

Tratamientos con luz de baja intensidad para retrasar la senescencia durante el almacenamiento de brócoli a temperatura ambiente: ¿clorofilas o fitocromos?

Favre N. ⁽¹⁾, Bárcena A. ⁽²⁾, Vera Bahima J. ⁽²⁾, Martínez G. ⁽³⁾, Costa L. ^(1,2)

(1) Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

(2) Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE)

(3) CONICET-FCAyF, UNLP, La Plata

Dirección de e-mail: favremnoelia@gmail.com

Resumen

Para el consumo de brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras mediante un corte en el tallo que las soporta. El corte induce la senescencia de los tejidos, cuyos principales síntomas son la degradación de proteínas y de clorofilas que se manifiesta como la pérdida del color verde y por lo tanto pérdida de calidad comercial del producto. En un primer ensayo se tomó como referencia la degradación de ambos parámetros y se seleccionó como tratamiento efectivo para retrasar la senescencia el uso de pulsos de 2 horas diarias con luz blanca de baja intensidad ($20-25 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante el almacenamiento en oscuridad de brócoli a temperatura ambiente. El retraso de la senescencia postcosecha ocasionado por el tratamiento con luz podría ser debido a la recuperación de fotosíntesis, es decir mediado por clorofilas o bien un mecanismo mediado por otros fotoreceptores que actuarían como intermediarios de señales que modifican numerosos procesos metabólicos. Uno de los fotoreceptores más estudiados son los fitocromos que absorben la luz roja y su mecanismo de acción se revierte por la luz roja lejana. El objetivo de este trabajo fue analizar si el efecto de la luz de baja intensidad sobre la senescencia postcosecha de brócoli es un mecanismo mediado por clorofilas o por fitocromos. Para ello se realizaron los tratamientos con pulsos de 2 h de luz de baja intensidad ($20-25 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), pero utilizando diferente calidad de luz: blanca (B), roja (R) y roja lejana (RL); además de un tratamiento control siempre en oscuridad (C). Para los tratamientos R y RL se colocaron filtros LEE adecuados entre las lámparas de luz blanca y las muestras. Se determinó el % de pérdida de peso, la disminución del color utilizando un colorímetro, el contenido de pigmentos en extractos con acetona 80%, el contenido de proteínas por electroforesis y el contenido de azúcares totales y solubles utilizando el método de Somogyi & Nelson. Los resultados indican que los tratamientos B y R retrasaron la senescencia postcosecha de brócoli ya que retuvieron el color, las clorofilas, las proteínas y los azúcares en comparación al control. Durante la senescencia postcosecha de brócoli no se observó acumulación de azúcares en ningún tratamiento. Sólo las retenciones de color, clorofilas y proteínas que se lograron con el tratamiento R fueron claramente revertidas por el RL. Estos resultados sugieren que el retraso de la senescencia no se debe a un mecanismo de fotosíntesis, sino que posiblemente los fitocromos actúan como reguladores.

