



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Trabajo de Tesis Doctoral

**Rol del metabolismo de hidratos de
carbono en la senescencia postcosecha de
brócoli**

Héctor Joaquín Hasperué

Director: Dr. Gustavo A. Martínez

Co-Director: Dra. Alicia R. Chaves

Año 2012

Agradecimientos

A mis padres que siempre estuvieron y están presentes y me apoyaron en todo, eternos incondicionales

A mi abuela Eva “Hebe...” quien también me apoyó en mis estudios y que seguirá siempre en mi memoria

A todos mis hermanos por los cuales me siento orgulloso por ser quienes son, solidarios y de una gran honestidad intelectual, fieles herederos de nuestra más importante doctrina familiar

A mis directores, con quienes comparto una relación que excede el marco académico, por lo cual resulta un placer volver a elegirlos

A mis compañeros y amigos del grupo Vegetales, excelente equipo con grandes bondades académicas y fundamentalmente humanas

A mis compañeros y amigos del CIDCA, quienes fortalecen mi gran sentido de pertenencia por el Instituto, responsables de que trabajar allí sea verdaderamente un placer

Al Estado, el cual financió los presentes estudios y al cual espero retribuir con más trabajo

A todas las personas que con su bonhomía y positivismo me ayudaron y me ayudan a creer en que vale la pena cultivar el sentido de solidaridad y compromiso hacia los demás

A todos ellos mi más sincero reconocimiento.

Resumen

La cosecha y comercialización del brócoli se realiza en momentos en que la inflorescencia se encuentra en pleno desarrollo. La separación de la inflorescencia de la planta madre detiene el suministro de agua, hidratos de carbono provenientes de la fotosíntesis, otros nutrientes y hormonas, principalmente citocininas, las cuales regulan el proceso de senescencia en la planta, retardándolo. Estos factores, sumados a una alta tasa respiratoria conducen a una senescencia acelerada y rápido deterioro postcosecha del producto. Entre los principales síntomas de la senescencia en brócoli se destaca la ocurrencia de un amarilleamiento de la inflorescencia, consecuencia del inicio del catabolismo de las clorofilas. Se produce degradación de proteínas, disminución del nivel de azúcares solubles y de reserva como el almidón, lo que conlleva al inicio de nuevas vías de obtención de energía como la proveniente de los ácidos grasos de membrana, por lo que las células van perdiendo la permeabilidad selectiva de sus membranas. Asimismo, aumenta el número de especies reactivas de oxígeno y disminuye el poder antioxidante.

Dada la importancia de los hidratos de carbono en el inicio de la senescencia y la variación existente en el contenido de los mismos en la planta a lo largo del día, dependiente de los ciclos de luz/oscuridad, en el presente trabajo de tesis doctoral se estudió el efecto de la cosecha a diferentes horas del día (8, 13 y 18 h) sobre la senescencia postcosecha. Se encontraron diferencias en el cambio de color, contenido de clorofilas y de azúcares solubles, así como también en la expresión de genes relacionados al catabolismo de clorofilas. Las muestras cosechadas a la tarde mantuvieron mayores contenidos de clorofila, lo que se reflejó en el mantenimiento del color verde por más tiempo, lo que correlacionó con una menor expresión de genes relacionados a la degradación de clorofila como *BoCLH2*, *BoPPH* y *BoPaO*. Las muestras cosechadas tardíamente fueron las que mostraron mayores niveles de almidón y una disminución menos marcada en el nivel de azúcares solubles. La actividad de enzimas relacionadas tanto al catabolismo de sacarosa como de almidón fue superior en las muestras cosechadas a las 18 h sólo en el día inicial, y se

mantuvieron sin diferencias entre las muestras cosechadas a diferentes tiempos durante el almacenamiento.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, y para determinar el efecto de los azúcares sobre la senescencia, se realizaron ensayos con un suministro externo de glucosa y sacarosa en brócolis cosechados por la mañana. Se halló que las muestras tratadas mantuvieron un nivel de azúcares más alto hacia el final del período postcosecha, manteniendo el color verde por más tiempo, a la vez que retuvieron mayores niveles de clorofilas, contenido de fenoles y antioxidantes.

Se estudiaron también diferentes métodos aplicados en postcosecha para retardar la senescencia, como ser las atmósferas modificadas (AM), tratamientos térmicos (TT) y con 1-metilciclopropano (1-MCP), de modo de evaluar su efecto sobre la actividad de enzimas involucradas en la degradación de almidón y sacarosa.

Se encontró un retraso en el amarilleamiento de las muestras almacenadas en AM, las tratadas térmicamente y aquellas a las que se les aplicó 1-MCP, respecto de las utilizadas como controles. Estas últimas mostraron un descenso más acelerado en el contenido de azúcares, con mayor actividad invertasa y sacarosa sintasa durante el período almacenamiento, y con una menor actividad β -amilasa hacia el final de dicho período.

Índice

Resumen	3
Introducción General	8
Clasificación taxonómica y descripción botánica	9
Historia del cultivo.....	10
Importancia económica.....	12
Valor nutricional	13
Glucosinolatos	14
Fases del cultivo y requerimiento	15
Senescencia	16
Métodos de conservación y tratamientos postcosecha	20
Factores pre-cosecha involucrados en la calidad postcosecha.....	23
Objetivos	24
Materiales y Metodología	26
Cosechas a diferentes horas del día	27
Tratamientos con azúcares en postcosecha	27
Tratamientos con 1-MCP.....	27
Tratamientos térmicos	28
Tratamientos con atmósferas modificadas.....	28
Medición del color superficial	29
Determinación del contenido de clorofila.....	29
Determinación del contenido de azúcares reductores y totales	30
Determinación de sacarosa, glucosa y fructosa por HPLC	31
Determinación del contenido de almidón.....	31
Determinación de la capacidad antioxidante total	32
Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales	32
Determinación de actividad Invertasa (beta-fructofuranosidasa) (EC 3.2.1.26)	33
Determinación de actividad β -amilasa (EC 3.2.1.2)	34

Determinación de actividad Sacarosa Sintasa (EC: 2.4.1.13)	35
Extracción de ARN total.....	35
Análisis de ARN total	36
Purificación del ARN	37
Transcripción reversa	38
Reacciones de q-PCR en tiempo real.....	39
Diseño experimental y análisis estadístico.....	40
Capítulo I: Efecto del momento de cosecha sobre la senescencia postcosecha de brócoli.....	41
i. Introducción.....	42
ii. Objetivo.....	44
iii. Resultados y discusión	45
<i>Color superficial</i>	45
<i>Contenido de azúcares simples y almidón</i>	47
<i>Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales</i>	52
Capítulo II: Efecto del momento de cosecha sobre el catabolismo de clorofilas en brócoli.....	55
i. Introducción.....	56
ii. Objetivo.....	62
iii. Resultados y discusión	63
<i>Contenido de clorofila a y b</i>	63
<i>Expresión de los genes BoCLH1, BoCLH2, BoPaO y BoPPH</i>	65
Capítulo III: Efecto del tratamiento con azúcares sobre la senescencia postcosecha de brócoli.....	71
i. Introducción.....	72
ii. Objetivo.....	76
iii. Resultados y Discusión.....	77
<i>Color superficial</i>	77
<i>Contenido de clorofila a y b</i>	78
<i>Contenido de azúcares solubles</i>	80

<i>Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales</i>	81
Capítulo IV: Análisis de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de almidón y sacarosa	84
i. Introducción.....	84
ii. Objetivos	92
iii. Resultados y discusión	93
Contenido de azúcares y actividades invertasa, sacarosa sintasa y β -amilasa en brócolis cosechados a distintas horas del día	93
Efecto de distintos tratamientos postcosecha sobre el contenido de azúcares y actividades invertasa, sacarosa sintasa y β -amilasa durante el almacenamiento postcosecha.	98
Conclusiones generales	106
Bibliografía	109

Introducción General

Generalidades Brócoli

Clasificación taxonómica y descripción botánica

El brócoli es una hierba perenne de aproximadamente 60 cm en estado máximo de desarrollo, perteneciente a la familia de las *Brassicaceae*, anteriormente denominada *Cruciferae* (Crucíferas) debido a la forma de las flores, con 4 pétalos diagonalmente opuestos en forma de una cruz.

Clasificación

Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Dicotiledónea
Orden:	Brasicales
Familia:	Brasicáceas
Género:	<i>Brassica</i>
Especie:	<i>oleracea</i>
Variedad:	<i>Italica</i>
Nombre trinomial:	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>

El brócoli comparte la misma familia que *Arabidopsis thaliana*, la especie modelo para el estudio de la fisiología vegetal, con una similitud en las secuencias de nucleótidos de 87 % en ambas especies. Las hojas del brócoli son grandes, glabras y presentan nervaduras centrales muy notorias.

La superficie foliar está recubierta de ceras epicuticulares que dificultan el mojado, causando el escurrimiento del agua, y otorgan el color verde azulado opaco común en

la especie. La raíz es pivotante con raíces secundarias y superficiales. El órgano de interés, es la inflorescencia inmadura (pella), de color verde debido a los sépalos que encierran la flor inmadura, que se sienta sobre un pedicelo y éste se inserta sobre el pedúnculo.

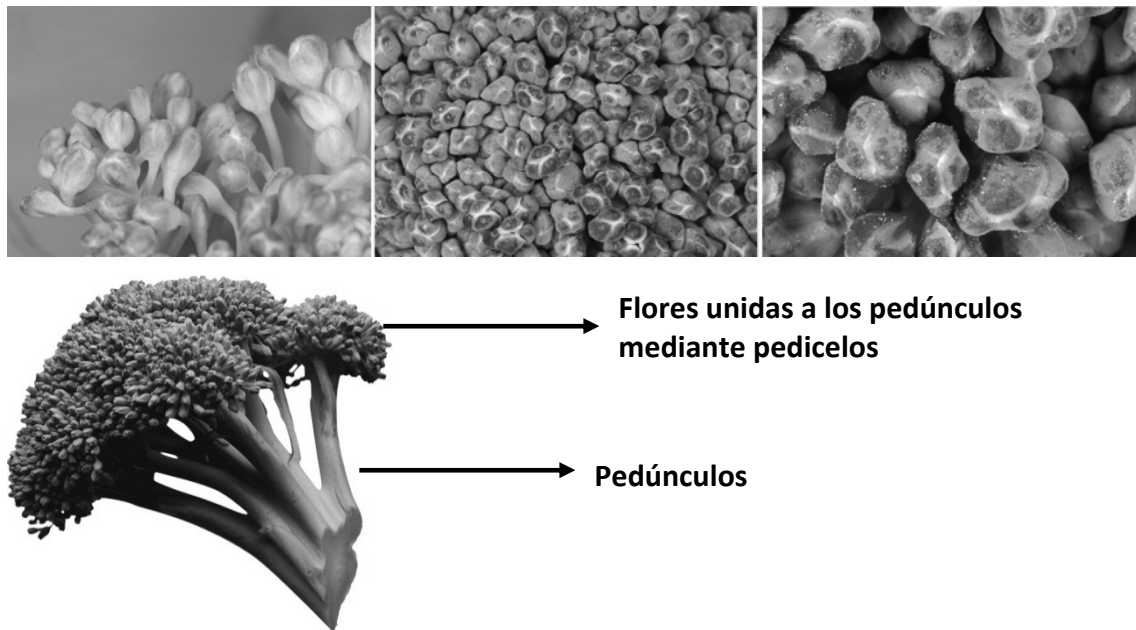


Figura 1. Esquema de una inflorescencia donde se observa la ubicación de las flores, sus sépalos, pedicelos y pedúnculos.

Debido al fenómeno de autoincompatibilidad, la variedad presenta polinización cruzada entomófila (principalmente abejas y moscas). Con las otras variedades botánicas de la especie se cruza libremente, y algunos autores sostienen que por su estructura floral más simple, el brócoli sería el progenitor de la coliflor. El fruto es una silicua cilíndrica, dehiscente y glabra.

Historia del cultivo

El origen del brócoli o brécol se asienta en los países con climas templados a orilla del Mediterráneo oriental, en Oriente Próximo. La Península de Anatolia, Líbano o Siria serían el lugar de origen de los primeros ejemplares de esta planta provenientes

de una especie silvestre común con las coles y coliflores, donde se la comenzó a seleccionar por características especiales al menos 2500 años atrás (Babula y col., 2007).

Durante la época de dominio del Imperio Romano, esta hierba llegaría hasta la Península Itálica donde fue cultivada para consumo. Pero sería mucho más tarde, a mediados del siglo XX, cuando su producción se desarrollaría en Europa. Como resultado de la selección, dentro de *B. oleracea* se encuentran seis vegetales distintos, conocidos colectivamente como coles. Incluyen la coliflor (*B. oleracea* ssp. *botrytis* L.) y el brócoli (*B. oleracea* ssp. *italica* L.), con la inflorescencia más elevada que la primera, kohlrabi o colirrábano (*B. oleracea* ssp. *gongylodes* L.) con el tallo engrosado, kale (*B. oleracea* ssp. *medullosa* Thell.) cuyas hojas centrales no forman una cabeza, repollo (*B. oleracea* ssp. *capitata* L.) con las hojas alargadas y retorcidas recubriendo la yema apical, y repollo de Bruselas (*B. oleracea* ssp. *gemmifera* DC) con numerosos brotes de yemas laterales.

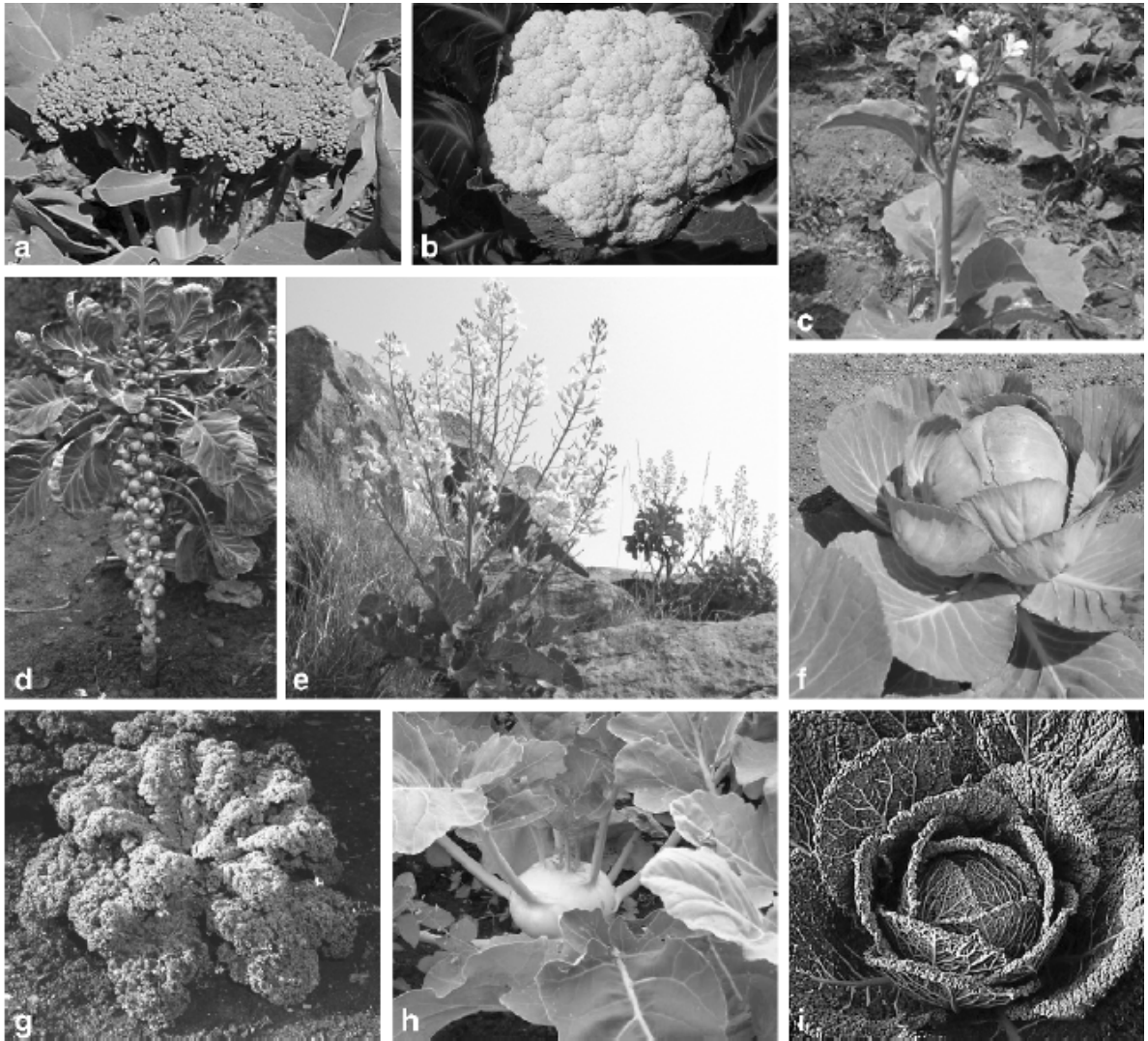


Figura 2. Distintas formas de *Brassica oleracea*. a Brócoli (*B. oleracea* ssp. *italica* L.). b Coliflor (*B. oleracea* ssp. *botrytis* L.). c Kale chino (*B. oleracea* var. *alboglabra*). d Repollos de Bruselas (*B. oleracea* ssp. *gemmifera* DC). e Repollo salvaje (*B. oleracea* var. *silvestris*). f Repollo (*B. oleracea* ssp. *capitata* L.). g Kale rizado (*B. oleracea* var. *sabelica*). h Kohlrabi o colirrábano (*B. oleracea* var. *gongylodes*). i Repollo savoy (*B. oleracea* var. *sabauda*).

Importancia económica

En la actualidad su cultivo se extiende por Europa, diversas naciones asiáticas, sudamérica y Estados Unidos, el principal país productor con una producción mayor de 450.000 Tn/año y un consumo *per cápita* de 2,5 kg/año.

En Argentina, no hay registros confiables sobre el consumo de brócoli. Datos de la década de los '80 indican sólo 0,5 kg/habitante/año; pero durante el periodo 1990/95 los volúmenes históricos de ingreso al Mercado Central de Buenos Aires crecieron un 265%, con un volumen de 2285,4 Tn en 1995 (Stoppani y col., 2000), y manteniéndose en volúmenes similares hasta el año 2011 (comunicación personal, Mercado Central de Bs. As.).

Valor nutricional

El órgano comestible es la masa de yemas florales y de finos pedúnculos, que se desarrolla en el extremo del tallo central y recibe el nombre de inflorescencia. Puede producir otras inflorescencias laterales más pequeñas que salen de las axilas de las hojas del tallo principal. La inflorescencia es de color verde oscuro, no está cubierta por hojas, y está soportada sobre un tallo floral largo.

Tabla 1. Valor nutricional del brócoli por cada 100 g de producto comestible.

Proteínas	5,45 g
Lípidos	0,3 g
Glúcidos	4,86 g
Calorías	42
Vitamina A	3500 U.I
Vitamina B1	100 mg
Vitamina B2	210 mg
Vitamina C	118 mg
Calcio	130 mg
Fósforo	76 mg
Hierro	1,3 mg

El brócoli ha sido calificado como la hortaliza de mayor valor nutritivo por unidad de peso de producto comestible. Su aporte de vitamina C, B2 y vitamina A es

elevado; al igual que su contenido de minerales, particularmente calcio, fósforo e hierro. Posee un alto contenido de antioxidantes, generado principalmente por la vitamina C y los compuestos fenólicos. Por otra parte, el brócoli es un alimento bajo en calorías y alto en fibras, adecuado para una dieta saludable (Latté y col., 2011).

Glucosinolatos

El brócoli se caracteriza por poseer altos contenidos de glucosinolatos, compuestos del metabolismo secundario con S y N en su estructura. Los glucosinolatos son glucósidos que se encuentran localizados en vacuolas. Ante un daño en la planta (corte provocado por un insecto por ejemplo) los glucosinolatos son liberados de las vacuolas y se ponen en contacto con la enzima mirosinasa localizada en el citoplasma. La mirosinasa cataliza la hidrólisis del azúcar generando un compuesto inestable que se descompone en diversos volátiles, cuya función es repeler insectos. Entre estos volátiles se encuentran los isotiocianatos, metabolitos con capacidad anticarcinogénica particularmente activos frente a cáncer de colon/recto y próstata (Farnham y col., 2004; Hayes y col., 2008).

En brócoli, el glucosinolato más abundante es la glucorafanina, cuyas concentraciones son variables entre distintos genotipos (Kushad y col., 1999; Li y col., 2001). La hidrólisis de la glucorafanina conduce a la formación de sulforafano, un isotiocianato que ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos debido a que es un potente inductor de enzimas detoxificantes y antioxidantes en mamíferos, protegiendo contra de la formación de tumores (Zhang y col., 1994). Los niveles de glucosinolatos disminuyen generalmente durante la postcosecha, debido a la pérdida de integridad de las membranas durante la senescencia, lo que provoca la mezcla de los glucosinolatos con la mirosinasa. Por ello, el almacenamiento en frío y una alta humedad relativa (98-100 %), así como las atmósferas controladas (CA) o atmósferas modificadas (MAP) son importantes para retardar dicha pérdida, por lo que se considera que las condiciones de almacenamiento necesarias para mantener la calidad del brócoli también lo son para mantener el contenido de glucosinolatos (Jones y col., 2006).

Fases del cultivo y requerimiento

En el desarrollo del brócoli se pueden considerar las siguientes fases:

- De crecimiento: la planta desarrolla solamente hojas.
- De 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 aquellas desarrolladas en la fase de crecimiento.
- De formación de pellas: se desarrolla una pella en la yema terminal de la planta y, al mismo tiempo, en las yemas axilares de las hojas comienza la fase de inducción floral con la formación de nuevas pellas, que serán bastante más pequeñas que la pella principal.
- De floración: los tallos que sustentan las partes de la pella inician un crecimiento en longitud, con apertura de las flores.
- De fructificación: se forman los frutos (silicuas) y semillas.

El brócoli es un cultivo que se realiza fundamentalmente durante las estaciones de otoño e invierno. Para un desarrollo normal de la planta es necesario que las temperaturas durante la fase de crecimiento oscilen entre 20 y 24 °C; para poder iniciar la fase de inducción floral necesita entre 10 y 15 °C durante varias horas del día.

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%.

Como todas las crucíferas, el brócoli requiere suelos con tendencia a la acidez y no a la alcalinidad, estando el óptimo de pH entre 6,5 y 7, con suelos preferentemente de textura media.

El cultivo parte de la siembra de la semilla en *seedlings*, luego se trasplanta a campo cuando la planta llega a 30-35 días en invernadero, con 5 a 6 hojas verdaderas, tallo firme y volumen adecuado de raíces.

El momento de cosecha óptimo considerado para el mercado fresco es cuando la cabeza principal o inflorescencia tiene un tamaño ideal de 12 a 15 cm, con un grano fino y compacto. En el caso de la cosecha para mercado de proceso, se retrasa el corte hasta que la inflorescencia alcance mayor tamaño, antes del alargamiento del pedicelo.

Senescencia

La senescencia es una de las posibles etapas finales del desarrollo de un vegetal o una parte del mismo. Habitualmente se puede evidenciar por el amarilleamiento que sufren los órganos verdes a causa de la pérdida de clorofila. Esta transformación visible es acompañada por activos cambios metabólicos que resultan en la removilización de nutrientes almacenados en los tejidos durante el desarrollo, para ser transferidos a otras partes de la planta. En consecuencia, el principal propósito de la senescencia en las plantas es la removilización y reciclado de nutrientes. La etapa final de este proceso es la muerte del órgano en cuestión, aunque la misma es activamente retrasada de modo tal que la planta logre reciclar la máxima cantidad posible de nutrientes (Buchanan-Wollaston y col., 2003).

Los vegetales que son cosechados cuando su desarrollo no está completo o su crecimiento no ha finalizado, están sujetos a un estrés considerable debido a la abrupta interrupción en el suministro de energía, nutrientes y hormonas. Por ello, un producto como el brócoli sufre una rápida senescencia durante su almacenamiento y tiene una vida útil muy corta. Muchos de los cambios observados en los vegetales verdes durante el almacenamiento, como pérdida de clorofila, deterioro de la estructura celular y finalmente, muerte celular, muestran similitudes con los cambios observados durante el desarrollo de la senescencia en hojas. Page y col. (2001) encontraron que durante la senescencia foliar ocurre la expresión de numerosos genes

similares a los del brócoli en postcosecha, lo que indica que en ambos casos estarían involucradas las mismas rutas metabólicas que conducen a la senescencia.

La senescencia puede ocurrir naturalmente cuando un órgano o la planta entera ingresan en una determinada etapa fisiológica o puede ser inducida prematuramente debido a condiciones ambientales adversas, entre las que se cuenta la cosecha del vegetal. El proceso de senescencia se encuentra finalmente regulado de manera tal que los elementos celulares sean desmantelados progresivamente, permitiendo la removilización de nutrientes. La degradación de clorofila es el primer síntoma visible, pero al momento del amarilleamiento, una gran parte del proceso ya fue llevado a cabo. La degradación de proteínas y de ARN ocurre paralelamente a la pérdida de la actividad fotosintética. La degradación de ácidos nucleicos, especialmente el ARN, provee una importante cantidad de fósforo y se lleva a cabo por numerosas nucleasas cuya expresión se ve incrementada durante la senescencia.

