji, T., Terai, H., 2004. Inhibition of senescence in broccoli florets with ethanol
J. Agric. Food Chem. 51, 3776-3782.

Taiz L.y Zeiger E., 1998. **Plant Physiology**, segunda edición. Editorial: Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Takamiya K.I, Tsuchiya T y Ohta H., 2000. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends in Plant Sci. Reviews*, 10, 426 – 431.

Tanaka R., Hirashima M., Satoh S. y Tanaka A., 2003. The *Arabidopsis-accelerated cell death* Gene ACD1 is Involved in Oxygenation of Pheophorbide a: Inhibition of the Pheophorbide a Oxygenase Activity does not lead to the “Stay-Green” Phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 44 (12): 1266 – 1274.

Tang, L., Okazawa, A., Fukusaki, E., Kobayashi, A., 2000. Removal of magnesium by Mg-dechelatase is a major step in the chlorophyll-degrading pathway in *Ginkgo biloba* in the process of autumnal tints. *Z. Naturforsch.* 55:923-926.

Taylor C.B., Bariola P.A., Delcardayre S.B., Raines R.T y Green P.J., 1993. RNS2-a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the sRNAses before speciation. *Proc. NatlAcad.Sci.* USA, 90, 5118 – 5122.

Thomas H. y Donnison I., 2000. Back from the brink: plant senescence and its reversibility. In: **Programmed Cell Death in Animals and Plant** (Bryant J.A., Hughes S.G. y Garland J.M.eds) pp. 149 – 162. Oxford: Bios.

Thomas H y Stoddart J., 1980. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 83 – 111.

Thomas H., Ougham H., Wagstaff C. Y Stead A., 2003. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 54, N° 385, pp. 1127 – 1132.

- Thompson J.E., Froese C.D., Madey E., Smith M.D. y Hong, Y., 1998. Lipid metabolism during plant senescence. *Prog. Lipid Res.* 37, 119 – 141.
- Tian MS, Downs CG, Lill RE and King GA, 1994. A role for ethylene in the yellowing of broccoli. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119, 276-281.
- Toinoven, P.M.A., Sweeney, M., 1998. Differences in chlorophyll loss at 13 °C for two broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities. *J. Agric. Food Chem.* 46, 20-24.
- Toivonen, P.M.A., 1997. The effects of storage temperature, storage duration, hydro-cooling, and micro-perforated wrap on shelf life of broccoli (*Brassica oleracea* L., Italica Group) *Postharv. Biol. Technol.* 10, 59-65.
- Tsuchiya T., Ohta H., Okawa K., Iwamatsu A., Shimada H., Matsuda T., y Takamiya K., 1999. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 15362 – 15367.
- Tsuchiya T., Ohta H., Masuda T., Mikami B., Kita N., 1997. Purification y characterization of two isoenzymes of chlorophyllase from mature leaves of *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol.* 38: 1026 – 31.
- Turner J.G., Ellis, C y Devoto A., 2002. The Jasmonato signal pathway. *Plant Cell Suppl.* 14, S153 – S164.
- Vallejo, F., García-Viguera, C., Tomás-Barberá, N., 2003. Changes in Broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. italica) Health-Promoting Compounds with Inflorescence Development vapor from alcohol powder. *Postharv. Biol. Technol.* 31, 177–182.
- Venkatrayappa T., Fletcher R.A. y Thompson J.E., 1984. Retardation and reversal of senescence in bean leaves by benzyladenine and decapitation. *Plant Cell Physiol.* 25: 407 – 18.



Vicente A., 2004. "Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura sobre calidad y fisiología postcosecha de frutillas (*Fragaria × ananassa* Duch.)". **Tesis doctoral**.

Vicentini F., Iten F. y Matile P., 1995. Development of an assay for Mg-dechelatase of oilseed rape cotyledons, using chlorophyllin as the substrate. **Physiol. Plant** 94, 57 – 63.

Wang K.L., Li H., y Ecker J.R., 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell Suppl.** 14, S131 – S151.

Wang, C.Y., 1977. Effect of aminoethoxy analog of rhizobitoxine and sodium benzoate on senescence of broccoli. **HortScience.** 12, 54-56.

Wilson C.L., El-Ghaouth A., Chalutz E., Droby S., Stevens C, Lu J.Y, Khan V. Y Arul J, 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Dis.** 78, 837-884.

Wingler A., van Schäwen A, Leegood R.C., Lea P.J. y Quick W.P., 1998. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. **Plant Physiol.** 116, 329 – 335.

Xiao W., Sheen J. y Jang J.C., 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. **Plant. Mol. Biol.** 44, 451 – 461.

Yamahuchi N., Funamoto Y. y Kanetsune Y., 1999. Involvement of chlorophyll degrading enzymes with chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.) florets. **Food Sci. Technol. Res.**, 5, 300 – 303.

Yamauchi, N., Harada, K., Watada, A., 1997. In vitro chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plen.) florets. **Post. Biol. Tech.** 12, 239-245.

Yamauchi, N., Watada, A.E., 1991. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. **J Amer. Soc. Hort. Sci.** 116, 58-62.

Zavaleta-Mancera H.A., Thomas B.J., Thomas H y Scott, I.M., 1999. Regreening of

senescent Nicotiana leaves. II. Redifferentiation of plastids. *J.Exp. Bot.* 50, 1683 – 1689.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555-559.

Zhuang H, Barth MM and Hildebrand DF, 1995. Packaging influenced total chlorophyll, soluble protein, fatty acid composition and lipoxygenase activity in broccoli florets. *J Food Sci* 59:1171-1174.

Zhuang H, Hildebrand DF and Barth MM, 1995. Senescence in broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. *J Agric Food Chem* 42:2585-2591.

Zhuang H, Hildebrand DF and Barth MM, 1997. Temperature influenced lipid peroxidation and deterioration in broccoli buds during postharvest storage. *Postharvest Biol Technol* 10:49-58.

Ziegler R., Blaheta A., Guka N. y Schonegge B., 1988. Enzymatic formation of pheophorbide and pyropheophorbide during chlorophyll degradation in a mutant of *Chlorella fusca* Shihira et Kraus. *J.Plant Physiol.*, 132, 327 – 332.

Zubko E., Adams C.J., Machaekova I., Malbeck J., Scollan C. y Meyer P., 2002. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant J.*, 29, 797 – 808.

Páginas de Internet citadas

www.abcagro.com/hortalizas/brocoli.2.asp, 2004

www.agrocadenas.gov.co/hene.htm, anónimo, 2004

www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/brocoli.htm, 2003

www.biología.edu.ar/plantas/fotosint.html, 2004

www.genbiol.cbs.umn.edu/Multimedia/examples.html , 2004

www.infoagro.com, anónimo, 2004

www.iris.cnice.mecd.es/contenidos8.htm, 2004

www.mercanet.cnp.go.cr/Calidad/Poscosecha/Investigaciones/Hort%C3%ADcoles/brocoli.html., Saborío Argüello, 2002

www.ncbi.nlm.nih.gov, anónimo, 2004

www.postharvest.uvdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Brocoli/html., Cantwell y Suslow, 2002.

www.puc.cl/sw-educ/hort0498/HTML/p160.html , anónimo, 2004

www.sica.gov.ec/agronegocios/productosparainvertir/hortalizas/brocoli/corpei.pdf, anónimo, 2004

www.vric.ucdavis.edu/veginfo/comodity/brocoli, 2003



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

“Nada ha cambiado excepto mi actitud,
por eso todo ha cambiado.”

Anthony de Mello

DONACION.....
A.....
Fecha... 07-04-05
Inv. N..... Inv..... N. 57387