Palabras clave: rojo-rojo lejano, clorofilas, proteínas, azúcares



Introducción

El consumo de brócoli ha aumentado notablemente en las últimas décadas, debido a su alto contenido de vitaminas, antioxidantes y compuestos anticancerígenos como los glucosilanatos (Yuan et al., 2010). Para comercializar el brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras, por lo que al tratarse de un vegetal en activo crecimiento la cosecha induce rápidamente el proceso de senescencia en estos tejidos, ya que además del estrés ocasionado por el corte, los tejidos quedan desprovistos de toda fuente de energía, nutrientes y hormonas (King y Morris, 1994). Durante la senescencia postcosecha de brócoli se produce el amarillamiento, acompañado por otros cambios bioquímicos que afectan la calidad nutricional y comercial del producto (Costa et al., 2006; Zhan et al., 2012; Ma et al., 2014). La vida útil de estos vegetales no supera los 3 o 4 días a temperatura ambiente y 3 semanas si se almacenan refrigerados (Toivonen y Forney, 2016). Dada esta característica es fácil comprender el problema existente para la comercialización de este producto en zonas alejadas del lugar de producción. El procedimiento generalmente utilizado para el manejo postcosecha de brócoli es el almacenamiento bajo condiciones de alta humedad relativa y refrigeración. En general no se hacen recomendaciones respecto a la luz, sólo que es conveniente el almacenamiento sin iluminación porque generalmente los sistemas de iluminación aumentan la temperatura del ambiente (Toivonen y Forney, 2016). Desde hace mucho tiempo se conoce que la senescencia es inducida por oscuridad y que en el caso de hojas puede revertirse en las etapas iniciales transfiriendo los tejidos nuevamente a la luz (Zavaleta-Mancera, 1999). En base a esto se ha comenzado a trabajar en la posibilidad de utilizar luz durante el almacenamiento postcosecha de vegetales verdes. Zhan et al. (2012) utilizaron luz continua de baja intensidad para retrasar la senescencia durante el almacenamiento de brócoli a baja temperatura y observaron que disminuyó la pérdida de color, se conservó la textura y el aroma, pero aumentó la pérdida de peso. En un trabajo previo logramos seleccionar un tratamiento con pulsos de luz de baja intensidad (2h diarias con luz blanca de 20-25 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$) que resultó efectivo para retrasar la senescencia postcosecha de brócoli ya que las muestras tratadas retuvieron clorofilas y proteínas respecto a muestras no tratadas (Favre et al., 2016). Ahora bien la luz puede actuar como un factor que regula la senescencia por dos mecanismos diferentes. Uno relacionado con la actividad fotosintética en el que las clorofilas actuarían como los fotorreceptores y sería posible recuperar la capacidad de sintetizar azúcares y con ello retrasar la senescencia. El otro mecanismo totalmente diferente, podría involucrar la participación de los fitocromos, fotorreceptores que adquieren su forma activa absorbiendo luz roja y cuyas respuestas fisiológicas pueden revertirse absorbiendo luz en el rojo lejano (Quail, 2002). Hasta el presente se han realizado muy pocos estudios sobre las bases fisiológicas de los tratamientos con luz durante el almacenamiento postcosecha. Sólo en el caso de albahaca se ha demostrado que el efecto de los pulsos de luz sobre el metabolismo de proteínas durante la senescencia postcosecha es sistémico y está mediado por fitocromos (Costa et al., 2013).

El objetivo de este trabajo fue indagar sobre las bases fisiológicas que permitirían explicar el retraso de la senescencia postcosecha de brócoli por efecto de los tratamientos con pulsos de luz de baja intensidad.



Materiales y Métodos

Diseño del experimento

Se trabajó con cabezas centrales de brócoli, *Brassica oleracea* L. var. *Italica*, cv Legacy, cultivadas a campo, por un productor local del cinturón hortícola de La Plata. Las muestras fueron cosechadas y trasladadas inmediatamente al laboratorio. Cada cabeza se colocó en una bandeja de PVC con tapa perforada. Para analizar si los fitocromos están involucrados en el efecto de retraso de la senescencia postcosecha de brócoli se realizaron tratamientos diarios de 2 h de luz de baja intensidad ($20\text{-}25 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$) utilizando diferente calidad de luz: luz blanca, luz roja y luz enriquecida en rojo lejano. Para los tratamientos con luz roja y luz enriquecida en rojo lejano se utilizaron filtros LEE ubicados entre las lámparas y las muestras como se describe en Costa et al. (2013). La intensidad de la luz se midió con un sensor cuántico de radiación fotosintéticamente activa (RADIAPAR, Cavadevices, Argentina) y se analizaron las cualidades espectrales con un espectrómetro (USB650, Red Tide, OceanOptics, USA). Se prepararon 7 bandejas para cada tratamiento y además 7 bandejas adicionales que no fueron tratadas con luz las que se utilizaron como controles. Luego de los tratamientos las muestras fueron almacenadas en oscuridad a 20°C . Se midió diariamente el color superficial y el peso fresco para calcular el porcentaje de pérdida de peso. Se tomaron muestras de las inflorescencias al comienzo y luego de 3 días de almacenamiento. Se congelaron las muestras de cinco cabezas por tratamiento a -80°C , y se conservaron a -20°C hasta el momento de los análisis. Para medir peso seco, se tomaron flores de cinco cabezas por tratamiento y se secaron en estufa a 60°C hasta peso constante.