Degradación de clorofila. Una vez que la clorofila es liberada de los complejos tilacoidales debe ser rápidamente degradada para evitar su fotoactividad y consecuente generación de radicales libres y lesión tisular. Se ha postulado que la primera reacción es la eliminación del fitol catalizada por la clorofilasa. Posteriormente, se produce la remoción del ión central de Mg^{2+} por la Mg dequelatasa (MDS) para generar feofórbido (Hörtensteiner, 2006). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que en una primera etapa podría liberarse el Mg^{2+} de la clorofila por la acción de una enzima desconocida generando feofitina, y luego hidrolizarse el fitol por acción de una feofitinasas (Schelbert y col., 2009), conduciendo también a feofórbido. La enzima clave en la ruta de degradación parece ser la feofórbido *a* oxigenasa (PaO), que cliva el feofórbido para producir RCCs (*Red Chlorophyll Catabolites*), logrando de esta manera eliminar la fotoactividad de la clorofila pero también deverdeando el tejido (Matile y col., 1999).

Degradación de proteínas. Durante la senescencia se produce una importante degradación y movilización de proteínas, la mayor parte de las cuales están localizadas dentro del cloroplasto. La disminución del contenido de proteínas provoca a su vez una acumulación de aminoácidos libres y amoníaco si estos no son traslocados a otra parte

de la planta. Numerosos trabajos han demostrado una intensa degradación de proteínas del estroma y los tilacoides del cloroplasto (Thomas y Donnison, 2000). Por otra parte, se detecta la síntesis de nuevas proteínas, particularmente proteasas que son direccionadas hacia vacuola y cloroplastos. A medida que la senescencia progresa, el nivel de proteínas disminuye y la actividad proteasa aumenta (Coupe y col., 2003b). Se cree que el rol primario de las proteasas durante la senescencia de la planta es la removilización de nutrientes desde las células que mueren hacia tejidos en activo crecimiento de la planta, aunque también se ha asociado a las proteasas en un papel de mediadores en las señales de transducción y como efectores de la muerte celular (Beers y col., 2000).

Degradación de lípidos. Durante la senescencia hay una disminución en la integridad estructural y funcional de las membranas celulares, lo que es el resultado del metabolismo acelerado de los lípidos de membrana (Thompson y col., 1998). En el momento de senectud de la hoja, el suministro de hidratos de carbono se ve disminuido por el desmantelamiento del aparato fotosintético y ante la escasez de producción de azúcares, toma importancia la vía del glioxilato para la obtención de energía necesaria para las restantes reacciones catabólicas. Los genes que codifican enzimas como fosfolipasas, ácido fosfatídico fosfatasa, y todas aquellas involucradas en la beta-oxidación de los ácidos grasos aumentan su expresión durante la senescencia sugiriendo que dichas enzimas podrían estar involucradas en el metabolismo acelerado de lípidos (Thompson y col., 1998). Es por ello que las enzimas que llevan a cabo estas reacciones normalmente en los peroxisomas, están presentes también en hojas maduras (Graham y Eastmond, 2002).

Regulación hormonal de la senescencia

El control hormonal de la senescencia está dado por dos hormonas principales de acción antagónica: citocininas y etileno. Elevadas concentraciones de citocininas retrasan la senescencia, mientras que la presencia de etileno la acelera.

El efecto de las citocininas sobre la senescencia ha sido comprobado a través de aplicaciones exógenas de estas hormonas, o en plantas transgénicas con niveles aumentados de citocininas endógenas. En ambos casos, las inflorescencias de brócoli se mantienen verdes y no presentan síntomas de senescencia por un tiempo más prolongado (Gan y Amasino, 1997). Se ha demostrado que si las cabezas de brócoli son sumergidas enteras en soluciones de 6-BAP durante la postcosecha, se produce una clara inhibición del proceso de senescencia, produciéndose un retraso en la degradación de proteínas y una inhibición del incremento de asparagina, glutamina y amoníaco (Downs y col., 1997).

El tratamiento con 6-BAP en brócoli inhibe la actividad clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasa y el aumento de la expresión de genes asociados a la degradación de clorofilas (Costa y col., 2005b; Büchert y col., 2011c)

Por otro lado, se ha demostrado que plantas expuestas al etileno presentan senescencia acelerada (Pogson y col., 1995). La producción de etileno puede ser suspendida, inhibiendo las actividades enzimáticas de ACS (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa) y ACO (ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa), generando un retraso en la aparición de los síntomas de senescencia (Chen y col., 2008).

Dentro de los tratamientos químicos postcosecha se destacan fuertemente las aplicaciones de 1-MCP (1-metil-ciclopropeno). Este compuesto es un bloqueador selectivo de los receptores de etileno, y puede ser utilizado como tratamiento para retrasar la senescencia y la maduración de frutos (Pogson y col., 1995; Gong y Mattheis, 2003). EL 1-MCP es un gas y actúa ocupando los receptores de etileno, inhibiendo por lo tanto la señalización de etileno y su acción (Blankenship y Dole, 2003; Chen y col., 2008).

Además del etileno y las citocininas, se ha demostrado que otras hormonas participan también en la regulación de la senescencia. El ácido jasmónico y el ácido abscísico son promotores mientras que las giberelinas tendrían un rol de inhibidores del proceso (Kumar y col., 2008; Reinbothe y col., 2009; Li y col., 2010). Finalmente, se

ha sugerido que la señalización mediada por azúcares también podría jugar un rol importante en el desarrollo de este proceso (Rolland y col., 2002).

Métodos de conservación y tratamientos postcosecha

El brócoli sufre un deterioro de la calidad muy rápido durante la postcosecha a causa de la senescencia acelerada, por lo que si se lo almacena a altas temperaturas (20 °C) se torna amarillo luego de 3-4 días (King y Morris, 1994). A esta pérdida de calidad visual se le debe sumar la disminución en el contenido de proteínas, hidratos de carbono y ácido ascórbico (Nishikawa y col., 2003; Costa y col., 2005a). Los niveles de glucosinolatos también disminuyen durante la postcosecha, reduciendo de esta manera la calidad nutracéutica del producto (Jones y col., 2006).

El método más comúnmente aceptado para conservar el brócoli es la refrigeración, con una temperatura cercana a 1-2 °C y humedad relativa de 95 %. También se han evaluado estas estrategias alternativas para retrasar la senescencia de modo de complementar los beneficios que aporta la refrigeración. En este sentido, diversos tratamientos postcosecha, tales como atmósferas modificadas (Barth y col., 1993), atmósferas controladas (Hurst y col., 1996), tratamientos térmicos (Tian y col., 1997), radiación UV-C (Lemoine y col., 2007), aplicaciones de 1-metilciclopropeno (1-MCP) (Ku y col., 1999), y luz visible (Büchert y col., 2011b), han resultado útiles para retrasar la senescencia.

Atmósferas modificadas

Las atmósferas modificadas (AM) se definen como el envasado de un producto perecedero en una atmósfera que ha sido modificada logrando una composición diferente a la de aire (Al-Ati y Hotchkiss, 2003). Se diferencia de las atmósferas controladas (AC) en que en éstas últimas la composición del gas que rodea el producto (N₂, O₂ y CO₂ principalmente) es mantenido en un valor fijo mediante monitoreo y adición de gases, mientras que en AM la composición de la atmósfera de

almacenamiento no está estrictamente controlada (Rodríguez-Aguilera y Oliveira, 2009).

La atmósfera dentro del envase se puede modificar pasivamente por la respiración del producto y la permeabilidad selectiva a los gases del film que lo rodea. La variación en el cambio y la composición final de los gases en el envase depende tanto del producto como de la permeabilidad del material de envasado. Esta técnica de AM tiene la desventaja de que puede requerir un período largo de tiempo de almacenamiento para alcanzar la composición óptima del gas, lo que puede acarrear problemas importante en productos con vida útil relativamente corta. Para superar ese problema puede realizarse una modificación activa de la atmósfera, generando un vacío e inyectando la mezcla de gas deseada en el envase. La desventaja de AM activa respecto de AM pasiva son los altos costos en equipos y gases. Por su efectividad en el mantenimiento de los atributos de calidad del producto y sus menores costos, el empleo de las atmósferas modificadas ha crecido en las últimas décadas (Türk y Özçurt, 1994; Rojas-Graü y col., 2009).

Tratamiento térmico

El tratamiento térmico (TT) consiste en someter al material vegetal a un estrés térmico leve sin llegar a una lesión permanente de modo que el producto reduzca su velocidad de maduración o senescencia y/o adquiera resistencia para futuras situaciones de estrés. Se pueden utilizar metodologías tales como sumersión en agua caliente (Tian y col., 1997) o tratamientos con aire caliente (Funamoto y col., 2002). El TT reduce el metabolismo del vegetal en lo que refiere a síntesis de etileno, respiración, ablandamiento de tejidos y metabolismo de pigmentos, disminuyendo de esta manera la tasa de maduración y/o senescencia (Paull y Chen, 2000).

El TT es utilizado para reducir la incidencia del ataque de patógenos y el desarrollo de enfermedades, afectando directamente al agente patógeno o induciendo mecanismos de defensa en el vegetal (Ferguson y col., 2000).

También se utilizan inmersiones en agua caliente para la desinfestación de insectos (Couey, 1989), debido a que el agua caliente es un medio más eficiente de transferencia de calor respecto del aire. Finalmente, este tipo de tratamientos permite reducir el daño por frío en aquellas especies susceptibles durante el almacenamiento refrigerado (Ferguson y col., 2000).

Tratamientos con 1-metilciclopropeno (1-MCP).

El etileno es uno de los numerosos reguladores de crecimiento que afectan el crecimiento y desarrollo, incluyendo la maduración y senescencia (Abeles y col., 1992). Es un alqueno simple que puede difundir dentro y fuera de los tejidos de la planta desde fuentes endógenas o exógenas (Watkins, 2006). La producción de etileno es una parte esencial de la maduración de frutos climatéricos, y puede afectar de un modo importante la calidad de los productos cosechados de forma positiva o negativa, según el producto en cuestión. La aplicación exógena de etileno se realiza con fines comerciales como la maduración de frutos (Vendrell y McGlasson, 1971), o la inducción floral en ornamentales (Imanishi y col., 1994). Sin embargo, debido a su efecto acelerador de la senescencia, la estrategia comercial más común en los productos hortícolas es evitar la exposición al etileno o minimizar la producción y la acción del mismo durante la cosecha, el almacenamiento y el transporte mediante el control de la temperatura y la atmósfera (Watkins, 2006).

El 1-MCP es un inhibidor de la percepción del etileno debido a su interacción con los receptores del mismo, a los que se une irreversiblemente y compite con el etileno por los sitios de unión con una afinidad por los mismos aproximadamente 10 veces superior (Blankenship y Dole, 2003). Ello finalmente previene de las respuestas en cascada dependientes del etileno (Sisler y Serek, 2003).

El compuesto normalmente se aplica a temperaturas de 20-25 °C. Aplicaciones a menores temperaturas implica tener en cuenta más factores como el tiempo y concentraciones de aplicación. Se debe tener en cuenta además, que en ciertos cultivos no es efectivo, posiblemente debido a baja sensibilidad del producto al etileno

(Jiang y col., 2002). En brócoli, la aplicación de 1-MCP produce mejor efecto a 20 °C aunque también se encontró efecto a 5 °C (Ku y Wills, 1999).

Factores pre-cosecha involucrados en la calidad postcosecha

En general, la problemática postcosecha ha sido estudiada aisladamente de todo aquello que implica condiciones y manejo durante el cultivo. Hay relativamente pocos ejemplos en los que se estudia el efecto de factores pre-cosecha sobre el comportamiento postcosecha de frutos o vegetales. Por ejemplo, en albahaca (*Ocimum basilicum*), lechuga (*Lactuca sativa* L. "Ravita"), acelga roja (*Beta vulgaris* L. var *flavescens* (Lam.) Lam) y rúcula (*Eruca vesicaria* spp. *sativa*) se encontró que cosechando las hojas hacia la tarde se incrementó la vida útil de las muestras respecto de las cosechas a la mañana, con menores niveles de carbohidratos (Lange y Cameron, 1994; Clarkson y col., 2005).

En brócoli particularmente, los trabajos son prácticamente inexistentes. Se ha descrito, por ejemplo, que inflorescencias cosechadas de plantas sometidas a estrés hídrico mostraron un retraso en el amarilleamiento y niveles superiores de citocininas. Se ha sugerido que en momentos de escasez de agua, la raíz incrementa su volumen para aumentar la superficie de exploración, lo que a su vez favorece la síntesis de mayores cantidades de dicha hormona, que luego de ser traslocada a la inflorescencia, permitiría retrasar la senescencia durante la postcosecha (Wurr y col., 2002; Zaicovski y col., 2008).

Objetivos

Objetivo general

Estudiar el rol de los hidratos de carbono en la senescencia postcosecha de brócoli.

Objetivos específicos

Capítulo I:

Estudiar el efecto del momento de la cosecha a lo largo del día sobre la senescencia durante la postcosecha de la inflorescencia de brócoli.

Capítulo II:

Estudiar el efecto del momento de la cosecha a lo largo del día sobre la expresión de los genes asociados a la degradación de clorofila en brócoli: clorofilasa 1 (*BoCLH1*), clorofilasa 2 (*BoCLH2*), feofitinas (*BoPPH*) y feoforbido *a* oxigenasa (*BoPaO*).

Capítulo III:

Estudiar el efecto del tratamiento con azúcares sobre la senescencia postcosecha de la inflorescencia de brócoli.

Capítulo IV:

Estudiar el metabolismo enzimático de azúcares en brócolis cosechados a diferentes horas del día y en brócolis sometidos a diferentes tratamientos.

Materiales y Metodología

Material vegetal, tratamientos y condiciones de almacenamiento

Cosechas a diferentes horas del día

Las cabezas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica* cv. *Iron*) se obtuvieron de una finca en los alrededores de La Plata, Argentina (34° 59'S y 58° 3'O). A diferentes horas del día, 8, 13 y 18 h, se cosecharon cincuenta cabezas de brócoli en buen estado fisiológico y sin patologías. Luego, se llevaron inmediatamente al laboratorio, donde se procesaron y se ubicaron en bandejas plásticas, una por cabeza, y se recubrieron con PVC perforado para evitar deshidratación excesiva. Las muestras se almacenaron en oscuridad a 20 °C para acelerar la senescencia, durante 5 días. Se tomaron muestras periódicamente, se midió el color superficial, luego se cortaron y congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

Tratamientos con azúcares en postcosecha

Se cosecharon cabezas de brócoli a las 8 h, se despojó de hojas el tallo y se las ubicó en recipientes sumergiendo la primera fracción del tallo en solución de 2 y 10% de glucosa o 2, 10 y 15% de sacarosa. Otras 15 cabezas se ubicaron en potes con agua solamente para utilizarlas como controles. Las muestras se almacenaron en oscuridad a 20 °C para acelerar la senescencia, por un período de 5 días. Se tomaron muestras periódicamente, se midió el color superficial, luego se cortaron y congelaron con nitrógeno líquido, y posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. En la figura 1 se muestran las condiciones de almacenamiento mencionadas.

Tratamientos con 1-MCP

Se cosecharon cabezas de brócoli a las 8 hs, y se despojó al tallo de las hojas. Las cabezas se ubicaron en recipientes plásticos y se almacenaron en un contenedor hermético con una concentración de 1-MCP de 1 $\mu\text{l l}^{-1}$ durante 16 h a 22 °C. Los controles se colocaron en las mismas condiciones sin 1-MCP. Luego del tratamiento las cabezas se almacenaron en oscuridad a 20 °C por un período de 5 días. Se tomaron

muestras periódicamente, se midió el color superficial, luego se cortaron y congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.



Figura 1: almacenaje de las cabezas de brócoli en solución azucarada, en oscuridad y a 20 °C.

Tratamientos térmicos

Se cosecharon cabezas de brócoli a las 8 h, se despojó de hojas el tallo y se colocaron en bandejas y se recubrieron con film PVC para disminuir la pérdida de agua. Se trataron las cabezas con aire caliente a 42 °C durante 3 h, en estufa con aire a convección. Se utilizó el mismo número de cabezas sin tratamiento a modo de control. Luego de eso, se almacenaron las cabezas a 20 °C como se describe en el inciso anterior. Se tomaron muestras a 0 h (inicialmente para las muestras control), luego del tratamiento a 42 °C durante 3 h, y periódicamente durante el período de almacenamiento. Se midió el color superficial, luego se cortaron y congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Tratamientos con atmósferas modificadas

Se cosecharon cabezas de brócoli a las 8 hs, se colocaron en bandejas plásticas y luego se introdujeron en bolsas de polietileno de baja densidad (40 µm de espesor, 20 cm x 30 cm) de forma individual y herméticamente cerradas. Se almacenaron en oscuridad a 20 °C durante 5 días como se indica previamente. El mismo número de

cabezas fueron cubiertas con film PVC, utilizadas como controles y almacenadas en las mismas condiciones. Se tomaron muestras periódicamente, se midió el color superficial, luego se cortaron y congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Medición del color superficial

El color superficial (sistema L* a* b*) fue medido con un colorímetro (Minolta CR-400, Osaka, Japón) durante el período de almacenamiento. Se midió la reflectancia uniformemente en distintos sectores de la inflorescencia, tomando 6 datos por cabeza. El ángulo Hue (h°) se calculó como:

$$h^\circ = \tan^{-1}(-b/a) \text{ cuando } a \text{ y } b > 0, \text{ o}$$

$$h^\circ = 180^\circ + \tan^{-1}(b/a) \text{ cuando } a < 0 \text{ y } b > 0.$$

Determinación del contenido de clorofila

Las muestras congeladas se molieron con un molinillo eléctrico. A continuación, se mezclaron 0,8 g del polvo de tejido obtenido con 5 ml de acetona:agua (80:20), se homogeneizó y se centrifugó a 5000 x g durante 10 min. Se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3750 µl de acetona:agua nuevamente. Se centrifugó 10 min a 5000 xg; por último se resuspendió el pellet en 1250 µl de acetona:agua y se centrifugó durante 5 min. Se colectaron los sobrenadantes de las centrifugaciones, se completó el volumen hasta 10 ml y en el mismo se determinó el contenido de clorofilas de acuerdo a Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila } a: (12,25 \times \text{Abs}_{663,2 \text{ nm}}) - (2,79 \times \text{Abs}_{646,8 \text{ nm}})$$

$$\text{Clorofila } b: (21,5 \times \text{Abs}_{646,8 \text{ nm}}) - (5,1 \times \text{Abs}_{663,2 \text{ nm}})$$

El contenido de clorofila se expresó como µg por gramo de tejido fresco.

Determinación del contenido de azúcares reductores y totales

Azúcares totales.

El contenido de azúcares totales se determinó según el método de la Antrona-sulfúrico (66% v/v de H₂SO₄). En presencia del ácido sulfúrico, los hidratos de carbono se deshidratan y se convierten en furfural o hidroximetilfurfural. Estos productos se condensan con la Antrona y rinden compuestos coloreados. Dado que la intensidad del color desarrollado durante la condensación es función del contenido de carbohidratos presentes en la muestra, dichos compuestos pueden cuantificarse por espectrofotometría.

Preparación del extracto: Se realizaron extractos con 2 g de brócoli congelado y triturado en 12 ml de etanol, se centrifugaron a 16000 x g durante 15 min a 4 °C. Las determinaciones de azúcares totales se hicieron sobre alícuotas de los extractos etanólicos.

Preparación del reactivo: la solución stock 66% (v/v) de H₂SO₄ se preparó agregando 330 ml de H₂SO₄ con agitación y enfriamiento externo sobre 170 ml de agua destilada. Se disolvieron 0,25 g de Antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno) en esta solución.

Determinación: se preparó una mezcla de reacción con 1 ml de solución de Antrona + 150 µl agua + 20 µl extracto (diluído 1:3 en agua). Simultáneamente se preparó una curva de calibración utilizando glucosa como estándar en el rango de concentraciones 18-45 µg/ml.

Se calentó luego en un baño de agua a ebullición durante 10 min, se dejó enfriando 20 min a temperatura ambiente en un baño de agua y en oscuridad.

Se midió la absorbancia a 620 nm y los resultados se expresaron como mg de glucosa por g de tejido fresco.

Azúcares reductores.

Se utilizó el mismo extracto etanólico obtenido de acuerdo a lo descrito previamente. Los azúcares reductores se dosaron mediante el método de Somogyi-Nelson. Los glúcidos reductores, calentados en medio alcalino, reducen el ión cúprico presente en el reactivo. El óxido cuproso formado de esta manera, reduce el complejo

arsénico-molíbdeno a óxido de molibdeno dando coloración azul, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de azúcares reductores existentes en la muestra.

Procedimiento: se agregaron 60 µl del extracto (diluido 1:4), 1100 µl H₂O y luego el reactivo cuprotartárico en relación 200 µl reactivo A + 800 µl reactivo B (1A:4B); se llevó a baño 100 °C, con un tiempo de incubación de 10 min; se agregaron 500 µl del reactivo arsénico-molíbdeno, se incubó durante 30 min y se leyó la absorbancia a 520 nm (Nelson, 1944). Simultáneamente se preparó una curva de calibración utilizando glucosa como estándar en el rango de concentraciones 12-24 µg/ml. Los resultados se expresaron como mg de glucosa por gramo de tejido fresco.

Determinación de sacarosa, glucosa y fructosa por HPLC

Se obtuvieron los extractos etanólicos como se menciona en el punto anterior. Para favorecer una mejor separación de los azúcares y compatibilizar el solvente de la muestra con el solvente de corrida del HPLC, luego de la extracción se evaporó el etanol para resuspender la muestra en una mezcla acetonitrilo/agua 70/30. Para la separación de los azúcares se utilizó un equipo de HPLC Waters, con una columna Microsorb-MV NH₂ R0086700C5 (Varian), fase móvil AcN/H₂O 70/30, utilizando un caudal de corrida de 1 ml/min. Para la cuantificación se utilizó un detector de índice de refracción IR 2414 (Waters, USA).

Determinación del contenido de almidón

El contenido de almidón se midió mediante un método enzimático adaptado de Rose y col. (1991). Se homogeneizaron 0,6 g de muestra con 5 ml de una mezcla metanol:cloroformo:agua (12:5:3 v/v/v) para remover azúcares solubles, pigmentos y otros compuestos. El homogenato se centrifugó a 2200 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento 3 veces hasta obtener un sobrenadante claro. El residuo se llevó a sequedad por evaporación en baño de agua a 50 °C durante 2 h. Se agregó al residuo NaOH 0,1 M para solubilizar el almidón y luego se neutralizó con ácido acético 0,1 N, ajustando el pH a 5,1. Luego se mezclaron 400 µl

del extracto con 100 μ l de solución enzimática (α -amilasa 416 U/ml y amilogucosidasa 2 U/ml) y se dejó en baño de agua a 50 °C durante 23 h para lograr la digestión enzimática. Finalmente se utilizó una alícuota de dicha mezcla de reacción para medir el contenido de glucosa, utilizando un kit enzimático (glucosa oxidasa 10 U/ml y peroxidasa 1 U/ml, Wiener Lab, Argentina). El contenido de almidón se expresó como mg por gramo de tejido fresco.

Determinación de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante se determinó mediante la utilización del radical libre DPPH (Brand Williams y col., 1995). Este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta. En su forma radical, el DPPH* tiene una banda de absorción a 515 nm la cual desaparece luego de la reducción provocada por algún compuesto antioxidante, decolorándose hacia amarillo pálido.

Para obtener el extracto se tomó 1 g de tejido congelado molido y se colocó en 6 mL de etanol; se agitó 1 h a 4 °C; se centrifugó a 9000 x g 15 min, a 4 °C. El radical DPPH* se preparó en una concentración de 40 mg/l en etanol. Para la medida se agregaron distintas cantidades de extracto (0, 25, 50, 75 y 100 μ l), 1000 μ l de solución de DPPH* y etanol hasta un volumen de 1300 μ l se incubó 1,5 h a 20 °C y se leyó la absorbancia a 515 nm. El % de DPPH* remanente ($\%DPPH_{rem.} = 100 \times (\text{lectura a 515 nm} / \text{lectura a 515 nm inicial})$) es inversamente proporcional a la carga de antioxidantes en el extracto. Se denomina EC_{50} a la concentración de extracto que causa la disminución del 50% en la concentración inicial de DPPH*, expresándose como poder antioxidante como EC_{50}^{-1} (a mayor DPPH remanente, menor poder antioxidante).

Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

Se midió el contenido de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu (FC). El ensayo de FC se basa en la transferencia de electrones desde compuestos fenólicos hacia complejos de ácidos fosfomolibdicos/fosfotúngsticos, que al reducirse generan un compuesto coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente a 760 nm. La reacción ocurre en un medio alcalino para facilitar la extracción de un electrón

del fenolato. Aunque la reacción de transferencia de electrones no es específica de los compuestos fenólicos, el proceso de extracción desde el tejido elimina el 85% del ácido ascórbico y otros compuestos que causan interferencias. Para obtener el extracto se procedió de igual forma que lo realizado en el caso de antioxidantes totales. Se preparó una mezcla de reacción con 150 μl de extracto, 1000 μl H_2O , 200 μl FC (1:1 en agua), luego de 3 min se agregaron a la mezcla 1500 μl de Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1 N, se incubó 1 h y se leyó la absorbancia a 760 nm. Como patrón se utilizó solución de fenol en etanol. El resultado se expresó como mg de fenol por gramo de tejido fresco.

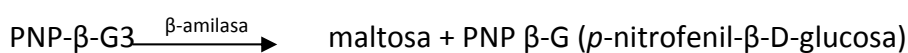
Determinación de actividad Invertasa (beta-fructofuranosidasa) (EC 3.2.1.26)

Se tomaron muestras de brócoli congeladas, se las sumergió en $\text{N}_2(\text{l})$ y trituró mediante molinillo eléctrico; se tomaron 2 g de polvo de tejido y se mezclaron con 10 ml de buffer de extracción de la siguiente composición: buffer Hepes- NaOH 25 mM, pH 7,5; PVPP 1% p/v; EDTA 4 mM; Cisteína 10 mM; MgCl_2 10 mM. Se dejó el homogenato en agitación durante 30 min. Se centrifugó en frío a 13.000 rpm durante 10 min y se tomó el sobrenadante que se utilizó para determinar la actividad. Todo el procedimiento se realizó a 0-4 °C.