Medida de color

Las medidas de color superficial se realizaron utilizando un colorímetro (Minolta CR300, Osaka, Japón), que permitió obtener los datos sin destrucción de muestras, midiendo los parámetros L^* , a^* y b^* . El ángulo de matiz (H°) se calculó como $H^{\circ} = \tan^{-1}(b/a)$, cuando $a > 0$ y $b > 0$, o como $h^{\circ} = 180^{\circ} - \tan^{-1}(b/a)$ cuando $a < 0$ y $b > 0$. Se realizaron diariamente cinco mediciones por cada cabeza.

Medida del contenido de clorofilas

El contenido de pigmentos se determinó espectrofotométricamente de acuerdo con Lichtenthaler (1987). Aproximadamente 5 g de inflorescencias congeladas fueron trituradas y se tomaron aproximadamente 0,250 g del triturado. Se homogeneizaron dos veces con 1,5 ml de acetona al 80% (v/v), cada homogenato se centrifugó a $6000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Los sobrenadantes de cada muestra se recuperaron y se midió la absorbancia a 663,2 y 646,8 nm. Se calculó el contenido total de clorofilas utilizando las ecuaciones de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Los resultados se expresaron como μg de pigmento por g de peso seco. Se analizaron 5 muestras por tratamiento y para cada fecha de muestreo.



Medida del contenido de proteínas solubles

La medida del contenido de proteínas solubles se realizó según Eason et al. (2014). Aproximadamente 5 g de inflorescencias de brócoli se trituraron y 0,5 g del triturado se homogenizaron con 1,5 mL de buffer de extracción (tris-hidroximetilaminometano-HCl, pH 7, con EDTA 1 mM y PMSF 1 mM). Luego se centrifugaron las muestras a 4 °C durante 10 min a 10000 ×g. Se midió el contenido de proteínas en el sobrenadante mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS PAGE), utilizando el procedimiento clásico de Laemmli (1970). Las proteínas se visualizaron mediante la tinción con Coomassie Brilliant BlueR-250. Los geles se fotografiaron con una cámara digital y se cuantificaron las bandas obtenidas utilizando el programa SIGMA GEL. Se incluyeron diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) o marcadores de peso molecular (Sigma) en cada gel como estándar para realizar la cuantificación. Se analizaron 5 muestras por tratamiento y para cada fecha de muestreo.

Medida del contenido de fenoles

El contenido total de fenoles se determinó espectrofotométricamente según Costa et al. (2006) con ligeras modificaciones. Aproximadamente 5 g de inflorescencias congeladas se trituraron y 0,5 g del triturado se homogenizaron con 1,5 mL de etanol al 96% (v / v) y se centrifugaron a 9000 ×g y 4 °C durante 20 min. El contenido de fenoles totales se midió usando el reactivo de Folin- Ciocalteu. Se midió la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresaron como µg de fenol por g de tejido en base seca. Se analizaron 5 muestras de cada tratamiento en cada fecha de muestreo.

Medida del contenido de azúcares totales y solubles

El contenido de azúcares reductores, insolubles y solubles se determinó usando el método de Somogy Nelson (Southgate et al., 1976, Hasperué et al., 2011). Aproximadamente 5 g de inflorescencias congeladas fueron trituradas y se tomaron muestras de 0,150 g las que se homogeneizaron dos veces con 1 ml de etanol al 96% (v / v). El homogenato se centrifugó a 9000 x g durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes correspondientes a cada muestra se utilizaron para el análisis de azúcares reductores solubles. El pellet obtenido después de las dos extracciones con etanol se hidrolizó con 1,5 ml de HCl al 1,1% a 100°C durante 30 min. Después de enfriar, la suspensión obtenida se centrifugó a 9000 x g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se usó para analizar azúcares insolubles (los que habían quedado en el pellet de la extracción etanólica). Para la determinación de azúcares se utilizó la reacción de Somog y Nelson y se midió la absorbancia a 520 nm. Se usó glucosa como estándar para la curva de calibración. Se calculó el contenido de azúcares totales sumando las fracciones soluble e insoluble. Los resultados se expresaron como mg de azucares por g de peso seco. Se analizaron cinco repeticiones por tratamiento para cada fecha de muestreo.



Resultados y Discusión

En un trabajo previo se seleccionó el tratamiento con pulsos diarios de 2h de luz blanca de baja intensidad ($20-25 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$) como tratamiento efectivo para retrasar la senescencia postcosecha de brócoli, ya que retrasó la pérdida de color y la degradación de proteínas y clorofilas (Favre et al., 2016). En este trabajo, la luz roja y luz blanca retrasaron el amarillamiento, la degradación de clorofilas y de proteínas (Figura 1 y 2). Dado que los efectos de la luz roja fueron revertidos con la luz enriquecida en rojo lejano, podemos inferir que los fitocromos juegan un papel regulatorio en el retraso de los síntomas mencionados.

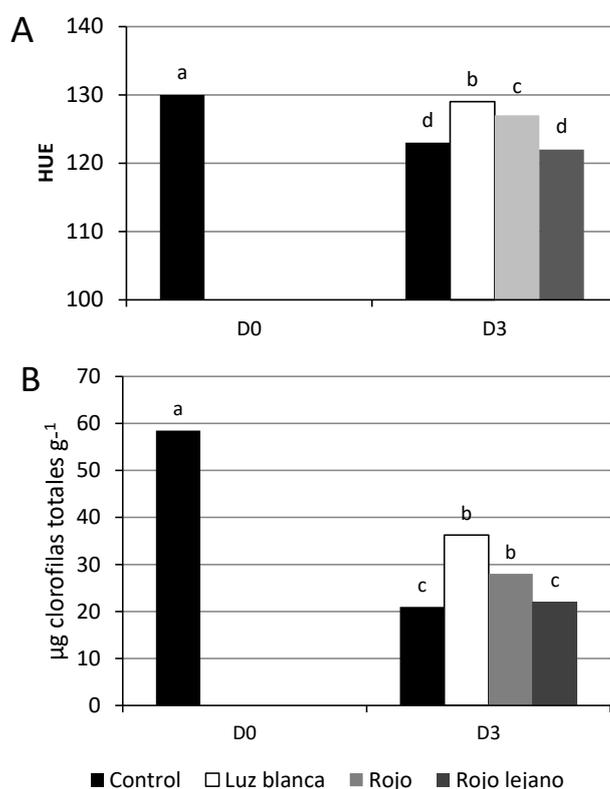


Fig 1: Pérdida de color (A), contenido de clorofilas totales (B) en inflorescencias al inicio (D0) y luego de 3 días de almacenamiento (D3).

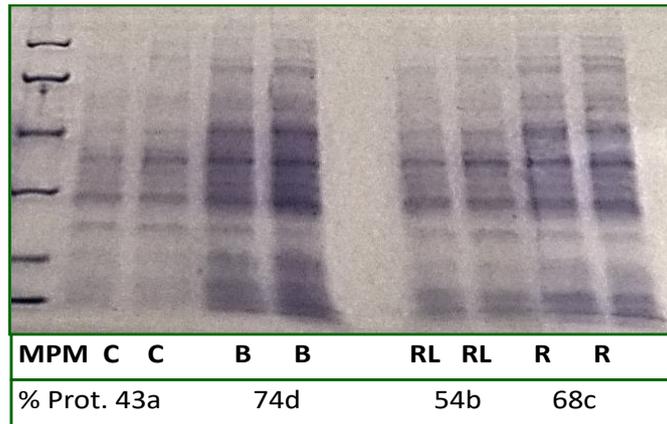


Fig. 2: Contenido de proteínas luego de 3 días de almacenamiento.