Para la medida de la actividad se agregaron 200 μl de extracto, 200 μl de buffer (Acetato de Sodio 50 mM pH 6,0) y 200 μl del mismo buffer con sacarosa 50 mM. Se incubó durante 3 h a 35 °C y se frenó la reacción calentando a 100 °C durante 5 min. Posteriormente se tomaron 20 μl de la mezcla y se agregaron 1000 μl del reactivo enzimático del kit para determinar la glucosa (glucosa oxidasa 10 U/ml y peroxidasa 1 U/ml, Wiener Lab, Argentina). Se incubó 5 min a 37 °C y se leyó la absorbancia a 505 nm. La actividad enzimática se expresó como unidades relativas al valor obtenido en la cosecha de las 8 h en los ensayos de las tres cosechas, y relativas al día cero (día de la cosecha) para el ensayo de tratamientos con atmósfera modificada, tratamiento térmico y con 1-MCP.

Determinación de actividad β -amilasa (EC 3.2.1.2)

Se tomaron muestras de brócoli congeladas, se las sumergió en $N_2(l)$ y se trituraron mediante molinillo eléctrico. Se procedió a extraer la enzima y determinar la actividad β -amilasa de acuerdo a las instrucciones del kit *Betamyl Method* (Megazyme). Aproximadamente 0,7 g del tejido triturado se homogeneizaron en presencia de buffer tris/EDTA pH 8, con cisteína-HCl. Se dejó extrayendo 1 h (en frío, para disminuir la proteólisis debido a las proteasas) agitando 3 veces durante este período. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min en frío. Se tomaron 200 μ l del sobrenadante y se mezclaron con 600 μ l de buffer de dilución pH 6,2 (MES 0,1 M, EDTA 1 mM, BSA 1mg/ml). Se preconditionaron 300 μ l del extracto diluido y 100 μ l de sustrato específico (con *p*-nitrofenil- β -D-maltotriósido o PNP- β G3) a 40 °C durante 5 min. Luego se tomaron 100 μ l del extracto y se le adicionaron 100 μ l del sustrato específico, con β -glucosidasa. Se dejó incubar 3h a 37 °C. En esta etapa se producen las reacciones:



La reacción se frenó con Trizma base 1% p/v pH 8,5 y se midió el PNP producido a 400 nm. La actividad enzimática se midió como unidades Betamil-3, definiéndose una unidad como la cantidad de enzima (en presencia de exceso de β -glucosidasa) requerida para remover 1 μ mol de *p*-nitrofenol del PNP- β -G3 en las condiciones del ensayo. Como en el caso anterior la actividad se expresó como unidades relativas al valor obtenido en la cosecha de las 8 h en los ensayos de las tres cosechas, y relativas al día cero (día de la cosecha) para el ensayo de tratamientos con atmósfera modificada, tratamiento térmico y con 1-MCP.

Determinación de actividad Sacarosa Sintasa (EC: 2.4.1.13)

Se tomaron muestras de brócoli congeladas, se las sumergió en N₂(l) y se trituraron mediante molinillo eléctrico. Se midió 1 g de tejido y se homogenizó con 5 ml de buffer de extracción (Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,5, PVPP 1% p/v, EDTA 4 mM, cisteína 10 mM, MgCl₂ 10 mM).

Se dejó 40 min en agitación a 4 °C, luego se centrifugó en frío a 13.000 rpm, durante 10 min.

Se extrajo el sobrenadante y se analizó la actividad de la enzima según Vassey (1989), con leves modificaciones. Se mezclaron 140 µl extracto + 350 µl UDP 5 mM (en buffer pH 7,5) + 233 µl sacarosa 0,5 M + 270 µl Hepes 50 mM. Se dejó la mezcla en reacción durante 3 h y se frenó la misma hirviendo durante 5 min (baño agua 100 °C).

Finalmente se midió la cantidad de fructosa liberada mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS, Miller, 1959). Como en el caso anterior la actividad se expresó como unidades relativas al valor obtenido en la cosecha de las 8 h en los ensayos de las tres cosechas, y relativas al día cero (día de la cosecha) para el ensayo de tratamientos con atmósfera modificada, tratamiento térmico y con 1-MCP.

Extracción de ARN total

Se extrajo ARN total mediante la utilización de columnas de separación proveídas por kits de extracción (*RNeasy plant mini kit*, Qiagen). Se tomaron muestras de brócoli congeladas, se las sumergió en N₂(l) y se trituraron mediante molinillo eléctrico. Se pesaron 100 mg de tejido y se procedió a la extracción del ARN. Al tejido congelado se le adicionaron 450 µl de Buffer (RLT, conteniendo β-mercaptoetanol y tiocianato de guanidina, desnaturizantes de ARNasas).

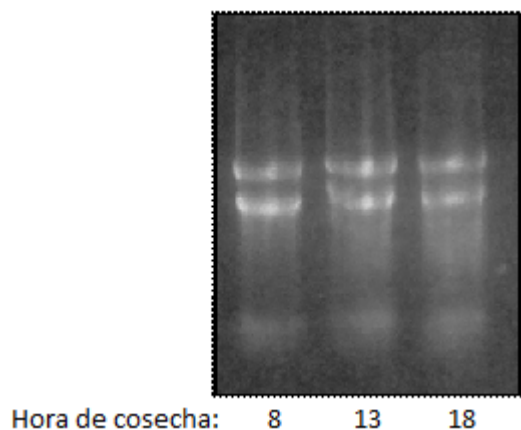


Figura 2. Electroforesis en condiciones desnaturizantes de ARN de muestras de brócoli cosechados a diferentes horas del día (8 h, 13 h y 18 h).

Se transfirió el homogenato a una columna para la filtración de restos de tejido. Se centrifugó a 10000 xg a temperatura ambiente durante 2 min. Luego se extrajo el sobrenadante y se le agregaron 0,5 volúmenes de etanol 96-100%. Se homogeneizó, se agregó a una columna de separación y se centrifugó a 10000 xg durante 30 s y se descartó el sobrenadante. Para el lavado de la columna, se agregaron a la columna 700 μ l de buffer (RW1, con guanidina y etanol), se centrifugó a 10000 xg 30 s, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de buffer (RPE, con etanol).

Se centrifugó nuevamente a 10000 xg durante 30 s y se descartó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento y se centrifugó nuevamente 2 min para eliminar rastros de buffer con etanol que interfiera en futuras reacciones. Finalmente, se colocó la columna en otro tubo, se agregaron 40 μ l de H₂O libre de RNAsas y se centrifugó a 10000 xg durante 1 min para eluir el ARN. Las muestras de ARN obtenidas se conservaron a -80 °C (figura 2).

Análisis de ARN total

Para confirmar la integridad del ARN extraído, cada muestra de ARN total (1 μ l) fue analizada por electroforesis en geles desnaturizantes que contenían 1 % p/v de agarosa, 1 % v/v de formaldehído y MOPS 1 X. Pevio a su siembra, las muestras se desnaturizaron durante 10 min en una mezcla que contenía MOPS 1 X, formamida 50 % v/v, formaldehído 20 % v/v y bromuro de etidio 0,3 μ g μ l⁻¹. La muestra se incubó a

65 °C durante 10 min y se agregaron 3,5 µl de buffer muestra para ARN 6 X (glicerol 50% p/v; EDTA 1 mM; azul de bromofenol 0,4 % p/v; xilencianol 0,4 % p/v). Por último las muestras se sembraron en el gel previamente preparado y se utilizó la electroforesis a voltaje constante (90 V) en buffer MOPS 1X. Las bandas correspondientes a los ARNr se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV y la presencia de bandas discretas permitió determinar la integridad del ARN extraído. Una vez chequeada la integridad del ARN, se procedió a su cuantificación en espectrofotómetro a 260/280 nm y 260/230nm, mezclando una alícuota de 1 µl RNA en 49 µl H₂O. El resultado se expresó en µg/µl.

Purificación del ARN

Para eliminar una posible contaminación con ADN genómico, se realizó un proceso de tratamiento enzimático y purificación. Para ello, se tomaron 4 µg de ARN total, se agregaron 3 µl de la enzima RQ1 DNAsa (1 U. µl⁻¹, Promega), 1 µl buffer y agua destilada csp 10 µl. Se incubó la muestra a 37 °C por 30 min, se agregaron 90 µl de H₂O (mQ estéril) y 100 µl de cloroformo:octanol (24:1). Se agitó y centrifugó 10 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. A continuación se pasó el sobrenadante de la fase acuosa a otro tubo y se agregaron 200 µl de etanol y 20 µl de AcNa 3M. Se dejó precipitando 1h a -80 °C y se centrifugó 20 min a 12000 rpm en frío (4 °C). Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 200 µl etanol 70% y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm en frío (4 °C). Se descartó el sobrenadante, se secó al vacío el alcohol remanente y se resuspendió el pellet en 15 µl de H₂O (mQ estéril). A continuación, se cuantificó la muestra en espectrofotómetro mezclando una alícuota de 1 µl RNA purificado en 49 µl H₂O.

Para chequear la posible presencia de algún remanente de ADN en la muestra, se realizó una prueba de PCR. Para ello, se tomaron 0,5 µl de ARN, se agregaron 2,5 µl buffer, 1,5 µl MgCl₂, 0,5 µl dNTPs, 1,25 µl cebadores r (*reverse*), 1,25 µl cebadores f (*forward*), 17,37 µl H₂O, 0,125 µl Taq (polimerasa). Se llevó a termociclador (BioRad, USA) y se utilizó el programa: 4 min a 94 °C...45 s a 94 °C...45 s a 70 °C...45 s a 72 °C... ..7 min a 72 °C...tiempo indeterminado (∞) a 15 °C (94, 70 y 72°C = 25 ciclos). Tiempo aproximado: 1 h 30 min.

A continuación, se tomaron 15 μl de la mezcla y se hizo una corrida en gel de agarosa 0,5 g en 43 ml H_2O , con patrones desde 50 hasta 1000 pb (PB-L Ladder 50pb plus). Se chequeó la ausencia de bandas nítidas de productos de PCR amplificados lo que indicó que el tratamiento fue correcto. La muestra de ARN se utilizó inmediatamente para las reacciones de transcripción reversa.

Transcripción reversa

A partir del ARN purificado, se obtuvo el ADN complementario (ADNc) realizando una reacción de transcripción reversa mediante la enzima M-MLV (*Moloney Murine Leucemia Virus reverse transcriptase*, Promega). A 2 μg de ARN purificado se le agregaron 0,15 μl de hexámeros (*Random primers*, Biodynamics) y agua destilada csp 18,55 μl . Se incubó la mezcla a 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min, luego se dejó en hielo 5 min y posteriormente se agregaron 0,3 μl de dNTPs (bases nitrogenadas, dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 5 μl de buffer de reacción 5X (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM, DTT 10 mM, pH 8,3) y 1 μl de enzima M-MLV (200 U μl^{-1}), llegando a un volumen final de 25 μl . La mezcla se incubó en termociclador a 38 $^{\circ}\text{C}$ durante 90 min y luego a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min para inactivar la enzima.

Para corroborar la generación del ADNc por el procedimiento anterior, se realizó un ensayo de PCR con las muestras tratadas como se indicó en el punto anterior y luego se visualizó en electroforesis en gel de agarosa la presencia de bandas nítidas de ADNc. Se utilizó como patrón de bandas de referencia un mix de fragmentos PB-L Ladder 50pb plus (figura 3).

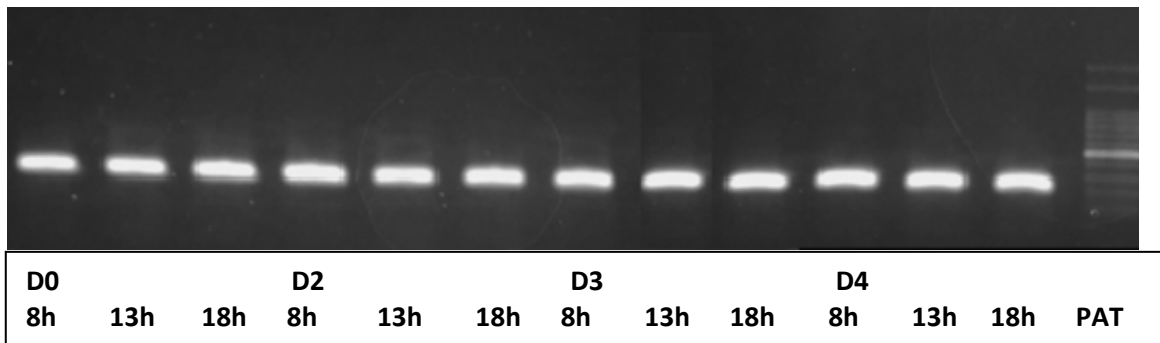


Figura 3. Electroforesis de los fragmentos de ADNc amplificados por PCR para las muestras cosechadas a distintas horas del día (8, 13 y 18 h) y durante el período de almacenamiento (D0, D2, D3 y D4). PAT: patrón de fragmentos de ADN doble cadena de 50 pb a 500 pb.

Reacciones de q-PCR en tiempo real

Luego del diseño de las secuencias de los cebadores y puesto a punto las condiciones de amplificación para la medida de la expresión por q-PCR (PCR cuantitativa) de los genes asociados a senescencia involucrados en el catabolismo de clorofilas (Tabla 4.1), se realizaron reacciones de PCR comparativa en tiempo real de dos pasos (RT-qPCR) utilizando SYBR Green I como método de detección, mediante un equipo Mx3005P (Stratagene) y el kit *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche). La mezcla de reacción fue: 1 µl de muestra de ADNc y 9 µl de mezcla (*master mix*: 0,5 µl de cebadores f (*forward*) y de r (*reverse*) de cada gen a estudiar más los de la actina, 3 µl H₂O, 5 µl *SYBR Green*). Se utilizó un gen de actina de *Brassica oleracea* (Act ARNm *BoAct*, AF044573) como gen normalizador (*housekeeping*) (tabla 1).

Se midió la expresión de los siguientes genes utilizando los cebadores y condiciones indicados en cada referencia: *BoPaO* (feofórbido α oxigenasa) (Gómez Lobato y col., 2012); *BoCHL1* (clorofilasa 1) (Büchert y col., 2011); *BoCHL2* (clorofilasa 2) (Büchert y col., 2011); *BoPPH* (feofitinas) (Büchert y col., 2011).

Tabla 1. Nombres y secuencias de los cebadores utilizados.

Nombre	Secuencia del cebador	Gen a amplificar
BoCLH1 qFw	5' - AGACCCATCCATCAAGTTTTCAGC - 3'	Clorofilasa 1 (<i>BoCHL1</i>)
BoCLH1 qRv	5' - AGATTTTCGGGATCGGTTCTTATGC - 3'	
BoCLH2 qFw	5' - AGATGCCTGTTCTAGTTATTGG - 3'	Clorofilasa 2 (<i>BoCHL2</i>)
BoCLH2 qRv	5' - CACGCTGGACCTTGACATTC - 3'	
BoPaO qFw	5'- GCGAAATCCCGTCCAGAGTCTC-3'	Feofórbido α oxigenasa (<i>BoPaO</i>)
BoPaO qRv	5'- TTATCTCCGCCGTGCTCTTCTTC -3'	
BoPPH qFw	5' - AGAGGTTATCGGTGAGCCA - 3'	Feofitinasa (<i>BoPPH</i>)
BoPPH qRv	5' - GACGAGATGAGGATGGG - 3'	
BoAct qFw	5'-CCAGAGGTCTTGTTCCAGCCATC-3'	Actina (<i>BoAct</i>)
BoAct qRv	5'-GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAC-3'	

El programa térmico utilizado para todos los ensayos fue el siguiente: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s y 60 °C por 1 min, con medición de fluorescencia al final de cada ciclo de 30 s. Al final de cada programa se agregó el siguiente perfil térmico para obtener una curva de disociación, con el fin de evaluar los productos de PCR formados y detectar una posible contaminación: 95 °C por 1 min; 55 °C por 30 s; 95 °C por 30 s, con medición de fluorescencia constante durante el cambio de temperatura de 55 °C a 95 °C. Todas las medidas se realizaron al menos por triplicado y se incluyeron controles sin molde, a fin de evaluar la presencia de contaminación con material genético no deseado.

Diseño experimental y análisis estadístico

La experiencia se diseñó de acuerdo a un diseño factorial, siendo los factores el momento de la cosecha o los tratamientos y el tiempo de almacenamiento. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y las medias se compararon usando el test LSD y 0,05 de nivel de significación (α).

Capítulo I:

Efecto del momento de cosecha sobre la senescencia postcosecha de brócoli

i. Introducción

El brócoli es un vegetal altamente perecedero que presenta una senescencia acelerada luego de la cosecha. Esto conduce a un deterioro del tejido y pérdida de calidad nutricional y comercial (Page y col., 2001). La senescencia inducida que ocurre en hojas y órganos cosechados, tal como las inflorescencias de brócoli, muestran diversas similitudes con los eventos que ocurren durante el transcurso de la senescencia normal de las hojas. La degradación de clorofila es el cambio más notorio visualmente, pero también se producen simultáneamente importantes pérdidas en lípidos de membrana, proteínas e hidratos de carbono. Este conjunto de reacciones catabólicas provoca un deterioro de la estructura celular que conlleva a la muerte del tejido o el órgano (Irving y Joyce, 1995; Page y col., 2001).

La producción de carbohidratos a través de la fotosíntesis es un proceso fundamental en la vida de la planta, dado que éstos tienen la función de proveer energía y esqueletos carbonados para la respiración y los procesos biosintéticos, además de intervenir en procesos osmóticos y como inductores en señales de transducción y moduladores de la expresión de genes (Koch, 1996; Sheen y col., 1999; Smeekens, 2000). Así, se sabe que la glucosa regula un amplio rango de genes, incluyendo los genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, los de señales de transducción y los de transporte de metabolitos, además de numerosos genes de respuesta al estrés como los de biosíntesis y de transducción de señal del etileno, los cuales se ven reprimidos por la acción de la glucosa (Price y col., 2004).

Las fluctuaciones diurnas en la radiación solar influyen sustancialmente en los niveles endógenos de carbohidratos en hojas. El almidón, la reserva de carbohidratos más abundante de la planta, se encuentra en dos formas: como almidón de almacenamiento y como almidón transitorio. Durante el período de luz, los productos inmediatos de la fotosíntesis son el almidón transitorio y la sacarosa, los cuales se acumulan durante dicho proceso (Lu y col., 2005). La removilización y utilización de estos carbohidratos se activa durante el período de oscuridad para proveer energía al vegetal. Este proceso cesa al iniciarse nuevamente el período de luz, para dar

comienzo a un nuevo ciclo de producción y removilización de carbohidratos (Sicher y col., 1984).

En los tejidos fotosintéticos, más de la mitad del carbono asimilado puede almacenarse como almidón dentro del cloroplasto durante las horas de luz. Asimismo, la sacarosa derivada de la fotosíntesis es transportada vía floema a los órganos destino donde podrá sintetizarse y almacenarse almidón (Grennan, 2006). Durante la oscuridad, el almidón transitorio es degradado predominantemente por la vía β -amilolítica en glucosa y maltosa y posteriormente exportado al citosol, siendo éstas las mayores formas de exportación de carbono del cloroplasto durante la noche para ser usado tanto para la síntesis de sacarosa como de fuente energética (Weise y col., 2004). Si bien la cantidad de glucosa y de sacarosa es dependiente de la presencia de luz, la cantidad de maltosa es regulada tanto por la luz como por el reloj circadiano (Lu y col., 2005).

Un sinnúmero de metabolitos presentan variaciones en su concentración durante el ritmo circadiano. En algunas especies se han detectado variaciones en los niveles de antioxidantes a lo largo del día. En *Quercus ilex* se describieron variaciones en el contenido de ascorbato, glutatión, tocoferoles y carotenoides en hojas expuestas al sol durante los meses de invierno (García-Plazaola y col., 1999). En espinaca (*Spinacia oleracea*), se demostró que la concentración de ácido ascórbico total también puede estar sometido a fluctuaciones diurnas (Kiyota y col., 2006). Por otro lado, en *Phaseolus vulgaris* se halló que la síntesis de clorofilas también está regulada por el ritmo circadiano (Argyroudi-Akoyunoglou y Prombona, 1996). Asimismo, la expresión de genes que codifican para enzimas de diversas reacciones metabólicas, factores de transcripción y proteínas estructurales puede variar a lo largo del día (Más y Yanovsky, 2009).

El estado fisiológico en que se encuentra un vegetal puede influir sobre su comportamiento durante la postcosecha, así en diferentes productos estudiados se detectaron diferencias en la tasa de senescencia según el momento del día en que se realizó la cosecha (Lange y Cameron, 1994; Clarkson y col., 2005).

ii. Objetivo

Estudiar el efecto del momento de la cosecha a lo largo del día sobre la senescencia durante la postcosecha de la inflorescencia de brócoli.

iii. Resultados y discusión

Los métodos para mantener el verdor de las cabezas usualmente implican tratamientos postcosecha tales como refrigeración, atmósferas modificadas o controladas, tratamientos térmicos o radiación UV-C (Toivonen, 1997; Jacobsson y col., 2004; Ku y Wills, 1999; Costa y col., 2006). Sin embargo, los factores pre-cosecha han recibido una escasa atención sobre su efecto en la senescencia postcosecha. En este sentido, y teniendo en cuenta las posibles variaciones del metabolismo durante el día, en el presente trabajo se analizó el efecto de la cosecha de brócoli a diferentes horas sobre la senescencia postcosecha.

Color superficial

Las muestras de brócoli se cosecharon a diferentes horas del día, a las 8, 13 y 18 h y se almacenaron en oscuridad a 20 °C. Como primera aproximación para evaluar el progreso de la senescencia se midió el color superficial durante el período de almacenamiento (figura 1.1). El color es uno de los mayores atributos que afectan la percepción de calidad por parte del consumidor (Francis, 1995), y esa percepción de calidad cambia ante los primeros síntomas de senescencia del tejido vegetal. Al día de la cosecha, las muestras presentaron un color verde oscuro y valores similares de *Hue* y *L**, indicando uniformidad en el color superficial en todas las muestras.

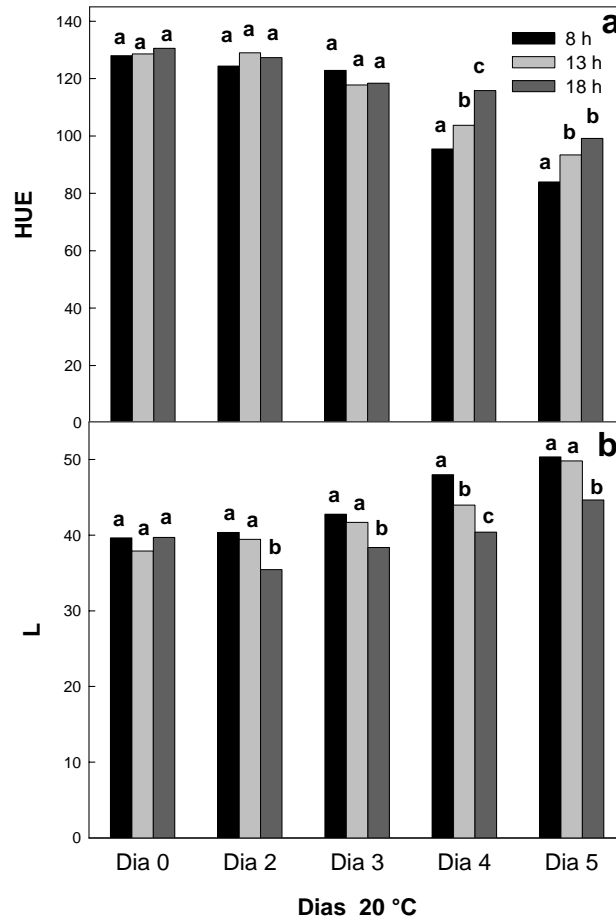


Figura 1.1. Cambios en el parámetro *Hue* (Panel a) y el parámetro *L** (Panel b) en cabezas de brócoli cosechadas a diferentes horas del día (8, 13 y 18 h) y almacenadas a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Hacia el día 3 de almacenamiento, las muestras perdieron levemente el color verde oscuro pasando a un verde claro con una disminución poco pronunciada de los valores de *Hue*, aunque no se detectaron diferencias entre las distintas muestras. A partir de ese momento, las cabezas de brócoli cosechadas a las 8 h comenzaron a tornarse amarillas y mostraron una mayor disminución de los valores de *Hue* comparado con las muestras cosechadas hacia la tarde. Las muestras cosechadas a las 13 h mostraron un comportamiento intermedio entre las muestras obtenidas a las 8 y aquellas a las 18 h (figura 1.1 panel a).

Resultados similares se obtuvieron para el parámetro *L**. En este caso, mayores valores de *L** indican colores amarillos más definidos. Como ocurre normalmente

durante la senescencia del brócoli, donde se incrementan los valores de L^* durante el almacenamiento postcosecha (Ren y col., 2005), desde el día inicial hasta el final del período de almacenamiento los valores de L^* se incrementaron en todas las muestras. Las cabezas cosechadas a las 18 h mostraron los menores incrementos en los valores de L^* , mientras que en las muestras de las 8 h se observaron los mayores valores (figura 1.1 panel b). De acuerdo a los datos de color superficial, los materiales cosechados hacia el final del día prolongaron en aproximadamente un día su vida útil en comparación a los cosechados al inicio del día. Tomando como uno de los parámetros de calidad el mantenimiento del color verde, Clarkson y col. (2005) lograron similares aumentos en la vida útil de hojas de lechuga y remolacha cuando las mismas fueron cosechadas hacia el final del día, respecto de las hojas cosechadas a la mañana.

Contenido de azúcares simples y almidón

El desarrollo de la inflorescencia del brócoli está asociado a numerosos cambios metabólicos que requieren energía provista por los azúcares. La cosecha interrumpe el ingreso de nutrientes provenientes de la raíz y las hojas y desencadena la senescencia, durante la cual se interrumpe la fotosíntesis en los sépalos (Page y col., 2001). Ambos hechos cambian significativamente los aportes de azúcares necesarios para el mantenimiento de la integridad del tejido. En el presente trabajo, para evaluar la incidencia del momento de cosecha sobre el nivel de azúcares en las inflorescencias, se midió el contenido de azúcares solubles totales y reductores, así como el contenido de almidón durante el almacenamiento postcosecha.

Durante la senescencia postcosecha, o como evento desencadenante de la misma, ocurre una disminución continua del nivel de azúcares (King y Morris, 1994; Chung y col., 1997; Coupe y col., 2003a).

Inmediatamente luego de la cosecha, el nivel de azúcares totales y reductores fue similar en todas las muestras, tanto aquellas cosechadas a la mañana como aquellas obtenidas al mediodía y a la tarde (figura 1.2, paneles a y b). Durante el almacenamiento, las muestras cosechadas a las 8 h mostraron una disminución en el contenido de azúcares totales, mientras que las cabezas obtenidas a las 13 h

mantuvieron el nivel de azúcares, mostrando una caída sólo después de 5 días. En el caso de las muestras cosechadas a las 18 h, se detectó un ligero incremento en el contenido de azúcares totales luego de 3 y 4 días, con una disminución hacia el día 5, aunque exhibiendo valores superiores a las muestras cosechadas a las 8 y las 13 h (figura 1.2, panel a). Así, durante el almacenamiento, las muestras obtenidas a las 18 h tuvieron contenidos de azúcares mayores que las muestras cosechadas a las 8 h desde el día 2 hasta el día 5, mientras que las cabezas cosechadas a las 13 h tuvieron valores intermedios, con excepción del día 5, cuando mostraron valores similares a las muestras cosechadas a la mañana.

Un patrón similar mostró el contenido de azúcares reductores. Las muestras obtenidas a las 8 h mostraron una importante disminución durante los primeros tres días y luego se mantuvieron constantes. En el caso de las muestras obtenidas a las 13 h, el descenso fue menos pronunciado pero hacia el día 5 mostraron niveles similares de azúcares reductores respecto de las muestras obtenidas a las 8 h. En el caso de las muestras cosechadas a las 18 h, mantuvieron niveles de azúcares reductores similares al día inicial, disminuyendo solo hacia los días 4 y 5, y mostrando valores superiores a los de las cosechas anteriores durante todo el período de almacenamiento (figura 1.2, panel b).

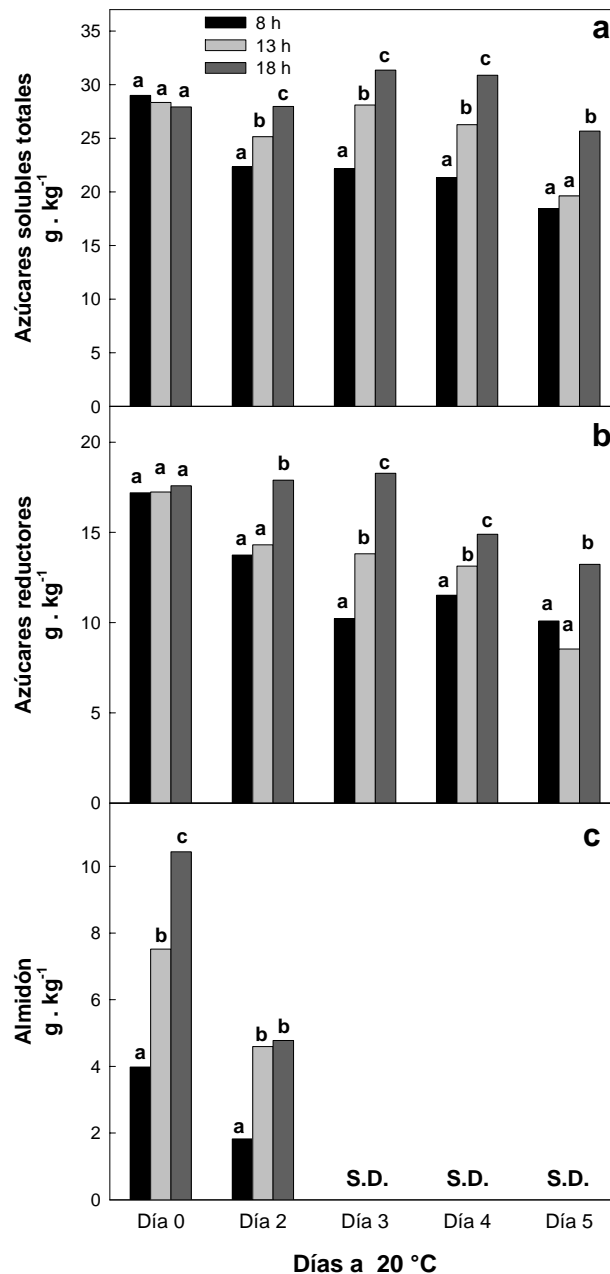


Figura 1.2. Cambios en el contenido de azúcares totales (Panel a), azúcares reductores (Panel b) y contenido de almidón (Panel c) de las cabezas de brócoli cosechadas a diferentes horas del día durante el almacenamiento a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Numerosos trabajos han descrito un descenso del contenido de azúcares totales y reductores durante la postcosecha de brócoli (King y Morris, 1994; Irving y Joyce, 1995; Downs y Somerfield, 1997; Tian y col., 1997; McKenzie y col., 2004). En

estos trabajos se pueden observar diferencias en la tasa de descenso del contenido de azúcares. Si bien estas discrepancias pueden deberse a diferencias entre los cultivares utilizados en cada trabajo, en muy pocos casos se especifica el momento de la cosecha, un factor que habitualmente no es tenido en cuenta y que además puede variar de acuerdo a diferentes prácticas comerciales.

En este trabajo se analizaron también los cambios en el contenido de almidón. En este caso se detectó un patrón completamente diferente al de los azúcares solubles. Las muestras presentaron importantes diferencias según el momento de la cosecha: al día inicial, las que recibieron luz solar durante todo el día (18 h) tuvieron los contenidos de almidón más altos, mientras que las cosechadas al momento de la salida del sol (8 h) tuvieron casi tres veces menos (figura 1.2, panel c). En todas las muestras el contenido de almidón disminuyó durante el almacenamiento, pero las diferencias entre las muestras cosechadas a las 8 h y a las 18 h se mantuvieron luego de 2 días de realizada la cosecha. La degradación del almidón continuó y alcanzó niveles indetectables luego de tres días de almacenamiento en todas las muestras.

La cosecha provoca una interrupción del suministro de hormonas y carbohidratos proveniente de la planta madre, el tejido entra en senescencia y finalmente cesa la fotosíntesis en los sépalos. Sin embargo, para mantener la integridad tisular durante la senescencia es necesario un suministro continuo de fuentes carbonadas. El almidón es una de esas fuentes y por lo tanto se produce una fuerte disminución de su contenido luego de la cosecha (King y Morris, 1994; Tian y col., 1997; McKenzie y col., 2004). En hojas de *Arabidopsis*, los azúcares reductores se mantienen casi constantes durante el ciclo diurno, mientras que la sacarosa incrementa levemente y el almidón en mucha mayor medida hacia el final del día (Blässing y col., 2005). El mantenimiento de un nivel superior de azúcares durante los días posteriores a la cosecha en las muestras de las 18 h, probablemente tenga su origen en el metabolismo del almidón, que se encontró en cantidades superiores en las muestras de las 18 h desde el día de la cosecha hasta el día 2, mientras que las muestras cosechadas a la mañana temprano, al haber pasado las horas previas en oscuridad, sin actividad fotosintética, y por lo tanto utilizando las reservas de hidratos de carbono sintetizados durante el período de luz precedente, mostraron niveles muy inferiores de reservas de almidón. Los productos de la degradación del almidón entran

en la fracción de azúcares solubles y mediante esta vía contribuyen a mantener el nivel de los mismos. En este sentido, en hojas de portulaca (*Portulaca grandiflora* 'Yubi Deep Rose'), se encontró que el carbono localizado en los pools de carbohidratos de la hoja durante la mañana provenía de fracciones individuales de azúcares y del almidón, mientras que durante la tarde los mismos provenían principalmente del almidón (Rapaka y col., 2007). Resultados similares fueron observados en hojas de las plantas herbáceas ornamentales *Pelargonium* (Rapaka y col., 2008), donde en tallos de la misma planta no se detectó una variación en el nivel de azúcares solubles durante el ciclo diurno, lo que sí ocurrió con el almidón. Además, encontraron en plantas cosechadas a la mañana y a la tarde, una correlación negativa entre el nivel de carbohidratos y abscisión foliar. Se postuló que el mayor nivel de azúcares y almidón en las muestras cosechadas a la tarde fue el causal de un descenso en la percepción del etileno.

Lange y Cameron (1994) encontraron que la cosecha hacia el final del día mejoró la vida postcosecha de albahaca (*Ocimum basilicum*) en un 100 % respecto de las muestras cosechadas en las primeras horas de la mañana. En rúcula (*Eruca vesicaria* spp *sativa*), lechuga (*Lactuca sativa* L."Ravita") y remolacha (*Beta vulgaris* L. var. *flavescens* Lam.), Clarkson y col. (2005) obtuvieron aumentos de hasta 6 días en la vida útil en postcosecha en comparación con las muestras cosechadas a la mañana temprano, lo que asociaron a una mayor acumulación de sacarosa y almidón durante el fotoperíodo, un mejoramiento de las características biofísicas de la pared celular y una mayor presión de turgencia de las hojas. Por ello, sugirieron que las diferencias en el patrón de acumulación de almidón o sacarosa entre las especies podrían modular el potencial en la extensión de la vida útil en las cosechas hacia el final del día.

Por el contrario, repollos "col de china" (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) cosechados en distintas horas del día no mostraron diferencias en la duración de la vida postcosecha (Klieber y col., 2002), no observándose diferencias en el contenido de azúcares solubles, aunque el contenido de almidón no fue medido. En este caso, se indicó que las hojas exteriores pueden haber actuado como protectoras de la cabeza del repollo, mitigando los estreses térmicos del campo. En este sentido, el hecho de que las hojas externas recubran a las internas podría bloquear la fotosíntesis y por lo tanto, las fluctuaciones diurnas de los azúcares no estructurales.

Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales

Un incremento en las especies reactivas del oxígeno es un evento común en el proceso de senescencia (Navabpour y col., 2003), y la presencia de sustancias o enzimas que contribuyan al sistema antioxidante pueden prevenir o retrasar los síntomas de senescencia en el tejido (Hodges y col., 2001). Las diferencias en el nivel de azúcar durante el día pueden proteger no solo del estrés de la cosecha sino también del daño por frío, como se vio en plantines de tomate (King, y col., 1988), donde se sugirió que los cambios en la sensibilidad al frío durante el día se regulan mediante el ciclo de luz, siendo el final del periodo de oscuridad el más sensible y ello podría deberse a la disminución del nivel de azúcares.

Se analizó la capacidad antioxidante inmediatamente luego de la cosecha y no se encontraron diferencias significativas en las muestras cosechadas a diferentes horas del día (figura 1.3, panel a). Luego de dos días de almacenamiento, la capacidad antioxidante disminuyó en todas las muestras. Hacia el día 3, la capacidad antioxidante de las muestras cosechadas a las 8 h se mantuvo invariable respecto del día 2, mientras que las cosechadas a las 13 y las 18 h incrementaron su capacidad antioxidante. Hacia los días finales de almacenamiento, la capacidad antioxidante de las muestras cosechadas a las 13 y las 18 h disminuyó, nivelándose con las de las 8 h. Por consiguiente, fueron detectadas diferencias significativas entre las muestras sólo al día tres. Los mayores niveles de antioxidantes detectados en las muestras cosechadas a las 18 h podrían también contribuir a retrasar el proceso de senescencia y el amarilleamiento. Sin embargo, si bien hubo diferencias en el color de la inflorescencia entre las muestras cosechadas a distintas horas del día, durante la mayor parte del ensayo no se detectaron diferencias en el poder antioxidante.

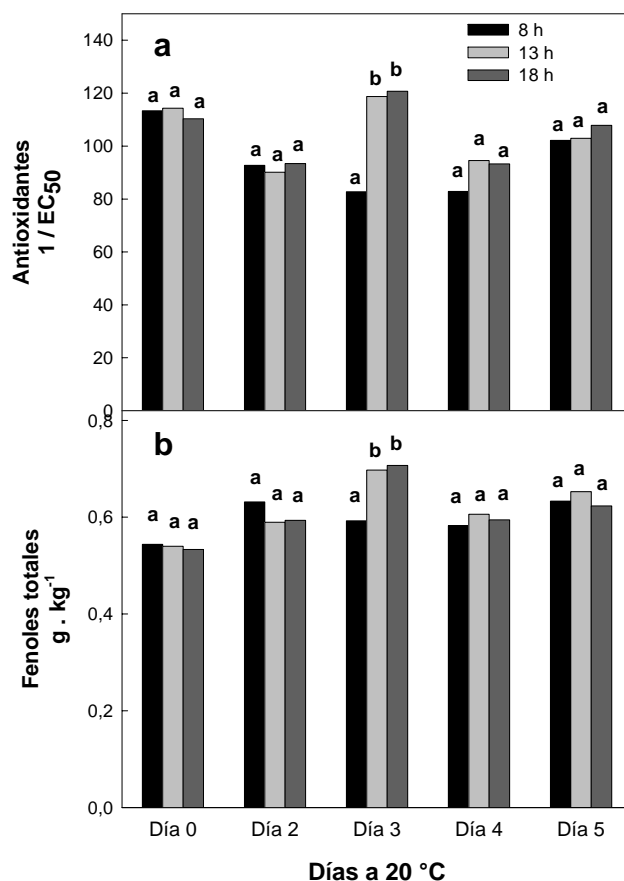


Figura 1.3. Cambios en el poder antioxidante (EC_{50}^{-1}) y fenoles totales durante el almacenamiento a 20 °C de las cabezas de brócoli cosechadas a diferentes horas del día. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Los compuestos fenólicos solubles muestran una relación altamente positiva con la actividad antioxidante (Leja y col., 2001). En el ensayo, inmediatamente luego de la cosecha no se detectaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre las muestras cosechadas a distintos momentos (figura 1.3, panel b), manteniéndose casi constante durante el almacenamiento en las muestras cosechadas a las 8 h. Tal como se observó en las medidas de poder antioxidante total, hacia el día 3 las muestras cosechadas a las 13 y las 18 h mostraron un incremento en los niveles de fenoles totales y finalmente se redujeron hacia los días 4 y 5 a niveles cercanos a los iniciales, similares a los observados para las muestras cosechadas a las 8 h. Probablemente, el incremento de antioxidantes detectado en las muestras de las 18 h

luego de tres días de cosechadas podrían estar relacionadas con el incremento de fenoles observados en el mismo día.

Los análisis llevados a cabo inmediatamente luego de la cosecha, indicaron que en ese tiempo no hubo diferencias entre las muestras en lo que refiere a color superficial, contenido de clorofilas, azúcares solubles y niveles de fenoles y antioxidantes, siendo el contenido de almidón la única diferencia detectada. Cuando estas muestras se almacenaron en oscuridad para inducir su senescencia, se detectó que las cabezas de brócoli cosechadas hacia el final del día mostraron una senescencia menos pronunciada respecto de las obtenidas a la mañana. En las muestras cosechadas a la tarde se observó una mayor retención del color verde y mayores contenidos de azúcares solubles, además de una mayor capacidad antioxidante hacia el día 3 y similar el resto de los días. Ello sugiere que los carbohidratos acumulados durante el día en forma de almidón como producto de la fotosíntesis podrían permitir el mantenimiento de contenidos de azúcares solubles más altos durante la senescencia, contribuyendo a desacelerar dicho proceso.

Los datos no prueban que los carbohidratos acumulados durante el período diurno son el único factor que retrasa la senescencia en las cabezas cosechadas hacia el final del día, pero sí indican que las diferencias encontradas entre las muestras podrían estar relacionadas a los cambios en el contenido de almidón.

Capítulo II:

Efecto del momento de cosecha sobre el catabolismo de clorofilas en brócoli

i. Introducción

La senescencia es un proceso con importantes cambios metabólicos que están regulados genéticamente. Durante este período el tejido cambia de un metabolismo autotrófico a heterotrófico con el objetivo central del reciclado de nutrientes. Numerosos genes, especialmente aquellos asociados al anabolismo, son reprimidos, mientras que aquellos relacionados con el catabolismo en general poseen una expresión aumentada durante este evento. Así, se ha descrito un incremento en la expresión de genes asociados al metabolismo de proteínas, azúcares, lípidos y clorofilas (Louda y col., 1998, Coupe y col., 2003, Navabpour y col., 2003, Eason y col., 2005).

La clorofila es una de las moléculas clave para la fotosíntesis, proceso de central importancia para el mantenimiento de la vida en nuestro planeta. Las moléculas de clorofila están formadas por un anillo tetrapirrólico (también llamado porfirina), de estructura similar al grupo prostético hemo encontrado en la hemoglobina y los citocromos. La clorofila une un ión Mg^{2+} en el centro de su anillo tetrapirrólico y posee una larga cadena lateral hidrofóbica de 20 carbonos unida al mismo, conocida como fitol (figura 2.1). Esta última característica hace que la molécula sea hidrofóbica. Los dos tipos principales de clorofilas son la clorofila *a* y la clorofila *b*, que difieren solamente en la presencia de un grupo metilo (clorofila *a*) o un grupo formilo (clorofila *b*) en el anillo II.

Las clorofilas son compuestos altamente fotoactivos que deben permanecer en un entorno tilacoidal adecuado para no diseminar desorganizadamente la energía que absorben de la luz. Durante la senescencia se produce el desmantelamiento y desestructuración de las membranas tilacoidales, que liberan la clorofila. Teniendo en cuenta que el metabolismo se reorienta hacia el reciclado de nutrientes, es esencial que el tejido se mantenga vital. Por lo tanto, la clorofila debe ser rápidamente degradada para evitar que dañe irreversiblemente las estructuras residuales (Matile y col., 1999).

La ruta bioquímica de degradación de clorofilas aceptada actualmente comprende dos etapas, que se dividen al momento de la apertura del anillo

tetrapirrólico. Los productos pertenecientes a la primera etapa (antes de romperse el macrociclo) mantienen total o parcialmente la coloración verde, mientras que aquellos correspondientes a la segunda etapa pierden esa coloración y son casi incoloros. La primera etapa incluye modificaciones a la cadena lateral del macrociclo, la hidrólisis del residuo de fitol (defitilación), liberación de Mg^{2+} del tetrapirrol mediante desplazamiento con $2H^+$ y algunas otras modificaciones al macrociclo que varían entre las especies. La segunda etapa es esencial para la característica pérdida del color verde durante la senescencia. En la mayoría de los casos estudiados, no se acumulan intermediarios de la degradación en una cantidad que se pueda apreciar, lo cual sugiere que existe una serie de reacciones catabólicas que ocurren de manera coordinada.

La primera reacción catabólica que ocurre sobre la molécula de clorofila libre es la eliminación del fitol y la enzima encargada de la defitilación es la clorofilasa (clorofila-clorofilido hidrolasa, CLH; EC 3.1.1.14), llamativamente una de las primeras enzimas vegetales en ser estudiadas (Willstätter y Stoll, 1913). La clorofilasa cataliza la hidrólisis del enlace éster entre la clorofila y el fitol, reacción que se considera como el primer paso del catabolismo de la clorofila, ya que los productos de degradación en diferentes especies vegetales presentan principalmente estructuras no esterificadas. Los productos de la reacción son fitol y clorofilido (Benedetti y Arruda, 2002; Takamiya y col., 2000; Matile y col., 1999).

La ubicación exclusiva de las clorofilasas en los cloroplastos ha sido cuestionada. Si bien la mayoría de las proteínas con actividad clorofilasa han sido purificadas a partir de preparaciones de cloroplastos y algunos de sus genes codificantes presentan péptido señal que las dirigen hacia estas organelas, otros de los genes recientemente clonados muestran péptidos señal que dirigirían las proteínas hacia el retículo endoplásmico o vacuolas (Tsuchiya y col., 1999; Takamiya y col., 2000; Tsuchiya y col., 2003). Estos resultados establecen la posibilidad de una degradación de clorofilas por fuera del cloroplasto.

Una vez que la cadena lateral hidrofóbica (fitol) es eliminada de la molécula de clorofila, el siguiente paso en la degradación es la eliminación del ión central de Mg^{2+} por la Mg-dequelatasa (MDS). Con respecto a este paso, los estudios han revelado datos contradictorios que no permiten establecer un consenso al respecto, y aún no ha

sido purificada la proteína o clonado el gen correspondiente (Vicentini y col., 1995; Suzuki y Shioi, 2002; Kunieda y col., 2005; Suzuki y col., 2005) (figura 2.1).

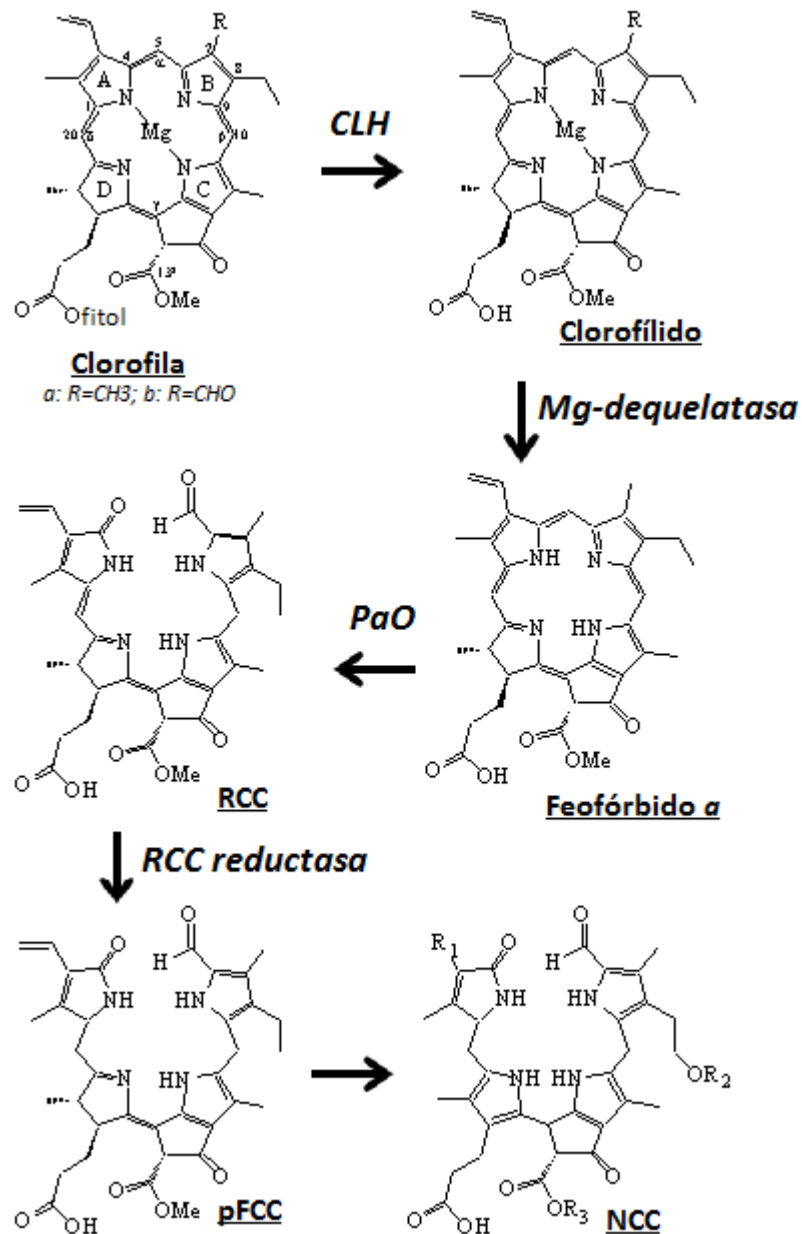


Figura 2.1. Ruta de degradación de la clorofila, con la clorofilasa como primer eslabón en la cadena de reacciones. CLH: clorofilasa, (clorofila hidrolasa); PaO: feoforbido *a* oxigenasa; RCC: *red chlorophyll catabolite*; pFCC: *primary fluorescent chlorophyll catabolyte*; NCC: *nonfluorescent chlorophyll catabolite*

Ciertos resultados de la literatura han llevado a pensar que CLH podría no estar verdaderamente involucrada en la degradación de la clorofila durante la senescencia.