En cuanto al contenido de fenoles, se observó que el tratamiento con luz blanca incrementó el contenido de fenoles, mientras los tratamientos con luz roja y con luz enriquecida con rojo lejano presentaron el mismo contenido que los controles (Figura 3). Estos resultados sugieren que los fitocromos no estarían involucrados en el efecto del tratamiento con luz blanca sobre el contenido de fenoles.

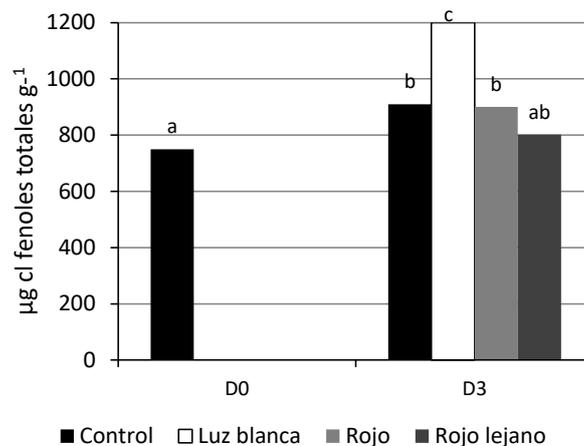


Fig.3: Contenido de fenoles al inicio (D0) y luego de 3 días de almacenamiento (D3).

Para indagar sobre la posibilidad de que el efecto de la luz sobre la senescencia postcosecha de brócoli se deba a una recuperación de la capacidad fotosintética se cuantificó el contenido de azúcares en las muestras (Tabla 1). El contenido de azúcares totales no se incrementó en ninguno de los tratamientos respecto al D0, lo que nos sugiere que no existiría a lo largo del almacenamiento la asimilación neta de dióxido de carbono (fotosíntesis neta). Este resultado concuerda con el hecho de que la baja intensidad de luz utilizada en los tratamientos corresponde a un valor que está por debajo del valor estándar del punto de compensación lumínica de los vegetales verdes (Costa et al., 2013). En cuanto al contenido de azúcares solubles reductores se observó



que independientemente de la calidad de luz todos los tratamientos retienen mayor contenido respecto al control luego de 3 días de almacenamiento (Tabla 1). Posiblemente el mayor contenido de azúcares respecto al control permita explicar en parte el retraso de la senescencia postcosecha ya que el rol de los azúcares solubles como reguladores de la senescencia ya ha sido descrito en brócoli (Hasperué et al., 2011).

Tabla 1: Contenido de azúcares solubles, insolubles y totales del D0 y D3.

	Azúcares solubles (mg g⁻¹)	Azúcares insoluble (mg g⁻¹)	Azúcares totales (mg g⁻¹)
D0	16.50 ± 1.70 a	4.37 ± 1.32 a	20.87 ± 3.02 a
D3 Control	6.00 ± 1.4 c	1.90 ± 0.50 b	7.90 ± 6.10 c
D3 LB	13.61 ± 0.87 b	2.40 ± 0.70 b	16.01 ± 1.57 b
D3 R	12.70 ± 1.3 b	1.70 ± 0.43 b,c	14.40 ± 1.73 b
D3 RL	12.90 ± 2.00 b	1.48 ± 0.16 c	16.38 ± 2.16 b