Por ejemplo, no todos los genes CLH aislados poseen un péptido de tránsito al cloroplasto, lo cual sugeriría la presencia de enzimas diferentes a CLH en el proceso. Por otro lado, Schenk y col., (2007) demostraron que mutantes de *Arabidopsis* con la expresión interrumpida para las dos CLH conocidas degradaban clorofilas normalmente, lo que lleva a la conclusión de que los dos genes de CLH no son necesarios para la degradación de estos pigmentos durante la senescencia foliar. En base a estos resultados, Schelbert y col., (2009) realizan una búsqueda en el genoma de *Arabidopsis* y detectan un gen que codifica para una nueva enzima denominada feofotinasa, PPH, que actuaría durante la degradación de clorofilas hidrolizando feofitina (clorofila libre de Mg^{2+}). Una vez planteada la posibilidad de que la defitilación ocurra posteriormente a la eliminación del Mg^{2+} , la vía metabólica de degradación de clorofilas debe ser revisada, especialmente en lo que concierne al orden de las primeras reacciones. Tomando en cuenta la PPH, Schelbert y col., (2009) proponen un nuevo modelo (figura 2.2) en el que la clorofila primero pierde su ión central de Mg^{2+} , ya sea por Mg-dequelatasa o por otro proceso desconocido, para formar feofitina. Luego, este intermediario es defitilado por PPH, para formar feofórbido. A partir de este punto, el proceso continúa de la misma manera que la vía tradicional.

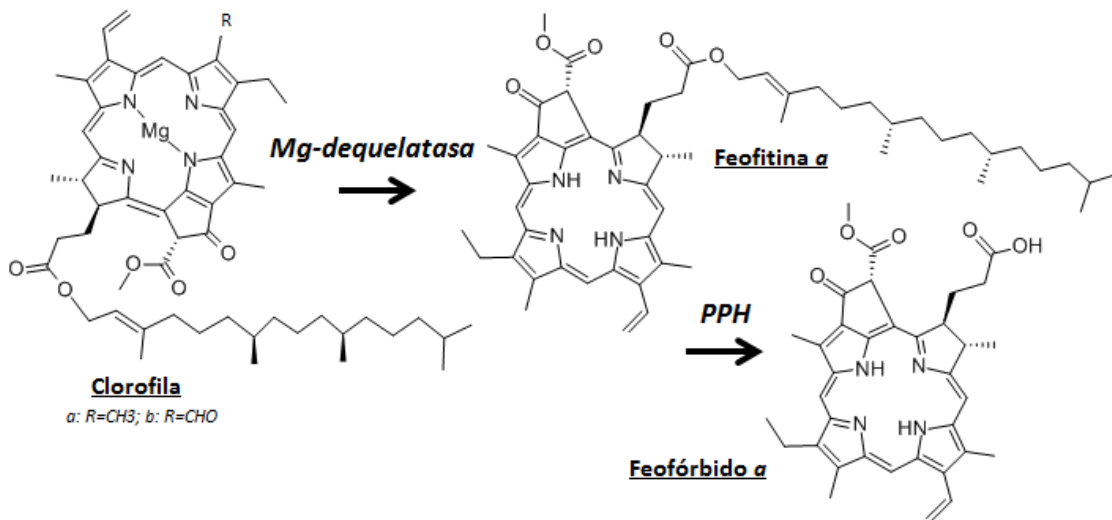


Figura 2.2. Dequelatación del Mg^{2+} del anillo tetrapirrólico mediante la Mg-dequelatasa, seguido de la defitilación por parte de la feofotinasa (PPH). Previamente, la clorofila *b* debe convertirse en clorofila *a*, mediante la clorofila *b* reductasa (Scheumann y col., 1998).

El paso de apertura del anillo tetrapirrólico es determinante para la pérdida del color verde en los tejidos. La enzima feofórbido *a* oxigenasa (PaO) es un componente de la membrana interna de los cromoplastos y gerontoplastos, que cataliza la ruptura oxigenolítica del anillo entre el C-4 y el C-5, generando el compuesto denominado RCC (por *red chlorophyll catabolite*). La enzima presenta una alta especificidad hacia el feofórbido *a*, mientras que el feofórbido *b* induce una inhibición competitiva (Hörtensteiner, 1999; Takamiya y col., 2000; Pružinská y col., 2003). En los mutantes *stay green* de *Festuca pratensis*, una lesión en la actividad PaO (con acumulación de clorofílicos y feofórbidos *a* durante la senescencia) es la causa del mantenimiento del color verde (Thomas y Stoddart, 1975).

Acoplada a la reacción de la oxigenasa que provoca la apertura del anillo, se encuentra la reacción catalizada por la enzima RCC reductasa, la cual reduce el doble enlace entre los anillos A y D del RCC. Esta es una enzima soluble localizada en los cloroplastos, aunque en plantas jóvenes de *Arabidopsis* se ha asociado también a las mitocondrias (Mach y col., 2001). La reacción produce un compuesto incoloro fluorescente, denominado pFCC (por *primary fluorescent chlorophyll catabolite*). Esta reacción requiere la presencia de ferredoxina y ausencia de oxígeno, indicando que las reacciones de RCC reductasa y la de PaO están muy cercanamente relacionadas, ya que la reacción de la oxigenasa consume oxígeno y mantiene el microambiente anaerobio para la reductasa (Takamiya y col., 2000; Wüthrich y col., 2000). De este modo, la apertura del anillo tetrapirrólico mediante la PaO y RCC reductasa genera compuestos fotodinámicamente inocuos para la célula que permiten continuar el proceso de senescencia sin las clorofilas.

Si bien la vía de degradación de clorofilas parece ser muy similar entre diversas especies hasta la formación de los pFCC, la amplia variedad encontrada de estos compuestos permite asumir que ocurre una serie de reacciones luego de su formación. Los pFCC son convertidos a catabolitos fluorescentes de clorofila (FCC) mediante varias modificaciones que varían entre especies, tales como demetilación e hidroxilación, y algunos catabolitos son exportados del gerontoplasto al citosol mediante un translocador de membrana dependiente de ATP (Hörtensteiner, 2006). Los FCC son finalmente transportados a la vacuola y sufren un reordenamiento de los dobles enlaces en el anillo D, formando NCCs (por *nonfluorescent chlorophyll catabolites*).

Esta tautomerización ocurre de un modo no enzimático, bajo las condiciones ácidas de la vacuola.

La clorofila *b* es un pigmento accesorio de los complejos recolectores de luz en plantas superiores, algas y algunos procariotas fotosintéticos, y puede representar hasta un 30% de las clorofilas totales. A pesar de su relativa abundancia, en las plantas superiores sólo se han encontrado catabolitos de la clorofila *a* y ninguno de su forma *b*. Esto indica que debe existir una reversión de clorofila *b* a clorofila *a* al inicio de la vía de degradación, lo cual es llevado a cabo por la enzima clorofila *b* reductasa (Ohtsuka y col., 1997).

Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en los cambios en la coloración superficial en brócolis cosechados en diferentes momentos del día (capítulo 1), en el presente capítulo se mostrará el efecto del momento de cosecha sobre la expresión de genes relacionados al catabolismo de clorofilas.

ii. Objetivo

Estudiar el efecto del momento de la cosecha a lo largo del día sobre la expresión de los genes asociados a la degradación de clorofila en brócoli: clorofilasa 1 (*BoCLH1*), clorofilasa 2 (*BoCLH2*), feofitinasasa (*BoPPH*) y feofórbido α oxigenasa (*BoPaO*).

iii. Resultados y discusión

Contenido de clorofila a y b

Se midió el contenido de clorofilas luego de la cosecha y durante el período de almacenamiento (figura 2.3). En el momento de la cosecha, las muestras tuvieron niveles de clorofilas *a* y *b* similares, disminuyendo dicho contenido durante el almacenamiento en todas las muestras. Sin embargo, luego de dos días esta disminución fue mayor en las muestras cosechadas a las 8 h. Luego de cuatro días las muestras cosechadas a las 18 h tuvieron los valores más altos de clorofilas mientras que las muestras cosechadas a las 8 h presentaron los valores más bajos, siendo los de las muestras de las 12 h intermedios entre los dos anteriores (figura 2.3, paneles a, b y c).

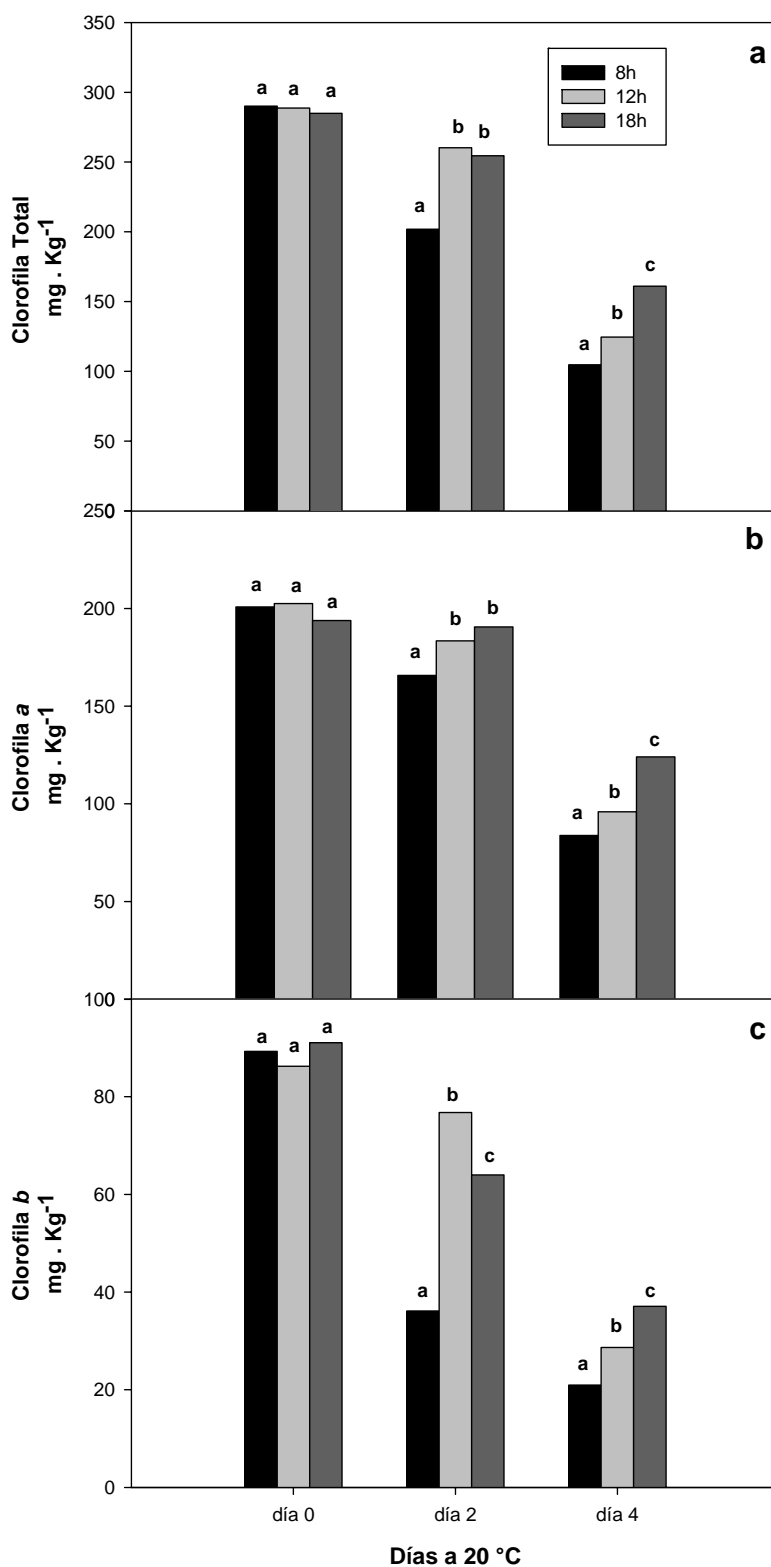


Figura 2.3. Cambios en el contenido de clorofila total (panel a), clorofila *a* (panel b) y clorofila *b* (panel c) durante el almacenamiento a 20 °C de las cabezas de brócoli cosechadas a diferentes horas del día. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Expresión de los genes *BoCLH1*, *BoCLH2*, *BoPaO* y *BoPPH*

Para detectar la expresión de los genes involucrados en el catabolismo de la clorofila, se realizaron extracciones de ARN de las muestras correspondientes a brócolis cosechados en distintos momentos del día y almacenados a 20 °C en oscuridad. De estas muestras se obtuvieron los correspondientes ADNc como se describe en materiales y métodos, corroborándose la amplificación de los fragmentos de ADNc mediante PCR y posterior electroforesis.

Se cuantificó la expresión de los genes *BoCLH1* y *BoCLH2* durante el período postcosecha. La acumulación de transcritos de ARNm de *BoCLH1* fue asociada a tejidos presenescentes y senescentes de brócoli, mientras que la acumulación de ARNm del gen *BoCLH2* no se detectó en tejidos senescentes (Chen y col., 2008). Sin embargo, en el presente trabajo se observó la presencia de ARNm durante la senescencia tanto del gen *BoCLH1* como de *BoCLH2*. La expresión de *BoCLH1* al día inicial fue mayor en las muestras cosechadas a las 13 h, seguido por las muestras de las 18 h, con niveles de expresión 150 y 65% más respectivamente comparando con las muestras de las 8 h. Sin embargo hacia el día 2 hubo una brusca disminución de la expresión en todas las muestras, comportamiento que se continuó a lo largo del período de almacenamiento, durante la senescencia de los brócolis (figura 2.4).

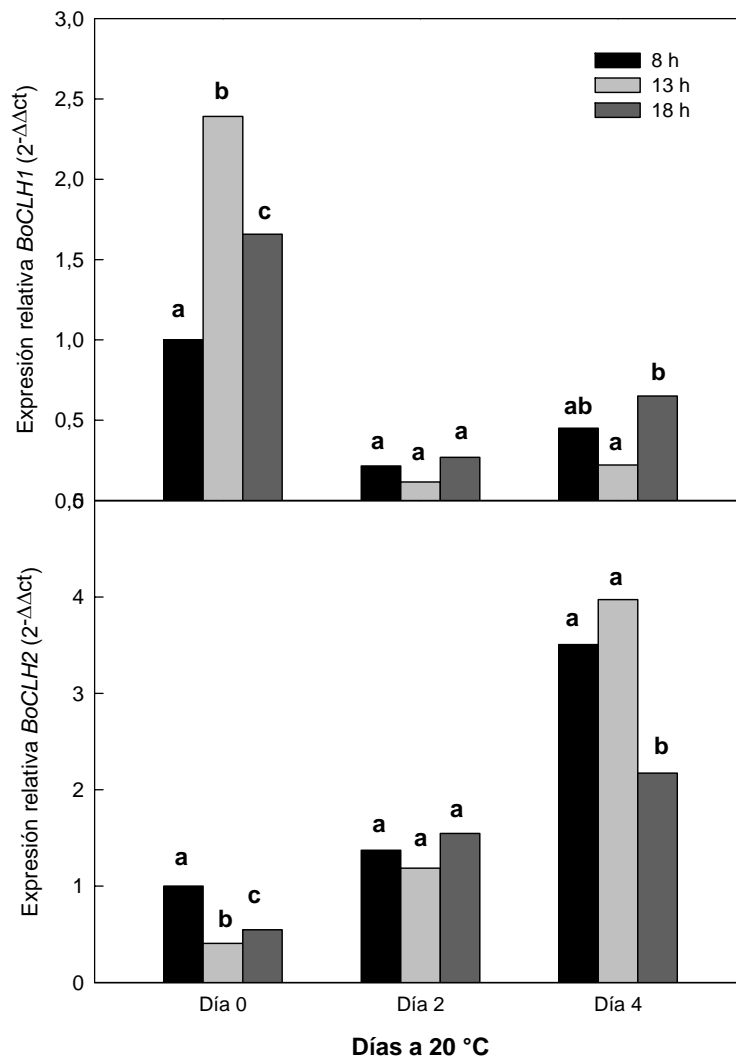


Figura 2.4. Expresión de los genes *BoCLH1* y *BoCLH2* durante el período postcosecha en brócolis cosechados a las 8, 13 y 18 h. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Por otro lado, la expresión de *BoCLH2* aumentó a lo largo del período de almacenamiento en todas las muestras. Al día inicial la expresión fue mayor en las muestras cosechadas a las 8 h, y hacia el día 4, si bien las muestras cosechadas a las 18 h aumentaron la expresión respecto del día 2, fueron las que menor expresión de *BoCLH2* mostraron, mientras que las muestras de las 8 y las 13 h triplicaron la expresión respecto del día 2. Si bien hacia el día 4, momento final del almacenamiento, las muestras de las 18 h contenían mayores niveles de clorofila, no se vio la misma

correlación para los materiales de las 13 h, que si bien contenían más clorofila que las muestras de las 8 h, no hubo diferencias en la expresión de *BoCLH2* entre éstos.

Los resultados reportados en la literatura respecto de la actividad y expresión de clorofilasa son contradictorios. Por un lado se asoció la actividad clorofilasa a la degradación de clorofila durante la senescencia (Tsuchiya y col., 1999; Benedetti y Arruda, 2002), mientras que otros estudios demostraron un papel prescindible de estas enzimas en el catabolismo de clorofila (Schenk y col., 2007; Chen y col., 2008; Zhang y col., 2011). Se estableció que la expresión de *BoCLH2* estaría involucrada parcialmente en la degradación de clorofila durante la senescencia de los tejidos, mientras que la expresión de *BoCLH1* estaría activada más fuertemente frente al daño de tejidos y no durante la senescencia (Kariola y col., 2005), sugiriendo por ello la presencia de otra vía de degradación más importante que la de la clorofilasa (Hörtensteiner 2006; Schenk y col., 2007; Schelbert y col., 2009).

En el presente trabajo la expresión de los genes *BoCLH1* y *BoCLH2* fue dispar en relación a la senescencia, dado que *BoCLH1* disminuyó abruptamente desde el día de la cosecha mientras que la acumulación de transcritos de *BoCLH2* aumentó en el mismo período. Estos resultados son similares a los publicados por Büchert y col. (2011a, 2011b), donde encontraron una disminución de la expresión de *BoCLH1* y un aumento de la expresión de *BoCLH2* durante la senescencia de brócolis, sugiriendo que *BoCLH1* no estaría implicado directamente en la degradación de clorofila durante la senescencia, lo que sí probablemente ocurriría con *BoCLH2*.

Respecto de los niveles de expresión del gen codificante de feofitinasasa (*BoPPH*), mostraron un marcado aumento de hasta 6 veces desde el día de la cosecha hasta el día 2 en todas las muestras. En las muestras cosechadas a las 18 h se notó una disminución importante de la expresión hacia el día 4 de almacenamiento, lo que no ocurrió con las muestras cosechadas a las 8 h, que mantuvieron altos los niveles de ARNm desde el día 2 hasta el día 4. Después del aumento hacia el día 2, las muestras cosechadas a las 13 h mostraron una disminución en el contenido de ARNm hacia el día 4, mostrando niveles de expresión intermedios entre las muestras cosechadas a las 8 h y las de las 18 h (figura 2.5).

La feofitinasas, al igual que la PaO, ha sido asociada con la expresión del gen marcador de senescencia *SAG12*, por lo que, a diferencia de CLH1 y CLH2, la expresión de esta enzima ocurre casi exclusivamente durante la senescencia y degradación de clorofila, potenciándose por el efecto del etileno (el cual acelera la senescencia) y atenuándose ante tratamientos con 6-bencilaminopurina (6-BAP, regulador de crecimiento y retardador de la senescencia) (Zhang y col., 2011; Büchert y col., 2011a). Büchert y col. (2011 a, 2011b) encontraron un aumento de la expresión de *BoPPH* durante la senescencia y un retraso en este aumento en muestras de brócoli sometidas a tratamientos que retardaron el progreso de la senescencia tales como UV-C, térmicos, o citocininas.

La expresión de *BoPaO* así como la actividad, fueron asociadas positivamente a la senescencia, tanto durante el proceso normal de degradación de clorofila de los tejidos verdes (Pruzinská y col., 2003) como también durante la senescencia inducida por etileno, incluso con un patrón de expresión muy similar al del gen *SAG12*, marcador característico de senescencia (Zhang y col., 2011). En el presente trabajo, la acumulación de transcritos de *BoPaO* aumentó notablemente desde la cosecha, a excepción de los materiales cosechados a las 13 h, en los cuales se mantuvo en niveles parecidos al día inicial (figura 2.5). La cantidad de ARNm de *BoPaO* en las muestras cosechadas a las 8 h aumentó desde el día de la cosecha hacia el día 2, y se mantuvo los niveles hasta el día 4. En el caso de las muestras cosechadas a las 18 h, si bien aumentó la expresión luego del día inicial, se detectó una disminución desde el día 2 hasta el día 4, en el cual presentó similares niveles de expresión que las muestras cosechadas a las 13 h, siendo dichos niveles menores que en las muestras cosechadas a las 8 h.

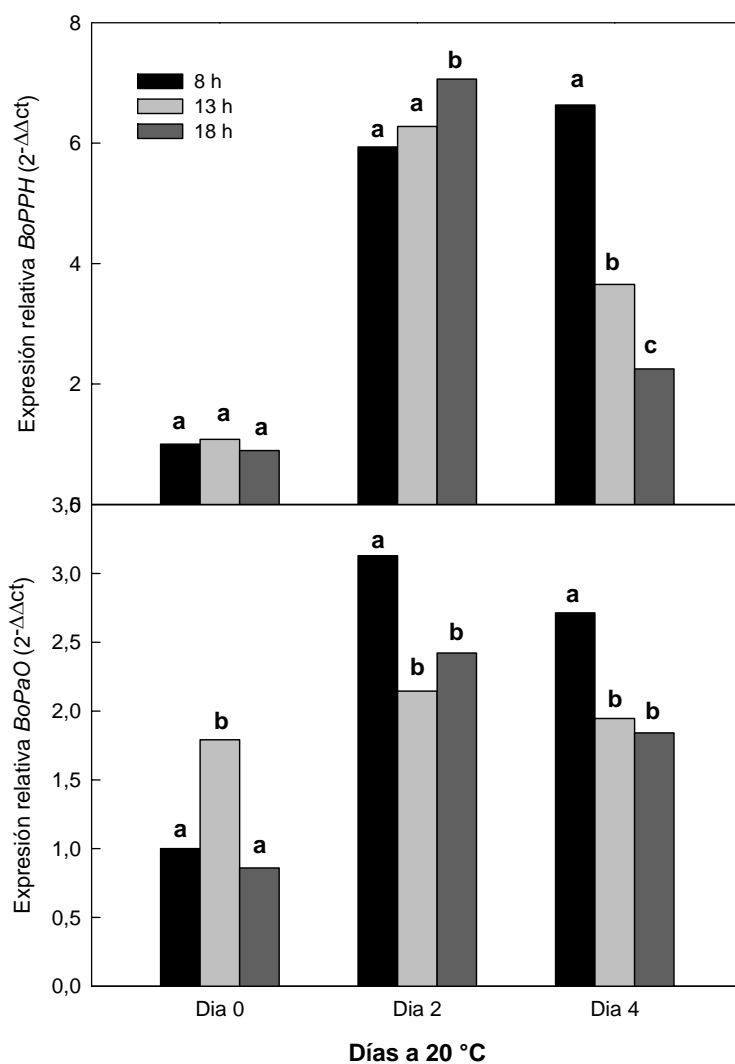


Figura 2.5. Expresión del gen *BoPaO* y *BoPPH* durante el período postcosecha en brócolis cosechados a las 8, 13 y 18 h. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Gomez-Lobato y col. (2011) observaron un aumento similar en la expresión de *BoPaO* durante la senescencia postcosecha de brócoli. Además, se detectó una fuerte correlación entre la degradación de clorofilas y la expresión de *BoPaO* en muestras sometidas a diferentes tipos de tratamientos que regulan la senescencia. En el presente trabajo, si bien el pico de expresión fue a las 48 h, en las muestras cosechadas a las 8 y las 18 h hubo un importante incremento en el contenido de ARNm de *BoPaO* a lo largo del período de almacenamiento, juntamente con el desarrollo de la senescencia.

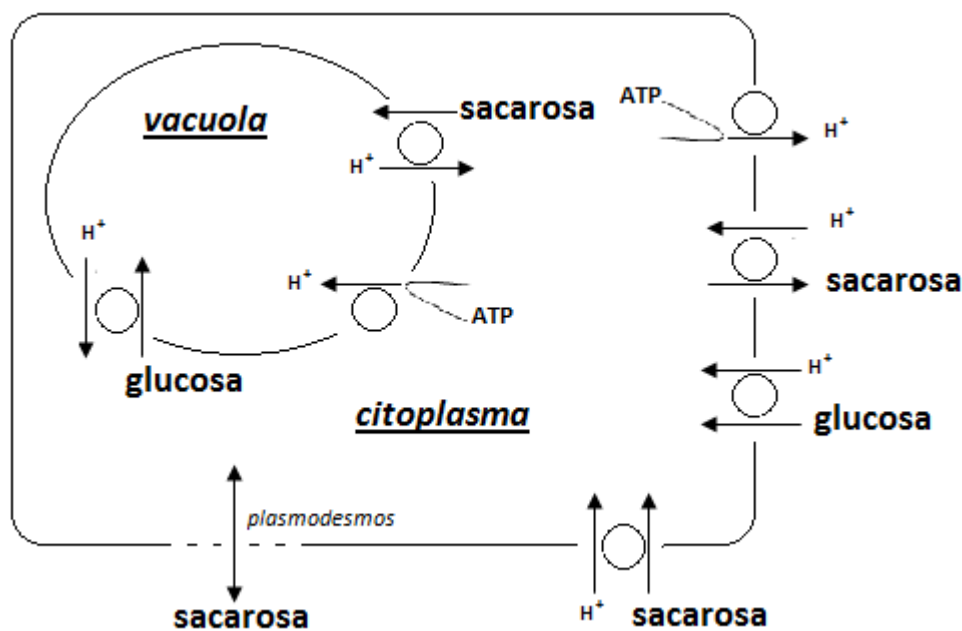
Tomando en conjunto los datos de expresión relativa de los genes que estarían más directamente relacionados con la degradación de clorofilas (*BoCLH2*, *BoPPH* y *BoPaO*), se puede observar que las muestras cosechadas a las 18 h mostraron un menor incremento de la expresión de estos genes durante la postcosecha respecto de aquellas obtenidas a las 8 h. La expresión de estos genes en las cabezas obtenidas al mediodía mostraron un comportamiento similar al de las muestras obtenidas a la mañana en algunos casos (Ej. expresión de *BoCLH2* al cuarto día) y similar a las muestras del atardecer en otros casos (Ej. expresión de *BoPaO* al segundo y cuarto día). Estos datos correlacionaron fuertemente con la degradación de clorofilas, es decir, se detectó mayor degradación en aquellas muestras que presentaron una expresión más elevada de estos genes.

Capítulo III:

Efecto del tratamiento con azúcares sobre la senescencia postcosecha de brócoli

i. Introducción

Un factor determinante en el desencadenamiento de la senescencia es el nivel de azúcar de los tejidos. Si la planta entera o algún órgano son sometidos a oscuridad se produce una disminución de la fotosíntesis y posterior 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 el proceso de senescencia y que esto se revierte en presencia de glucosa y otros azúcares (Fujiki y col., 2001).

El tratamiento con azúcares durante la postcosecha en diversas especies ha permitido corroborar el efecto retardante de estos compuestos sobre la senescencia y los diversos cambios organolépticos, fisiológicos y metabólicos que sufren los tejidos (Irving y Joyce, 1995; Coupe y col., 2003a; Gapper y col., 2005a; Ichimura y col., 2006).

Durante la senescencia, la fuente carbonada necesaria para la respiración y otros procesos metabólicos proviene principalmente de los hidratos de carbono, produciéndose una disminución del contenido de almidón y azúcares simples (Page y col., 2001). Asimismo, se ha detectado un descenso en el contenido de ácidos grasos

de membrana (Page y col., 2001), los que se utilizan como fuente carbonada. Si bien la utilización de ácidos grasos para obtener fuentes alternativas de energía parecen mejorar la supervivencia de las células o tejidos en cuestión ante condiciones de escasez de azúcares, finalmente resultan en daños irreversibles en las membranas y muerte celular (Yu, 1999). El aumento de la expresión de genes como los de las enzimas citrato y malato sintasa, fue asociado a una disminución en el contenido de azúcares (Graham y col., 1994, Coupe y col., 2002, Eason y col., 2007b). Estas enzimas juegan un rol clave en la provisión de carbono proveniente de la β -oxidación de ácidos grasos, conjunto de reacciones que ocurren en el denominado ciclo del glioxilato (Salisbury y Ross, 2000), el cual permite a las células utilizar como fuente de carbono compuestos carbonados simples cuando no están disponibles las fuentes de carbono más utilizadas, como los azúcares (Dieuaide y col., 1992).

La efectividad de ciertos tratamientos que retrasan la senescencia tales como las atmósferas controladas, fue asociada a la capacidad de mantener mayores niveles de azúcares durante los primeros momentos de la postcosecha (Eason y col., 2007b), y además, a una disminución en los niveles de expresión de los genes de la enzima citrato sintasa, necesaria en el metabolismo de ácidos grasos para su utilización como fuente de carbono (Eason y col., 2007b).

La acción del etileno, hormona inductora de la senescencia (Grbic y Blecker, 1995), también está relacionada con el nivel de azúcares de los tejidos. Se ha descrito que esta hormona es menos efectiva en tejidos con mayores niveles de hidratos de carbono respecto de los que poseen menores niveles (Rapaka y col., 2008). Nishikawa y col. (2005b) encontraron que tratamientos con sacarosa y con glucosa en brócolis luego de la cosecha si bien no disminuyeron los niveles de 1-aminociclopropano-1-acido carboxílico (ACC, precursor del etileno) ni la enzima ACC sintasa (ACS), observaron una menor expresión de ACC oxidasa (ACO) y un posterior retraso en el amarilleamiento respecto de las muestras tratadas con etileno, sugiriendo que estos tratamientos disminuyen la sensibilidad al etileno. En flores cortadas, la inmersión de los tallos en soluciones conteniendo sacarosa no sólo colabora en el mantenimiento energético de los órganos, sino que disminuye la sensibilidad al etileno y retrasa la senescencia (Eason y col., 1997; Ichimura y Suto, 1999; van Doorn, 2004; Verlinden y García, 2004).

Otro síntoma característico de la senescencia es un aumento de la proteólisis, fuertemente asociado a la expresión de genes codificantes de proteasas, enzimas que a su vez son inducidas por el etileno (Cervantes y col., 1994; Coupe y col., 2003b). Los genes de proteasas se expresan además ante diversos momentos de estrés como heridas (Linthorst y col., 1993) o luego del agotamiento de azúcares (Chevalier y col., 1995). Coupe y col. (2003b) encontraron una disminución en la expresión de genes de cisteína proteasas en brócolis sometidos a diferentes tratamientos, entre los cuales se mencionaron los tratamientos con sacarosa. Asimismo, regulando negativamente la expresión del gen *BoINV2* que codifica para la invertasa en brócoli, se detectó un descenso en el contenido de transcritos de cisteína proteasas, efecto similar producido por el tratamiento con sacarosa (Eason y col., 2005; Eason y col., 2007a), por lo que se sugirió que el nivel celular de carbohidratos podría significar una señal temprana de regulación de la senescencia (Eason y col., 2007a).

El deterioro tisular que ocurre durante la senescencia está acompañado de un aumento del contenido de radicales libres y un descenso de antioxidantes (Zimmermann y Zentgraf, 2005). Una de las sustancias clave en el mantenimiento del estado redox de la célula es el ascorbato, jugando un rol clave como antioxidante (Noctor y Foyer, 1998). Durante el almacenamiento postcosecha de brócoli se ha observado una disminución de los niveles de ascorbato (Nishikawa y col., 2005a). En brócoli, se ha detectado un aumento en el contenido de ácido ascórbico, sulforafano, glucosinolatos, fenoles totales y antocianinas en muestras tratadas con sacarosa (Guo y col., 2011). Por otro lado, en ensayos in vitro se detectó una mayor inhibición de radicales OH \cdot (ID₅₀) por parte de la sacarosa respecto de otros azúcares e incluso del glutatión, por lo que se propuso que en plantas la sacarosa podría ser un compuesto con capacidad antioxidante contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Van den Ende y Valluru, 2009).

Finalmente, en algunos casos se ha establecido el debate si la senescencia en hojas es inducida por la falta de azúcares o por su acumulación en un tejido. En *Arabidopsis* se describió un amarilleamiento acelerado, inducción de rutas de removilización del nitrógeno y expresión de genes característicos del desarrollo de la senescencia (como el *SAG12*) frente al suministro externo de glucosa (Pourtau y col.,

2006). Probablemente, una alta concentración de azúcares podría generar un efecto hiperosmótico que conduce a desencadenar la senescencia.

ii. Objetivo

Analizar el efecto del tratamiento con azúcares sobre la senescencia postcosecha de la inflorescencia de brócoli.

iii. Resultados y Discusión

Color superficial

Con el objeto de evaluar si el nivel de azúcares permite retrasar la senescencia durante el almacenamiento postcosecha de las cabezas de brócoli, se hicieron tratamientos sumergiendo los tallos de las inflorescencias en soluciones azucaradas de modo de asegurar un suministro continuo. Se probaron diversas concentraciones y se midieron los cambios del color superficial durante 4 días de almacenamiento a 20 °C.

Tabla 3.1. Cambios de color (*L**, *Hue*) en inflorescencias de brócoli tratadas con sacarosa 2, 10 y 15 %, y glucosa 2 y 10 %. Los asteriscos indican diferencias significativas

	Días a 20 °C			
	0	2	3	4
<i>L*</i> (LSD= 2,14)				
Control	34,43	38,18	40,82	43,95
Glucosa 2 %	34,43	38,20	40,80	43,66
Glucosa 10 %	34,43	37,82	40,05	43,09
Sacarosa 2 %	34,43	37,98	40,79	43,77
Sacarosa 10 %	34,43	38,08	40,03	42,99 *
Sacarosa 15 %	34,43	37,85	40,55	43,69
<i>Hue</i> (LSD= 1,79)				
Control	120,16	116,20	110,90	98,85
Glucosa 2 %	120,16	117,20	110,99	100,00
Glucosa 10 %	120,16	119,06 *	114,90 *	105,10 *
Sacarosa 2 %	120,16	117,95	112,79	102,89 *
Sacarosa 10 %	120,16	118,57	115,46 *	106,21 *
Sacarosa 15 %	120,16	117,26	111,12	100,25 *

Los resultados mostrados en la tabla 3.1 indican que los tratamientos con sacarosa y con glucosa al 10 % permitieron preservar el color verde (medido a través de un menor descenso del *Hue*) por más tiempo. Menores o mayores concentraciones no fueron efectivas probablemente por un suministro insuficiente o por un efecto hiperosmótico tóxico respectivamente. De acuerdo a estos resultados se eligió

sacarosa al 10 % y glucosa al 10 % para evaluar sus efectos sobre diversos aspectos de la senescencia postcosecha.

Contenido de clorofila a y b

El primer parámetro analizado fue el contenido de clorofilas. El suministro de azúcares retrasó la pérdida de clorofila *a* y *b* (figura 3.2, paneles a y b), aunque el efecto fue más marcado en aquellas muestras suministradas con la glucosa 10 % luego de dos y tres días de incubación.

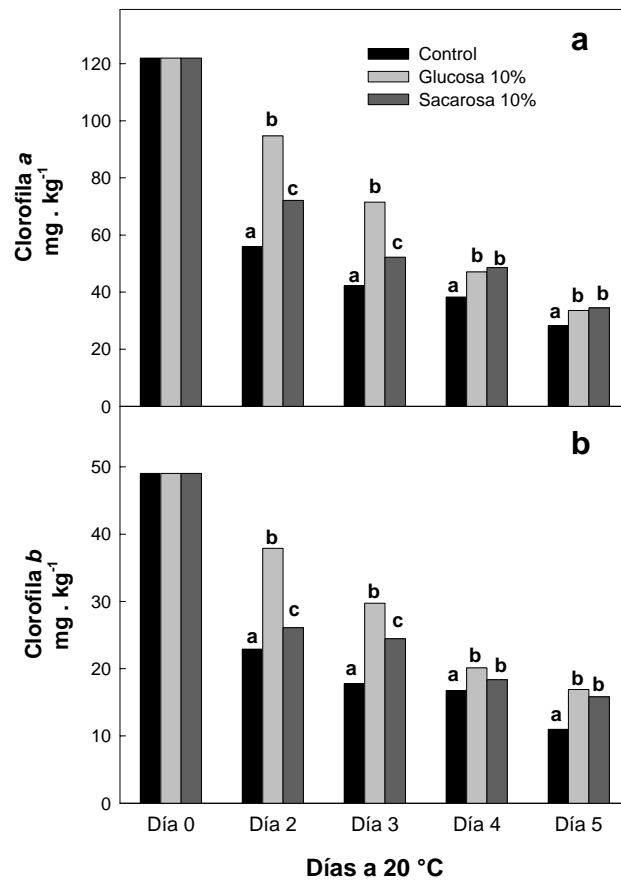


Figura 3.2. Cambios en el contenido de clorofila *a* (Panel a) y clorofila *b* (Panel b) de cabezas de brócoli durante el almacenamiento a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Se pudo observar una fuerte disminución del contenido de clorofila en los controles hacia el día 2, mientras que las muestras tratadas con glucosa 10%

mostraron una disminución gradual. Las muestras tratadas con sacarosa 10% presentaron un comportamiento intermedio hacia los días 2 y 3, mientras que hacia los días 4 y 5 se asemejó a las tratadas con glucosa.

Está demostrado que tratamientos con oscuridad, que conducen a un agotamiento de azúcares por ausencia de fotosíntesis, inducen la senescencia y degradación de clorofila (Matile y col., 1992). En estas condiciones se identificaron genes asociados a la senescencia (SAGs) (Fujiki y col., 2001), siendo algunos de estos reprimidos mediante la aplicación de azúcares (Chung y col., 1997; Noh y Amasino, 1999).

El etileno actúa regulando positivamente la senescencia en general y la degradación de clorofilas en particular. Sistemas tan diversos como brócoli o flores ornamentales sufren una aceleración de la senescencia a causa del etileno producido durante la postcosecha (Gapper y col., 2005b; Higgins y col., 2006; Huang y col., 2007). En brócoli particularmente, uno de los síntomas visuales es el amarilleamiento de la inflorescencia a causa de la degradación de clorofilas (Ku y Wills, 1999; Gapper y col., 2005a; Higgins y col., 2006). Este deverdizado correlaciona fuertemente con un aumento de la actividad de enzimas que degradan clorofilas, la cual es potenciada en presencia de etileno (Tian y col., 1997; Gong y Mattheis, 2003). Asimismo, el nivel de la expresión de genes que degradan clorofilas (*BoPPH*, *BoPaO*) es aumentado aún más por acción de esta hormona (Gómez-Lobato y col., 2011; Zhang y col., 2011).

Por otro lado, estudios llevados a cabo en inflorescencias de brócoli y en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) mostraron que el incremento interno del nivel de carbohidratos mediante el suministro de sacarosa resultó en una disminución de la respuesta al etileno (Verlinden y Garcia, 2004; Nishikawa y col., 2005b). En este sentido, resultó llamativo que sacarosa y glucosa puedan aumentar la de síntesis de etileno en brócoli a través de un aumento del contenido de ACC y de la actividad de ACC sintasa, aunque la sensibilidad al etileno se vio disminuida en las muestras mantenidas con sacarosa (Nishikawa y col., 2005b). Yanagisawa y col. (2003) demostraron que altos niveles de glucosa aumentaron la degradación de *EIN3* (*ethylene insensitive 3*), un regulador transcripcional clave de la cascada de señales del etileno. Tomando estos datos en conjunto, se podría sugerir que el tratamiento de las cabezas con azúcares disminuye la sensibilidad del tejido al etileno, lo que a su vez

evita el aumento de la expresión de los genes y actividad de enzimas asociadas a la degradación de clorofilas.

Contenido de azúcares solubles

Durante la senescencia, el brócoli sufre una importante disminución del contenido de azúcares solubles (Downs y col., 1997; Pogson y Morris, 1997). En nuestro caso, se pudo observar una disminución de los niveles de azúcares totales, en todas las muestras luego de dos días de almacenamiento (figura 3.3, panel a).

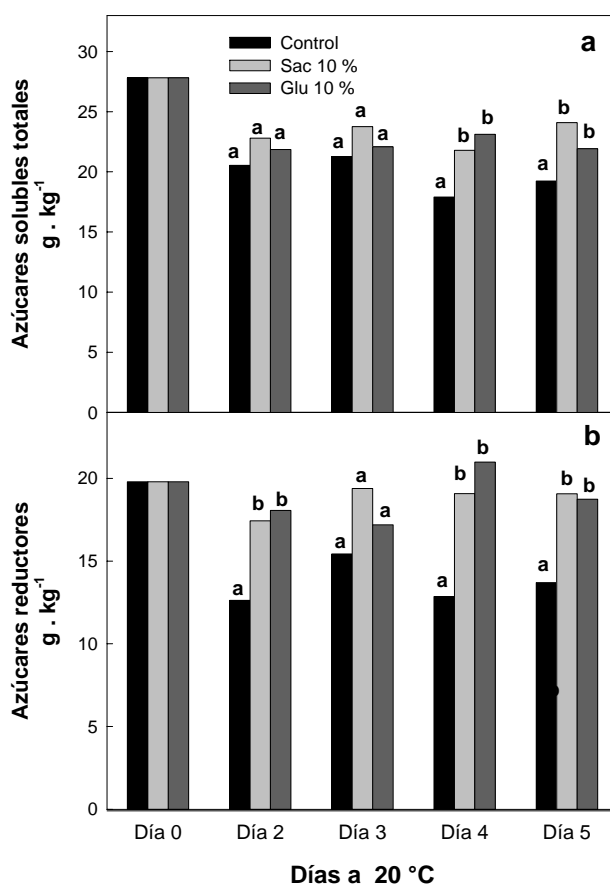


Figura 3.3. Cambios en el contenido de azúcares totales (Panel a) y reductores (Panel b) durante el almacenamiento de las cabezas de brócoli a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Tal reducción continuó en los controles hasta el día 4 pero no se detectó en las cabezas tratadas tanto con glucosa 10 % como con sacarosa 10 %. Como consecuencia,

hacia el final del período de incubación las muestras tratadas con sacarosa o glucosa fueron las que tuvieron niveles más altos de azúcares totales. En el caso de azúcares reductores, se detectó una disminución en los controles luego de dos días. Posteriormente, los niveles de azúcares reductores se mantuvieron casi constantes hasta el final del almacenamiento. A diferencia de los controles, las muestras tratadas no mostraron dicha reducción y mantuvieron el contenido de azúcares reductores en valores similares a los iniciales durante los cinco días de almacenamiento (figura 3.3, panel b). Dado que las muestras tratadas fueron las que mayores niveles de azúcares solubles tuvieron, sumado a que fueron las que mostraron mayores contenidos de clorofila, estos datos refuerzan la idea de que uno de los factores que influyen en el inicio de la senescencia del brócoli luego de la cosecha estaría relacionado al estatus de azúcares solubles.

Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales

Los compuestos fenólicos son conocidos como factores importantes en la actividad antioxidante de las plantas (Kim y col., 2006; Oh y Rajashekar, 2009). En el presente trabajo se evaluó el poder antioxidante y el contenido de fenoles totales en las muestras sometidas a tratamientos con azúcares. A lo largo del período de almacenamiento, en los controles hubo una paulatina disminución en el poder antioxidante y en el nivel de fenoles totales, mientras que en las muestras tratadas con azúcares ambos niveles se mantuvieron o aumentaron (figura 3.4, paneles a y b). Hasta el día 3, las cabezas tratadas con azúcares mostraron niveles de antioxidantes similares a los controles, pero luego de ese período fueron mayores respecto de las muestras sin tratar. En el caso de los compuestos fenólicos, el patrón de respuesta fue similar (figura 3.4 panel b), indicando la alta correlación entre estos compuestos y la capacidad antioxidante del brócoli. Trabajos previos también habían mostrado que aplicaciones de sacarosa en brócoli incrementan significativamente el contenido de polifenoles, ácido ascórbico, glucosinolatos y aún la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), considerada clave en la biosíntesis de polifenoles (Guo y col., 2011).

Asimismo, en brócolis sometidos a tratamientos con sacarosa se observó una disminución de la pérdida de ascorbato y un aumento en la expresión de genes relacionados a su biosíntesis, por lo que se sugirió que el efecto de la disminución de azúcares durante la postcosecha conduciría a un daño en la biosíntesis de ascorbato y un consecuente daño en el sistema supresor de peróxido de hidrógeno en cloroplastos (Nishikawa y col., 2005a). Del mismo modo, Coupe y col. (2003a) sugirieron que la pérdida de sacarosa en brócoli y espárrago luego de la cosecha es uno de los eventos clave en las reacciones de señalización que controlan la expresión de ciertos genes durante la senescencia, entre ellos los relacionados con el metabolismo del ascórbico.

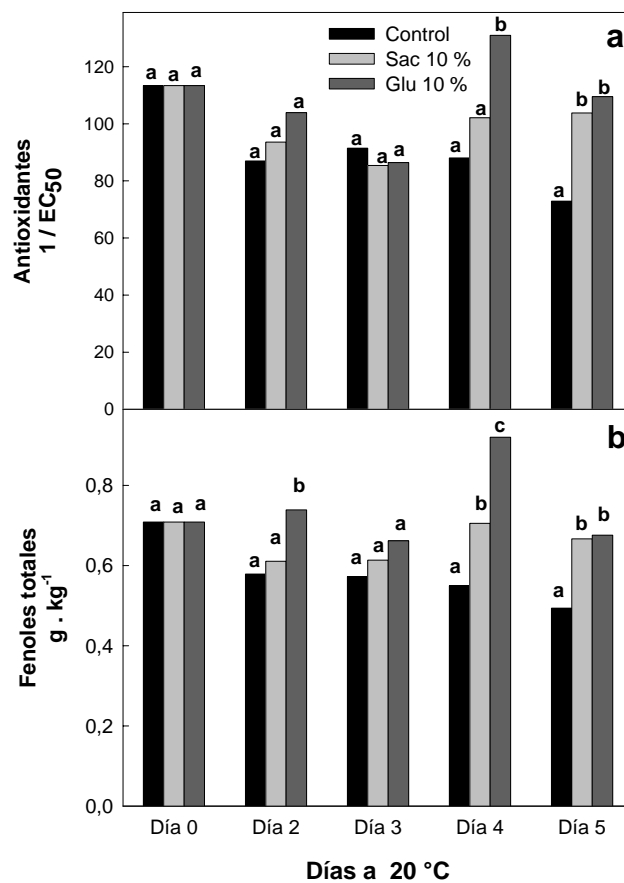


Figura 3.4. Cambios en el poder antioxidante total (EC₅₀⁻¹) y fenoles totales en cabezas de brócoli durante el almacenamiento a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Estos resultados corroboran la existencia de un efecto retardante de los azúcares en la senescencia postcosecha de brócoli. El suministro externo durante el almacenamiento de sacarosa o glucosa mantuvo más altos niveles de azúcares totales

y reductores, lo que pudo retrasar la degradación de clorofila y el cambio de color, así como mantener niveles de antioxidantes más altos. Resultados similares obtuvieron Irving y Joyce (1995) con aplicaciones de sacarosa en brócoli luego de la cosecha, donde observaron un retraso en el amarilleamiento, sugiriendo a la sacarosa como un factor discreto de senescencia, independiente de otros factores como las citocininas.

En conclusión, el suministro exógeno de azúcares solubles puede imitar la contribución endógena del almidón y por lo tanto retrasar la senescencia, lo cual podría ocurrir a través de una disminución de la sensibilidad al etileno y/o un mantenimiento del nivel de antioxidantes (fenoles y ácido ascórbico) tal como ha sido descrito previamente (Nishikawa y col., 2005). Estos resultados concuerdan con aquellos mostrados en el capítulo I, donde se sugirió que las muestras cosechadas hacia el final del día, al tener un mayor contenido de almidón mantienen niveles de azúcares simples elevados durante más tiempo, lo que a su vez causa una menor velocidad de senescencia.

Capítulo IV:

Análisis de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de almidón y sacarosa

i. Introducción

Enzimas asociadas a la degradación de azúcares en la senescencia

Degradación de sacarosa

Las hojas de brócoli, al igual que la mayor parte de las plantas superiores, usan sacarosa, un disacárido compuesto por glucosa y fructosa, como fuente más importante de transporte de carbono. La utilización de la sacarosa por parte de la planta, depende de su hidrólisis en las unidades de hexosa. Esta reacción es catalizada por dos enzimas, la sacarosa sintasa y la invertasa.

La invertasa es una hidrolasa que cliva la sacarosa en los dos monosacáridos en una reacción irreversible de hidrólisis generando fructosa y glucosa, y es considerada clave en el metabolismo y regulación del transporte de sacarosa en las plantas (Koch, 1996). En general, las plantas superiores contienen una familia de invertasas, las cuales se pueden discriminar en tres tipos de enzimas: vacuolares, citosólicas (ambas solubles) y pertenecientes a la pared celular (insolubles) (Tymowska-Lalanne y Kreis, 1998). Las invertasas vacuolares y de pared celular están glicosiladas, lo que les confiere mayor estabilidad, pudiendo ser el control de su actividad dependiente de mecanismos postraduccionales, vía inhibidores de invertasa (Rausch y Greiner, 2004). Entre las invertasas solubles están la ácida vacuolar que tiene su máxima actividad entre pH 4,5 y 5,5, la invertasa neutra y la alcalina, con actividades máximas a pH 6,8 y 8 respectivamente (Lee y Sturm, 1996). La invertasa ácida de pared, insoluble, posee valores óptimos de pH entre 4,5 y 5,5 (Jin y Ruan, 2009). Las invertasas ácidas son β -fructofuranosidasas dado que también hidrolizan otros azúcares que contienen β -fructosa como la rafinosa y la estaquiosa, mientras que las invertasas neutras y alcalinas sólo hidrolizan sacarosa (Sturm y col., 1999). Las hexosas resultantes de la hidrólisis de la sacarosa a su vez podrían jugar un rol en el proceso de señalización y control de la expresión de los genes de la invertasa (Roitsch y col., 2000).

Las invertasas poseen valores de Km inferiores a los de la sacarosa sintasa por lo que se ha sugerido como la primer enzima responsable del catabolismo de sacarosa y con mayor influencia en las variaciones de la relación azúcares reductores/sacarosa (Schaffer y col., 1987). Las invertasas han sido asociadas también a un papel como

reguladores de la cantidad de sacarosa durante la senescencia (Eason y col., 2007a; Coupe y col., 2003a; Hurst y col., 1996; McKenzie y col., 2004). En brócoli se ha descrito un incremento en la actividad de la invertasa ácida soluble durante la senescencia (Coupe y col., 2003a). Asimismo se detectó mayor actividad en brócolis almacenados en seco respecto de otros almacenados luego de una inmersión en agua con azúcares o en atmósfera controlada (Coupe y col., 2003a). En ese marco, se detectó un incremento y acumulación de ARNm de los genes de expresión de invertasas *BoINV1* y *BoINV2*, el cual se retrasó en brócolis tratados con sacarosa o almacenados en condiciones de bajo contenido de O₂ y/o alto CO₂ (Rothan y col., 1997; Zeng y col., 1999; Coupe y col., 2003a; Hurst y col., 1996).