Conclusiones

Los tratamientos con pulsos de luz de baja intensidad serían una alternativa promisoriosa para retrasar la senescencia postcosecha de brócoli almacenado a temperatura ambiente. El efecto sobre el amarillamiento y la degradación de clorofilas y proteínas fue similar en los tratamientos con luz blanca y con luz roja lo que sugiere la participación de los fitocromos como mediadores en el retraso de estos síntomas. Por el contrario, estos fotoreceptores no participarían en la acumulación de fenoles ya que el efecto del tratamiento con luz roja no logra la acumulación de fenoles que se obtiene en los tratamientos con luz blanca. Dado que no existe acumulación de azúcares en ninguno de los tratamientos resulta poco probable que el mecanismo de retraso de la senescencia se deba a una reversión de la fotosíntesis. Todos estos resultados nos llevan a pensar que el efecto de la luz sobre la senescencia tiene que ver con el efecto de fotoreceptores actuando como señales que conducen al retraso del desmantelamiento de los cloroplastos, síntoma específico de la senescencia. Finalmente, debemos mencionar que participarían otros fotoreceptores además de los fitocromos ya que los resultados obtenidos con el tratamiento con luz roja no logran igualar los efectos del tratamiento con luz blanca.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a los técnicos de apoyo de CONICET del INFIVE, Mauro Bartolozzi y Santiago Martínez, por ayudarnos con las instalaciones para realizar los experimentos. Esta investigación se realizó con fondos del CONICET (PIP0306)



Referencias

- COSTA M.L., VICENTE A.R., CIVELLO P.M., CHAVES A.R. MARTÍNEZ G.A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 204–210.
- COSTA L., MONTANO Y., CARRIÓN C, ROLNY N, GUIAMET J.J. (2013). Application of low intensity light pulses to delay postharvest senescence of *Ocimum basilicum* leaves. *Postharvest Biol. Technol.*, 86, 181-191.
- FAVRE N., VERA BAHIMA J., MARTÍNEZ G.A., GUIAMET J.J. y COSTA L. (2016, Octubre). La luz blanca de baja intensidad durante el almacenamiento de brócoli a temperatura ambiente retrasa el amarillamiento. Poster presentado en 39° Congreso Argentino de Horticultura, Santa Fe, Argentina.
- GERGOFF GROZEFF G., CHAVES A., BARTOLI C. (2013). Low irradiance pulses improve postharvest quality of spinach leaves (*Spinaciaoleraceae* L. cv Bison). *Postharvest Biology and Technology* 77, 35–42.
- HASPERUÉ J.H., CHAVES A.R., MARTÍNEZ G.A. (2011). End of day harvest delays postharvest senescence of broccoli florets. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 64–70.
- HASPERUÉ J.H, GUARDIANELLI L, RODONI L.M., CHAVES A.R., MARTÍNEZ G.A. (2016). Continuous white-blue LED light exposition delays postharvest senescence of broccoli. *LWT.Food Science and Technology*, 65, 495-502.
- KING G.A, MORRIS S.C. (1994). Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119(5): 1000-1005.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- MA G., ZHANG L., SETIAWAN C.K., YAMAWAKI,K., ASA, T., NISHIKAWA F., MAEZAWA S., SATO, H., KANEMITSU N., KATO, M.(2014). Effect of red and blue LED light irradiation on ascorbate content and expression of genes related to ascorbate metabolism in postharvest broccoli. *Postharvest Biology and Technology*. 94, 97–103.
- QUAIL P.H.(2002). Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 180–188.
- SOUTHGATE D.A.T., (1976). Determination of Food Carbohydrates. London: *Appl. Science Publ. Ltd.* 128-129.
- TOIVONEN P.M., FORNEY CH. (2016). “Broccoli” in The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. Agriculture Handbook Number 66. Edited by Kenneth C. Gross, Chien Yi Wang, and Mikal Saltveit. Agricultural Research Service. Revised February 2016. <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/oc/np/CommercialStorage/CommercialStorage.pdf>. Accessed 31/10/17.
- YUAN G., SUN B., YUAN J., WANG Q. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality antioxidant enzymes and health-promoting compound in broccoli florets. *Food Chemistry*. 118, 774-781.



ZVALETA-MANCERA H.A., FRANKLIN K.A., OUGHAM H.J., THOMAS H., SCOTT I.M. 1999. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves: II. Redifferentiation of plastids. *J. Exp.Bot.* 50: 1677–1682.

ZHAN, L.J., HU, J.Q., LI, Y., PANG, L.G. (2012). Combination of light exposure and low temperature in preserving quality and extending shelf-life of fresh-cut broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 72, 76–81.