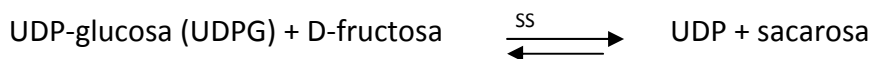
Estudios realizados en brócoli en los que se llevó a cabo el silenciamiento de genes que codifican para invertasa mostraron un menor descenso en el contenidos de azúcares totales y mayor retención del color verde, reflejado por el retraso de la caída de los valores de Hue (Eason y col., 2007a). En contraposición a la idea de la relación positiva entre actividad invertasa y senescencia, Jin y col. (2009) encontraron en hojas de tomate que silenciando el inhibidor de invertasa de pared *INVINH1* se elevó la actividad de dicha enzima y simultáneamente se detectó un retraso de la senescencia inducida por ácido abscísico.

La enzima Sacarosa Sintasa (SS) también degrada sacarosa aunque por un mecanismo distinto que la invertasa. Es una glicosiltransferasa ubicada en el citoplasma de la célula, que en presencia de uridina 5'-difosfato (UDP), hidroliza la sacarosa originando UDP-glucosa (UDPG) y fructosa (Schaffer, 1986). Fue mencionada además como la enzima predominante en el metabolismo de la sacarosa y de la síntesis de almidón en tomate (Wang y col., 1993). Se ha estudiado también la existencia de sacarosa sintasa asociada a la membrana plasmática en complejos con β -glucano sintasas a la cual se le asignó un potencial rol en la síntesis de celulosa y calosa mediante la canalización del carbono desde la sacarosa hacia los glucanos (Amor y col., 1995).

Esta enzima se encuentra en todos los tejidos de las plantas, aunque se detectaron mayores niveles en tejidos que funcionan como sumidero de sacarosa (Avigad, 1982).

Muñoz y col. (2005) asignaron también a la sacarosa sintasa un importante papel en el proceso de síntesis de almidón transitorio en hojas de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum tuberosum* mediante la canalización del UDP-glucosa desde la sacarosa al almidón, proceso que disminuyó durante la noche debido a la caída del contenido de sacarosa, por lo que se presumió que tanto el UDP-glucosa como el patrón de acumulación de almidón están determinados por la disponibilidad de sacarosa como por la actividad de la sacarosa sintasa.

La ruta de degradación de sacarosa mediante la sacarosa sintasa, requiere la mitad de la energía necesaria que la ruta de la invertasa y podría ser favorecida en diversas condiciones (Black y col., 1987). La enzima también cataliza la reacción en el sentido inverso, es decir de síntesis de sacarosa, utilizando UDP-glucosa y fructosa como sustratos:



En numerosas especies vegetales se han observado valores de Km menores para UDP que para el UDPG, lo que sugiere que la actividad de la sacarosa sintasa in vivo es generalmente en dirección de hidrólisis de sacarosa más que en dirección de síntesis (Suzuki y col., 1996). Respecto de los valores de pH óptimos de la enzima para la síntesis de sacarosa se encontraron en el rango de 8 a 9 para distintas isoenzimas, mientras que de 6 a 7 para la hidrólisis (Suzuki y col., 1996).

En lo que respecta al rol de la enzima en la fisiología del vegetal, se entiende que para las células de la planta sería un gran inconveniente, incluso fatal, iniciar procesos vitales sin un suministro de sacarosa, por lo que deben existir mecanismos moleculares reguladores de la concentración de sacarosa más que la acción directa de ésta en el metabolismo intermediario. A diferencia de los animales, en las plantas el suministro translocado de sacarosa no está finamente regulado, variando en varias órdenes de magnitud entre células. Dada esa situación, Black y col. (1995) postularon que cada célula de la planta es capaz de detectar cuantitativamente a la sacarosa y responder a su estímulo. Debido a la variación en la actividad sacarosa sintasa según el nivel de sacarosa en el destino (lo que no ocurría con la actividad invertasa), propusieron a la sacarosa sintasa como un marcador de la fuerza del destino.

Degradación de almidón

El almidón es el polímero de reserva de azúcares en las plantas por excelencia. Las moléculas de almidón son polímeros de glucosa en dos configuraciones: amilosa, que es mayormente lineal, y amilopectina, la cual es ramificada y representa normalmente al menos un 70% del peso seco del almidón (Smith, 2001). La amilosa está constituida predominantemente por enlaces glucosil α -1,4, mientras que la amilopectina contiene ambas uniones α -1,4 y α -1,6, siendo estas últimas las que hacen que la molécula sea ramificada. Las ramificaciones de las moléculas de amilopectina se aglomeran ordenadamente y forman gránulos de almidón semicristalinos insolubles (Smith, 2001; Grennan, 2006).

En los tejidos fotosintéticos, el almidón se acumula en forma transitoria en los cloroplastos durante las horas de luz por acción de la fotosíntesis. Sin embargo, para períodos largos, el almacenamiento se realiza en los amiloplastos en los tejidos de reserva (Asatsuma y col., 2005). En horas de oscuridad, el almidón transitorio se degrada liberando unidades de glucosa y maltosa, que luego son exportadas al citosol para ser usados tanto de fuente de energía como para la síntesis de sacarosa. Los azúcares derivados de la fotosíntesis son transportados vía floema a los órganos destino, donde podrá sintetizarse y almacenarse almidón de reserva.

Aunque a la α -amilasa se le ha asignado un importante rol en la degradación del almidón en endosperma de cereal y hojas de arroz, actuando tanto sobre los gránulos insolubles de almidón como el almidón soluble y rindiendo glucosa, maltosa y dextrinas (Asatsuma y col., 2005), en hojas de *Arabidopsis* parece no tener un rol esencial (Yu y col., 2005). La α -amilasa se requiere para la iniciación de la degradación del almidón durante la germinación de cereales, pero no es requerida para la degradación normal de almidón transitorio en hojas. El genoma de *Arabidopsis* presenta tres genes codificantes para α -amilasas (*AtAMY1*, *AtAMY2*, y *AtAMY3*). Se ha mostrado que el almidón es degradado normalmente aun cuando los tres genes *AtAMY* son interrumpidos (mutantes *knock out*), lo que indicaría que las α -amilasas serían prescindibles en dicho proceso (Yu y col., 2005). Por ello, se ha propuesto otro mecanismo para explicar la degradación inicial del almidón: la fosforilación previa del gránulo por una enzima fosfotransferasa, la GWD (*glucan water dikinase*), lo que permitiría la acción de la β -amilasa sobre las cadenas de amilopectina sin el paso

(producida por acción de la β -amilasa) y glucosa (producida por la acción de la *DPE1*) (Grennan y col., 2006). Posteriormente, como la glucosa no puede migrar como tal de la célula por poseer un grupo aldehído libre susceptible de ser oxidado, se sintetiza sacarosa y de ese modo es transportado hacia el destino fuera de la célula (figura 4.1).

Tratamientos postcosecha

Tal como se mencionó previamente, el brócoli es un producto altamente perecedero por tratarse de una inflorescencia y como tal, poseer una alta tasa respiratoria, sumado a la senescencia acelerada ocasionada por la cosecha. La mayoría de los tratamientos postcosecha tienen como objetivo central retrasar esta senescencia tomando como principal parámetro de calidad la pérdida de color verde. Los dos métodos más ampliamente difundidos son refrigeración (Pogson y Morris, 1997) y atmósferas modificadas (Makhlouf y col., 1989; Barth y col., 1993). También se ha descrito la posibilidad de utilizar 1-metilciclopropeno (1-MCP), un bloqueador selectivo de los receptores de etileno, como tratamiento postcosecha (Fan y Mattheis, 2000). Estos tratamientos disminuyen la síntesis o bloquean la acción del etileno y retrasan la pérdida de clorofilas. Más recientemente se han comenzado a evaluar otros métodos físicos tales como tratamientos térmicos, radiación UV-C y radiación UV-B como posibles tratamientos postcosecha, tanto individuales (Costa y col., 2006; Lemoine y col., 2007) como combinados (Pan y col., 2004; Murray y col., 2007). En general, estos tratamientos causan un estrés leve en el material sin provocar un daño irreversible, del cual se puede recuperar permitiendo al tejido mejorar su respuesta frente a nuevas situaciones de estrés tales como las que desencadenan la senescencia (Lurie, 1998; Lemoine y col., 2007). En brócoli, estos tratamientos han sido efectivos para retrasar la senescencia causando una menor degradación de clorofilas y permitiendo almacenar las muestras por tiempos más prolongados (Costa y col., 2005a; Costa y col., 2006; Aiamla-or y col., 2010).

Del mismo modo, los tratamientos con atmósferas controladas o modificadas reducen sustancialmente la senescencia, retrasando la degradación de clorofilas y disminuyendo la actividad respiratoria (Coupe y col., 2003b).

En el caso de tratamientos térmicos, se demostró que los mismos retrasan el comienzo de la degradación de clorofilas y disminuyen la velocidad del proceso. El

tratamiento provoca un retraso en el aumento de la acumulación de feofitinas, de la actividad de las enzimas involucradas en el catabolismo de clorofilas (Funamoto y col., 2002, Costa y col., 2006; Funamoto y col., 2006) y en la expresión de los genes correspondientes (Büchert y col., 2011b). Los brócolis tratados térmicamente también muestran una menor pérdida de sacarosa y de proteínas (Tian y col., 1997), así como una menor producción de etileno, debido tanto a una menor actividad de la ACS (Antunes y Sfakiotakis, 2000) como también a menores niveles de expresión de genes de síntesis de etileno (Suzuki y col., 2005). Por otro lado, estos tratamientos causan una menor actividad respiratoria, mayor nivel de antioxidantes y menor producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, causando a su vez una menor oxidación de lípidos y mayor mantenimiento de la integridad de las membranas (Costa y col., 2005a).

En otro orden, los tratamientos con 1-MCP retrasan la senescencia en brócoli a través de una inhibición de la actividad de las enzimas y expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de etileno (Ma y col., 2009), debido a que se inhibe la percepción. Asimismo, estos tratamientos reducen el amarilleamiento (Able y col., 2002) y el deterioro postcosecha a través de una inhibición de la actividad polifenoloxidasas y lipoxigenasa y un mantenimiento de los niveles de ácido ascórbico (Yuan y col., 2010).

ii. Objetivos

- a) Estudiar el efecto del momento de la cosecha a lo largo del día sobre los cambios de actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de azúcares: invertasa, sacarosa sintasa y β -amilasa.
- b) Estudiar el efecto de tratamientos postcosecha con atmósfera modificada (AM), tratamientos térmicos (TT) y con 1-metilciclopropano (1-MCP) sobre la actividad de las enzimas mencionadas en el punto anterior.

iii. Resultados y discusión

Contenido de azúcares y actividades invertasa, sacarosa sintasa y β -amilasa en brócolis cosechados a distintas horas del día

Contenido de azúcares

La inflorescencia de brócoli se encuentra en pleno desarrollo al momento de la cosecha, la cosecha interrumpe el flujo de nutrientes deviniendo rápidamente la senescencia y disminuyendo los niveles de azúcares simples.

La fisiología postcosecha normal del brócoli se caracteriza por una rápida pérdida de sacarosa (Downs y col., 1997; Tian y col., 1997; McKenzie y col., 2004). Se ha propuesto que ello podría a su vez incrementar la expresión de genes asociados a la senescencia, como los de ACC oxidasas, β -galactosidasas y asparagina sintetasas (Downs y col., 1997).

En el presente trabajo se midieron los azúcares mediante HPLC y se observó una disminución de su contenido durante el período postcosecha en todas las muestras. Al día inicial no se detectaron diferencias en el contenido de azúcares entre las muestras cosechadas a diferentes horas, aunque sí durante el almacenamiento, siendo las muestras cosechadas a las 18 h las que menor descenso mostraron (figura 4.2). El mayor contenido de glucosa en las muestras de las 18 h tanto al día 2 como al día 4 pudo deberse al mayor contenido de almidón que presentaron al día inicial (ver capítulo I), dado que el mismo es hidrolizado rápidamente luego de la cosecha (King y Morris, 1994; Tian y col., 1997; McKenzie y col., 2004).

Respecto del contenido de sacarosa, al día 2 las muestras cosechadas a las 12 y 18 h tuvieron mayor contenido respecto de las muestras cosechadas a las 8 h. La hidrólisis de la sacarosa pudo ser la causa de que el contenido de glucosa y fructosa en las muestras de las 8 h sea similar a las muestras de las 12 y 18 h.

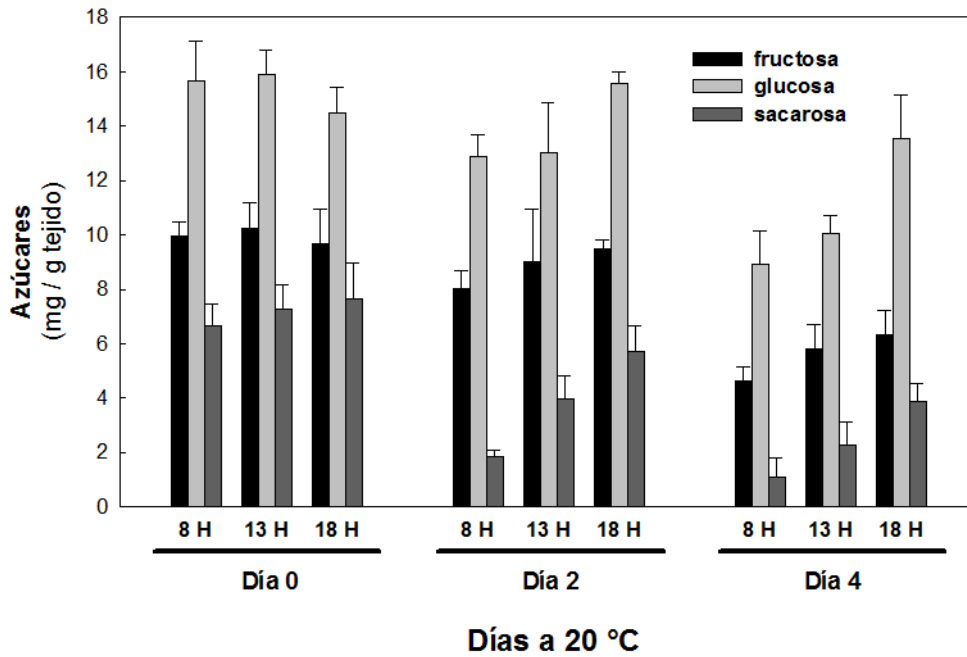


Figura 4.2. Contenido de azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) durante el almacenamiento de brócoli a 20 °C.

Actividad invertasa

Se analizó la actividad invertasa en las muestras cosechadas en distintos momentos del día. La actividad inicial en las muestras cosechadas a las 13 y a las 18 h fue mayor respecto de aquellas cosechadas a las 8 h (figura 4.3). Un comportamiento similar fue descrito por Nägele y col. (2010), donde se reportó una fluctuación diurna con un máximo de actividad hacia el mediodía y disminuyendo hasta el final de la noche. Es posible que durante las horas de oscuridad, al haber menor contenido de sacarosa debido a la imposibilidad de continuar con la fotosíntesis, haya mayor influencia de la acción de los inhibidores de invertasa (*INVINHs*), cuya acción es atenuada por la presencia de sacarosa (Bate y col., 2004). En otro orden, da Silva y col. (2003) observaron un aumento de la actividad invertasa en hojas de *Coffea arabica* L. sometidas previamente a un período de oscuridad y a las cuales se les aumentó el nivel interno de sacarosa mediante aplicación externa, no ocurriendo lo mismo con las muestras en oscuridad a las cuales no se les proveyó de sacarosa. Aunque los cambios en la actividad invertasa pudieran deberse a regulaciones mediadas por inhibidores, los mecanismos moleculares de dicha inhibición no son aún del todo comprendidos y

parecieran requerir de mecanismos adicionales a los de la represión transcripcional (Rausch y Greiner, 2004). No obtuvieron similar resultado Slack (1964) y Kim y col. (2000), quienes encontraron un máximo de actividad invertasa hacia el inicio del período de luz y un mínimo hacia el final del mismo.

En todos los casos del presente ensayo se observó una disminución de la actividad desde la cosecha hasta el quinto día postcosecha. Una alta actividad de la enzima en todas las muestras luego de la cosecha puede ser consecuencia del estrés provocado por el corte, lo cual lleva a una alta demanda de hexosas para cumplir con los requerimientos de energía y carbono necesarios para una adecuada respuesta. Un comportamiento similar se observó en ensayos en raíces de zanahoria donde se produjo un aumento en la expresión y actividad de invertasa luego de producir cortes en dichas raíces (Sturm y Chrispeels, 1990).

La actividad invertasa disminuyó durante el almacenamiento a 20 °C en todas las muestras, y si bien el contenido de sacarosa, que también disminuyó, siguió siendo mayor en los materiales de las 12 y las 18 h, no se detectaron diferencias entre las distintas cosechas en la actividad invertasa aún hasta el quinto día de almacenamiento (figura 4.3 a).

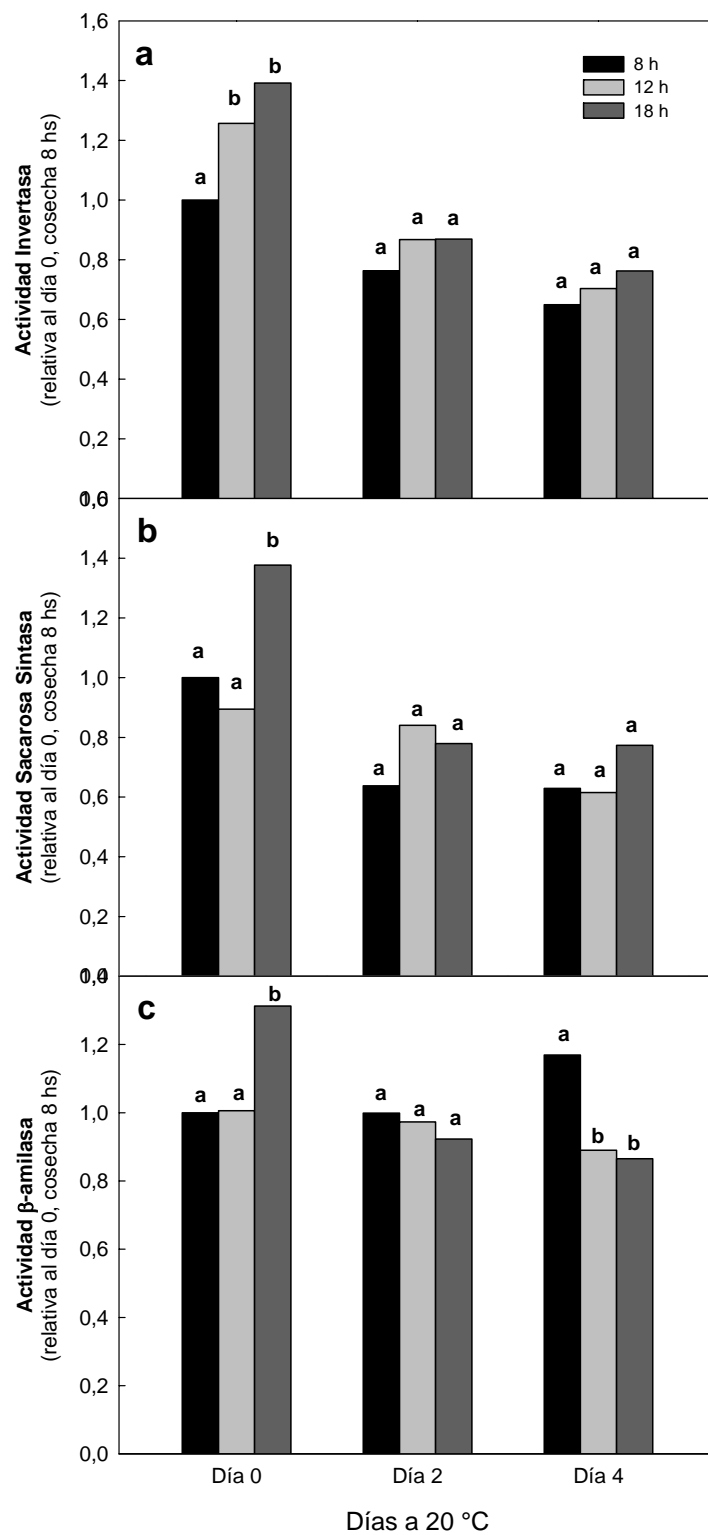


Figura 4.3. Actividad invertasa (a), Sacarosa Sintasa (b) y β -amilasa (c) durante el almacenamiento a 20 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

Actividad sacarosa sintasa

En el caso de sacarosa sintasa, además de su potencial rol en la carga del floema, el clivaje de la sacarosa catalizado por la sacarosa sintasa provee de UDP-glucosa el cual puede ser utilizado en las vías de biosíntesis tanto de pared celular como de almidón en órganos destino (Doehlert y Kuo, 1990; Hendrix 1990; Martin y col., 1993; Wang y col., 1993; Muñoz y col., 2005). El hecho de que estén asociados la actividad sacarosa sintasa y la síntesis de almidón, y luego de haber encontrado mayores niveles de almidón en los materiales de las 18h (ver capítulo I), ello podría explicar en parte la mayor actividad de la sacarosa sintasa en dichos materiales hacia el día de la cosecha (D0) (figura 4.3 b).

Si bien al día inicial hubo diferencias en la actividad entre las muestras cosechadas a diferentes horas, durante el almacenamiento se observó un descenso de la actividad en todas las muestras, esperable dada la disminución en las reservas de fotoasimilados. A pesar de que las muestras de las 18 h presentaron mayores niveles de sacarosa hasta el día 4 y de almidón hasta el día 2 (luego del cual ya no se detectó), hacia el final del período de almacenamiento no hubo diferencias en la actividad sacarosa sintasa entre las muestras cosechadas en distintos momentos del día (Figura 4.3 b).

Actividad β -amilasa

Durante el día, el almidón se sintetiza en los cloroplastos mediante la fotosíntesis y se degrada durante el subsecuente período nocturno, proveyendo un continuo suministro de azúcares para sostener el metabolismo foliar y además exportar a los órganos destino durante ese período (Zeeman y col., 2007). Entre las enzimas involucradas en el proceso, la β -amilasa posee un papel clave (Orzechowski 2008). En el presente ensayo, se observó que la actividad β -amilasa en el día de la cosecha fue mayor en las muestras cosechadas a las 18 h. Estas muestras fueron las que más tiempo estuvieron expuestas a la luz, condición que les resultó favorable para acumular una mayor cantidad de fotoasimilados respecto de los materiales

cosechados a la mañana temprano, dato reflejado en los mayores contenidos de almidón en los materiales de las 18 h (ver capítulo I).

Numerosos trabajos dan cuenta de la importancia de la presencia de mayores cantidades de almidón y sacarosa para aumentar la expresión y la actividad de la enzima β -amilasa en diferentes órganos de la planta, y en diferentes especies (Sharma y Shopfer 1987; Nakamura y col., 1991; Mita y Col., 1995), estando además la degradación del almidón regulada por el ritmo circadiano (Lu y col., 2005).

Durante los subsiguientes días de almacenamiento se detectó un paulatino descenso en la actividad β -amilasa en todas las muestras cosechadas a las diferentes horas, pudiendo estar ello relacionado al pronunciado descenso en el contenido de almidón observado en dichas muestras. Sin embargo, hacia el día 4 se notó una mayor actividad en las muestras cosechadas a las 8 h (figura 4.3 c). En este momento de la postcosecha ninguna de las muestras presenta contenidos de almidón detectables (ver capítulo I).

Efecto de distintos tratamientos postcosecha sobre el contenido de azúcares y actividades invertasa, sacarosa sintasa y β -amilasa durante el almacenamiento postcosecha.

Desarrollo del color superficial

Luego de la cosecha, se realizaron tres tipos de tratamientos: atmósferas modificadas (AM), tratamiento térmico (TT) y tratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP). Posteriormente, las muestras se almacenaron a 20 °C durante 4 días, período durante el cual se midió el color superficial para evaluar la efectividad de dichos tratamientos. Las muestras utilizadas como controles se deterioraron más rápidamente, comenzando a perder el color verde (dato reflejado en una disminución del ángulo Hue) y amarillarse (dato reflejado en el parámetro de luminosidad L^*) desde el segundo día de almacenamiento (tabla 4.1). Se detectó un menor descenso de Hue y menor aumento de L^* en aquellas muestras sometidas a los tres tratamientos postcosecha ensayados (AM, TT, y 1-MCP), siendo el tratamiento de AM el que mostró más eficacia en el mantenimiento de las cualidades visuales del brócoli, cuyas

muestras exhibieron alta coloración verde hacia el final del período de almacenamiento y un retraso significativo en el amarilleamiento (tabla 4.1). Estas muestras presentaron además una mayor turgencia en los tejidos (datos no mostrados).

El tratamiento térmico retrasa el amarilleamiento probablemente por una disminución de la actividad de enzimas involucradas en la degradación de clorofila, tales como peroxidasa (Tian y col., 1997; Funamoto y col., 2002; Funamoto y col., 2003; Costa y col., 2006), clorofilasa (Funamoto y col., 2002) y Mg-dequelatasa (Costa y col., 2006), así como la expresión de genes de feofitinas (Büchert y col., 2011b). Asimismo, estos tratamientos disminuyen la actividad de las enzimas involucradas en la producción de etileno, cuyo rol es también determinante en el amarilleamiento del brócoli (Tian y col., 1997).

En el presente trabajo, las muestras tratadas térmicamente se mantuvieron verdes más tiempo que los controles aún al cuarto día de almacenamiento a 20 °C, aunque en menor medida que los almacenados en AM.

Tabla 4.1. Cambios en los valores de L^* y Hue de muestras de brócoli sometidas a distintos tratamientos postcosecha. AM: atmósfera modificada; TT: tratamiento térmico; 1-MCP: 1-metilciclopropeno; C: control sin tratar. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

	Días a 20 °C		
	0	2	4
L^* (LSD=2.14)			
AM	41,95 a	43,08 ab	45,08 bc
TT	41,95 a	41,65 a	48,26 d
1-MCP	41,95 a	41,18 a	49,57 d
Control	41,95 a	46,92 c	65 e
Hue (LSD=1.79)			
AM	125,7 ed	126,8 ed	129,6 f
TT	125,7 ed	124,9 ed	124,4 dc
1-MCP	125,7 ed	126,4 ed	122,3 c
Control	125,7 ed	119,6 b	101,99 a

Las muestras tratadas con 1-MCP mostraron un ritmo de amarilleamiento similar a las muestras tratadas térmicamente, manteniéndose más verdes que los controles al día 4 de almacenamiento (tabla 4.1). Si bien hacia el quinto día de almacenamiento mostraron valores de L^* más altos que los tratamientos con atmósfera modificada, los materiales tratados con 1-MCP iniciaron el amarilleamiento recién hacia el tercer día y a un ritmo menor que los controles. Como en el caso de los tratamientos térmicos, el 1-MCP provoca una menor actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis del etileno y en la degradación de clorofila (Tian y col., 1997; Gong y col., 2003).

Contenido de azúcares

Se analizó el contenido de azúcares mediante HPLC como se mencionó en materiales y métodos, en el día inicial, día 2 y día 4 postcosecha. Como en otros casos citados (King y Morris, 1994; Downs y col., 1997; Coupe y col., 2003; Pramanik y col., 2005; Baclayon y col., 2009) tanto el contenido de fructosa, de glucosa como de sacarosa disminuyeron durante el almacenamiento en todos los materiales, siendo los controles los que mostraron una caída más pronunciada hasta el día 4 (figura 4.4). Esa caída en los azúcares se debe tanto a la necesidad de su uso en procesos biosintéticos, como para su utilización en la respiración de las flores (King y Morris, 1994). Los materiales sometidos al almacenamiento en AM, tratamiento térmico y a aplicación de 1-MCP mostraron un retraso en la pérdida de azúcares solubles, aunque con diferencias entre los distintos tratamientos (figura 4.4).

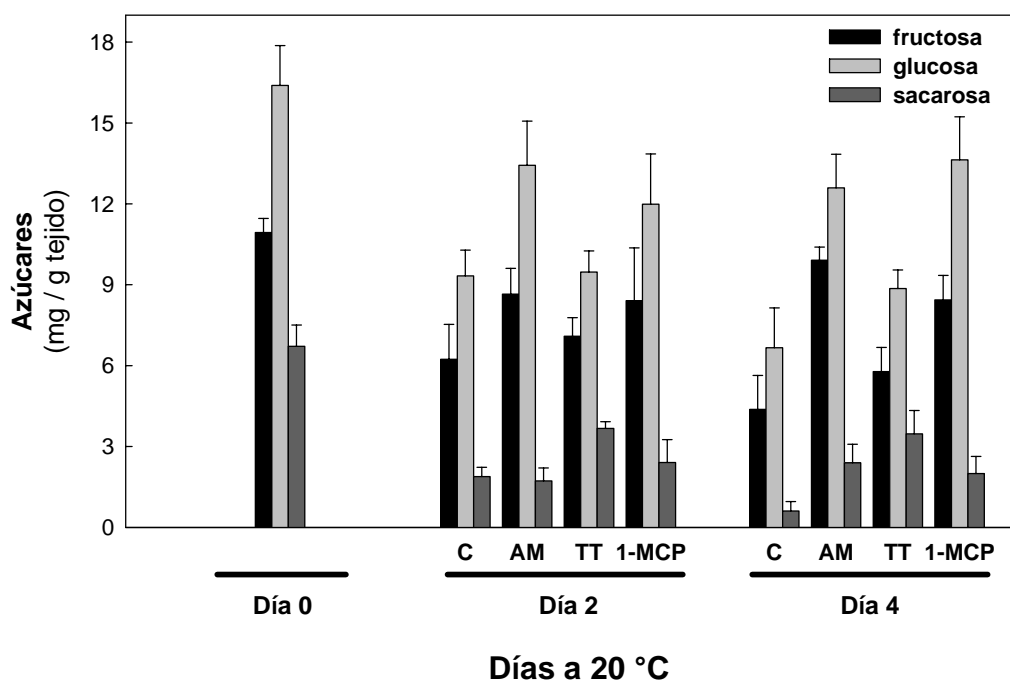


Figura 4.4. Contenido de azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) en las muestras sometidas a diferentes tratamientos postcosecha: controles (C), atmósfera modificada (AM), tratamiento térmico (TT) y 1-metilciclopropeno (1-MCP).

Las muestras almacenadas en AM sufrieron menores pérdidas de azúcares respecto de los controles y las muestras tratadas térmicamente hacia el día 2 del almacenamiento a 20 °C, manteniendo los niveles de azúcares hacia el día 4. Los materiales tratados con 1-MCP también mantuvieron sus niveles de azúcares más altos que los controles y en valores similares durante el almacenamiento. La aplicación de 1-MCP produce un retraso en la senescencia debido a una menor percepción y síntesis de etileno, lo que influye finalmente en el menor ritmo de pérdida de azúcares en estos materiales (Chope y col., 2007; Itai y Tanahashi, 2008). Las muestras tratadas térmicamente mostraron valores de glucosa y fructosa similares a los controles hacia el día 2, pero un valor más alto de sacarosa. Hacia el día 4, estas muestras presentaron similares diferencias respecto de los controles al día 2, aunque estos niveles fueron menores que los materiales tratados con AM y con 1-MCP, con excepción del contenido de sacarosa.

Una disminución en el contenido de sacarosa en brócolis luego de la cosecha, es uno de los eventos de señalización clave que controla la expresión de genes durante

la senescencia, asociada dicha disminución a un aumento de la actividad invertasa (Coupe y col., 2003a). En el caso de las muestras que no recibieron ningún tratamiento, fueron las que sufrieron una mayor caída en los niveles de azúcares y mostraron menores niveles de sacarosa hacia el final del período de almacenamiento.

Actividad invertasa, sacarosa sintasa y β -amilasa

Se midieron las actividades enzimáticas de invertasa, sacarosa sintasa y β -amilasa de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos desde el día de la cosecha hasta el día 4, tomándose como valor de referencia al correspondiente al día de la cosecha.

La actividad invertasa de todas las muestras disminuyó durante el almacenamiento a 20 °C, siendo los controles los que mantuvieron una actividad más alta que el resto y sostenida en el tiempo. Hacia el día 2, se detectó una menor actividad invertasa en las muestras sometidas a AM y las tratadas térmicamente (figura 4.5 a), ocurriendo lo mismo hacia el día 4. Coupe y col. (2003a) reportaron que tratamientos con atmósferas reducidas en O₂ y con mayores valores de CO₂ causaron una disminución en la acumulación de transcritos de los genes de invertasa *BoINV1* y *BoINV2*, manteniéndose además más verdes que los controles durante el almacenamiento. Los brócolis almacenados en atmósferas reducidas en O₂ y con mayor proporción de CO₂ sufren menores pérdidas de agua, azúcares solubles y clorofilas que aquellos materiales almacenados en aire (Eason y col., 2007b). La demanda de hexosas en tejidos sometidos a algún tipo de estrés puede causar un aumento de la actividad invertasa (Sturn y Chrispeels, 1990). En este caso, cuando la demanda de hexosas (y por lo tanto la hidrólisis de sacarosa) se redujo debido al efecto de la atmósfera modificada, la actividad invertasa se mantuvo en niveles inferiores respecto de los materiales almacenados en aire y sin tratamientos (figura 4.5 a).

La actividad invertasa fue menor también en los materiales tratados térmicamente, tanto al día 2 como al día 4 de almacenamiento, pudiendo deberse ello a la sensibilidad de la invertasa al estrés producido por las altas temperaturas (Singh y Knox, 1984; Cheikh y Jones 1995).

Las muestras tratadas con 1-MCP mostraron valores de actividad invertasa similares a los respectivos controles durante el almacenamiento (figura 4.5 a). En *Pyrus pyrifolia* y *Solanum lycopersicum* se ha descrito que el etileno tendría un efecto positivo sobre la expresión y actividad de invertasa (Jeffery y col., 1984; Itai y Tanahashi, 2008). En el presente ensayo, sin embargo, hubiera sido esperable una disminución de la actividad por la inhibición del efecto del etileno causada por el 1-MCP. De todas maneras, se han encontrado en diferentes especies efectos disímiles del etileno sobre un mismo gen o actividad enzimática. Por ejemplo, en tomate se ha demostrado un aumento de la actividad de la enzima pectina metilesterasa (PME) por acción del etileno, mientras que esta misma hormona disminuyó la expresión de los genes correspondientes en frutilla (Castillejo y col., 2004).

La actividad sacarosa sintasa disminuyó durante el almacenamiento en todas las muestras, pero este descenso fue más importante en las muestras sometidas a los tres tratamientos hacia el día 2, y en aquellas sometidas a AM y tratamiento térmico al día 4 (figura 4.5 b). Si bien las bajas concentraciones de oxígeno se asociaron con una mayor expresión de genes de la enzima sacarosa sintasa (Zeng y col., 1999; Geingenberger 2003; Loreti y col., 2005), la actividad de la enzima hacia el día 2 y el día 4 en las muestras sometidas a AM fue menor que en los controles, aunque similar a las muestras tratadas con 1-MCP y mayor respecto de las muestras sometidas a tratamiento térmico. La menor actividad detectada en las muestras tratadas térmicamente probablemente se debió a la influencia de este tratamiento en la depresión del metabolismo enzimático (Wang y col., 1993).

La actividad de la β -amilasa disminuyó en todos los materiales, tratados y controles, desde el día de la cosecha. Durante el segundo día de almacenamiento no hubo diferencias entre los tratamientos ni con los controles. Hacia el final del período de almacenamiento hubo mayor actividad β -amilasa en los materiales sometidos a los diferentes tratamientos, siendo los controles los que mostraron una disminución respecto del día 2, y las muestras sometidas a AM las que mayor actividad presentaron (figura 4.5 c).

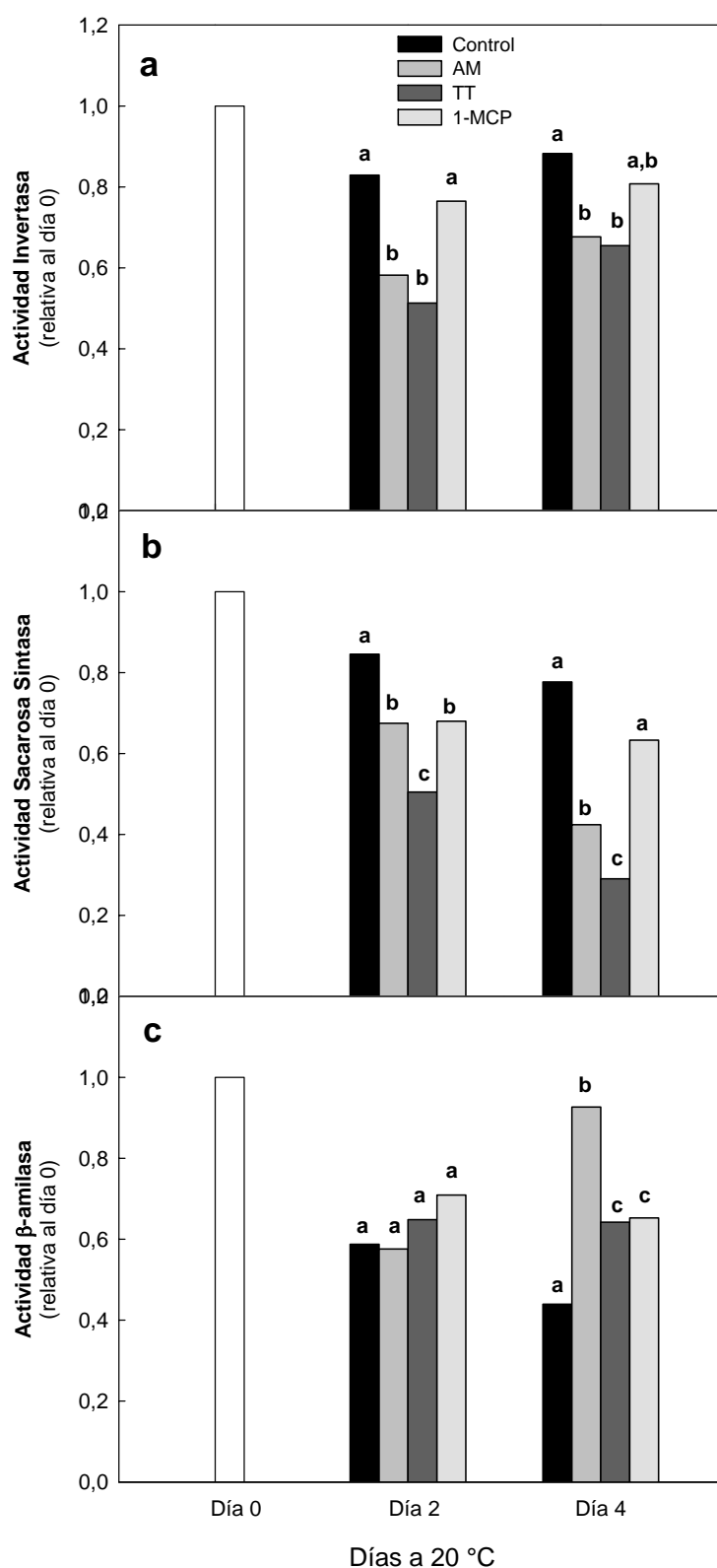


Figura 4.5. Actividad invertasa (a), sacarosa sintasa (b) y beta-amilasa (c) en los materiales tratados con AM, TT, 1-MCP y controles. Letras diferentes indican diferencias significativas al mismo tiempo de almacenamiento.

El proceso de senescencia está acompañado por un alto consumo energético que conduce a una disminución en el contenido de azúcares simples y almidón. Los tratamientos postcosecha que retrasan el proceso de senescencia en general disminuyen la actividad respiratoria del producto (Tian y col., 1997; Funamoto y col., 2002; Coupe y col., 2003a; Funamoto y col., 2003) y permiten mantener un mayor nivel de azúcares. En este caso en particular, los tratamientos realizados causaron un menor descenso en los niveles de azúcares durante la postcosecha. Las muestras sometidas a AM y TT mostraron además una menor actividad de invertasa y sacarosa sintasa que podría conducir a una menor degradación de sacarosa. Debido a que la actividad de estas enzimas fue menor en las muestras tratadas térmicamente respecto de aquellas almacenadas en atmósferas modificadas, los niveles de sacarosa resultaron mayores en estas últimas.

Si bien las muestras tratadas con 1-MCP mostraron niveles de azúcares mayores que los controles y similares a aquellas muestras tratadas con AM, las actividades enzimáticas sacarolíticas fueron prácticamente iguales a las detectadas en los controles. Por tal razón, la causa del mantenimiento de los niveles de azúcares en las muestras tratadas con 1-MCP es probablemente debido a la mayor actividad β -amilasa observada, la cual pudo ser la fuente de azúcares como la glucosa.

Conclusiones generales

La inflorescencia del brócoli se cosecha estando el órgano todavía en desarrollo y con una importante demanda de hidratos de carbono, otros nutrientes, agua y hormonas necesarios para el metabolismo de crecimiento y de mantenimiento. Dado que el corte produce una interrupción de estos suministros, se puede tornar importante el nivel de azúcares del producto en el momento de la cosecha.

Para corroborar la incidencia del estatus de hidratos de carbono de la inflorescencia sobre el desarrollo de la senescencia, en el presente trabajo de tesis doctoral se estudió el efecto del momento de la cosecha en diferentes horas del día sobre el desarrollo de la senescencia postcosecha en general y sobre el nivel de hidratos de carbono y enzimas involucradas al catabolismo de los mismos. Asimismo se analizó el efecto de aplicaciones exógenas de azúcares para corroborar su efecto en dicho proceso, como así también el efecto de diferentes tratamientos postcosecha sobre el nivel de azúcares y la actividad enzimática relacionada al catabolismo de los mismos.

Se pudo observar que el nivel de hidratos de carbono evolucionó de una forma diferente en las muestras cosechadas a diferentes horas de día, siendo las muestras de las 18 h las que tuvieron mayores contenidos de azúcares reductores y sacarosa hacia el final del período de almacenamiento. Si bien inicialmente los materiales cosechados a distintas horas mostraron niveles similares de azúcares solubles, el contenido de almidón fue mayor en las muestras cosechadas a las 18 h. La evolución de los contenidos de dichos azúcares fue diferente a lo largo del almacenamiento, y ello pudo deberse a la glucosa y/o sacarosa aportada por la degradación del almidón, que en las muestras de las 13 h duplicó al contenido en las muestras de las 8 h, mientras que las muestras de las 18 h casi triplicaron al de las muestras cosechadas a la mañana. La actividad enzimática relacionada al catabolismo de azúcares fue superior en las muestras cosechadas a las 18 h aunque sólo al día inicial, siendo similar en todas las muestras durante los siguientes días de almacenamiento. Si bien el contenido de sacarosa al día de la cosecha no fue significativamente superior en las muestras de las 13 y las 18 h, una mayor actividad invertasa en estas muestras podría deberse al mayor nivel de sacarosa existente durante las horas de luz. Del mismo modo, una mayor

actividad de la enzima sacarosa sintasa en las muestras de las 18 h pudo deberse a una mayor cantidad de otro producto de la fotosíntesis con función de reserva como el almidón, dada la asociación de dicha enzima con el catabolismo de la sacarosa en el órgano destino y la provisión de glucosa para la síntesis de almidón. Del mismo modo, y dado que la síntesis de dicho compuesto va seguida de una degradación del almidón transitorio para la provisión continua de hidratos de carbono en períodos de baja intensidad lumínica (como el caso del momento de cosecha a las 18 h) o ausencia de luz, la actividad β -amilasa fue también superior en las muestras cosechadas a las 18 h.

Asimismo, se pudo ver que la cosecha hacia el final del día favoreció el mantenimiento del color verde por más tiempo, debido a una mayor retención de clorofilas. Las enzimas clorofilasa 2 (CHL2), feoforbido α oxigenasa (PaO) y la feofitinas (PPH) están ligadas a la degradación de clorofila. En el presente trabajo, hacia el día 4 de almacenamiento principalmente, se encontró una menor expresión de los genes que codifican para dichas enzimas en brócoli en las muestras cosechadas a las 18 h (para el caso de *BoCLH2*, *BoPaO* y *BoPPH*), y en las cosechadas a las 13 h (para el caso de *BoPaO* y *BoPPH*), respecto de las muestras cosechadas a las 8h. Estos datos se correlacionaron con la degradación de clorofila, que resultó mayor y de forma más prematura en las muestras cosechadas a las 8 h.

Se evaluó la hipótesis de la incidencia del nivel de azúcares sobre la senescencia postcosecha del brócoli realizando aplicaciones durante la postcosecha. Se detectó que las muestras que fueron sometidas a tratamientos exógenos de glucosa y sacarosa mostraron durante el período postcosecha un mantenimiento más alto del nivel endógeno de azúcares respecto de las muestras no tratadas, visualizándose además un retraso en el amarilleamiento, relacionado a una menor degradación de clorofila, y mayores niveles de antioxidantes.

Se buscó además correlacionar los cambios en los niveles de azúcares y de actividades enzimáticas en muestras sometidas a tratamientos que desaceleran el proceso de senescencia tales como atmósferas modificadas (AM), tratamientos térmicos (TT) y 1-metilciclopropeno (1-MCP). Las muestras sometidas a los diferentes tratamientos sufrieron una caída en el nivel de azúcares menos brusca respecto de los controles, los cuales mostraron al día 4 menores contenidos de sacarosa respecto de los tratamientos AM, TT y 1-MCP. En lo que respecta a la actividad de las enzimas

relacionadas al catabolismo de sacarosa, la menor actividad medida en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos pudo deberse a una disminución en el metabolismo, razón por la cual dichas muestras pudieron mantener niveles más altos de azúcares hacia el día 4 postcosecha.

Si bien la senescencia postcosecha del brócoli está regida por una multiplicidad de factores, en el presente trabajo se pudo comprobar la importancia que cumple la existencia de un nivel elevado de hidratos de carbono durante la senescencia, principalmente por su efecto en el retraso de la degradación de clorofilas, un factor determinante en la calidad del producto en postcosecha.

Finalmente, se pueden realizar algunas consideraciones en relación a la posible implicancia de estos estudios en la comercialización de brócoli. En las prácticas de horticultura generalmente la mañana es considerada el mejor momento del día para la cosecha de vegetales dado que el estatus hídrico de los mismos en dicho momento es alto, junto con la ocurrencia de menores temperaturas y una menor tasa respiratoria (Klieber y col., 2002). Sin embargo, los resultados presentados aquí podrían sugerir, al menos, una revisión del horario de la cosecha, para obtener un mayor tiempo de ventaja en la conservación del producto en condiciones de temperatura ambiente.

Bibliografía

Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME. Ethylene in plant biology. San Diego, California: Academic Press, 1992

Able AJ, Wong LS, Prasad A, O'Hare TJ, 2002. 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *chinensis*). *Postharvest Biology and Technology* 26: 147–155

Aharoni N, Philosoph-Hadas S y Barkai-Golan R, 1985. Modified atmospheres to delay senescence and decay of broccoli. In *Controlled Atmospheres for Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities* (S.M. Blankenship, Ed.), Horticulture Report 126: 169-177

Aiamla-or S, Kaewsuksaeng S, Shigyo M, Yamauchi N, 2010. Impact of UV-B irradiation on chlorophyll degradation and chlorophyll-degrading enzyme activities in stored broccoli (*Brassica oleracea* L. *Italica* Group) florets. *Food Chemistry* 120: 645-651

Al-Ati T, Hotchkiss JH, 2003. The role of packaging film permselectivity in modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51: 4133–4138

Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP, 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 9353-9357

Antunes MDC, Sfakiotakis EM, 2000. Effect of high temperature stress on ethylene biosynthesis, respiration and ripening of 'Hayward' kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* 20: 251–259

Argyroudi-Akoyunoglou, J.H., Prombona, A., 1996. Light-independent endogenous circadian rhythm in the capacity for chlorophyll formation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biol.* 36: 271-277

Asatsuma S, Sawada C, Itoh K, Okito M, Kitajima A, Mitsui T, 2005. Involvement of α -Amylase I-1 in Starch Degradation in Rice Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 46: 858-869

Avigad G, 1982. Sucrose and other disaccharides. En: *Encyclopedia of Plant Physiology Plant Carbohydrate* (LOEWUS, F.A. y W. TANER, Eds) L. Springer Berlin, 3A: 217-347

Babula D, Kaczmarek M, Ziólkowski PA, Sadowski J, 2007. *Brassica oleracea*, en *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, capítulo 8, Vegetables, volumen 5 Editor C. Kole, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 227-285

Baclayon DP, Matsui T, 2009. Carbohydrate status of sucrose-fed broccoli head during storage and the activity and gene expression of sucrose synthase. *Annals of Tropical Research* 31: 34-46

Barth MM, Kerbel EL, Perry AK, y Schmidt SJ, 1993. Modified atmosphere packaging affects ascorbic acid, enzyme activity and market quality of broccoli. *Journal of Food Science* 58: 140-143

Bate NJ, Niu X, Wang Y, Reimann KS, Helentjaris TG, 2004. An Invertase Inhibitor from Maize Localizes to the Embryo Surrounding Region during Early Kernel Development. *Plant Physiology*, 134: 246–254

Beers EP, Woffenden BJ, Zhao CS, 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, 44: 399–415

Benedetti CE, 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

Blankenship SM, Dole JM, 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology* 28: 1-25

Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible W-R, Stitt M, 2005. Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17: 3257-3281

Black CC, Mustardy L, Sung SS, Kormanik PP, Xu D-P, and Pas N, 1987. Regulation and roles for alternative pathways of hexose metabolism in plants. *Physiologia Plantarum*, 69: 387-394

Black CC, Loboda T, Chen J-Q, Sung S-J S, 1995. Can sucrose cleavage enzymes serve as markers for sink strength and is sucrose a signal molecule during plant sink development? *International Symposium on Sucrose Metabolism*. Editores: Pontis HG, Salerno GL, Echeverría EJ. American Society of Plant Physiologists, págs. 49-64

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol (LWT)*, 22: 25-30

Büchert AM, Civello PM y Martínez GA, 2011a. Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytilation during senescence of broccoli. *Journal of Plant Physiology*, 168: 337-343

Büchert AM, Civello PM, Martínez GA, 2011b. Effect of hot air, UV-C, white light and modified atmosphere treatments on expression of chlorophyll degrading genes in postharvest broccoli (*Brassica oleracea* L.) florets. *Scientia Horticulturae*, 127: 214–219

Büchert AM, Civello PM, Martínez GA, 2011c. Characterization of Mg-dechelating substance in senescent and pre-senescent *Arabidopsis thaliana* leaves. *Biologia Plantarum*, 55: 75-82

Buchanan-Wollaston V, 1997. Review. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 48: 81-199

Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabdour S, Page T y Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 3-22

Castillejo C, de la Fuente JI, Iannetta P, Botella MA, Valpuesta V, 2004. Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *Journal of Experimental Botany*, 55: 909-918

Cervantes E, Rodriguez A, Nicolas G. 1994. Ethylene regulates the expression of a cysteine proteinase gene during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Molecular Biology*, 25: 207-215

Cheikh N, Jones RJ, 1995. Heat stress effects on sink activity of developing maize kernels grown in vitro. *Physiologia Plantarum*, 95: 59-66

Chen L-F O, Lin C-H, Kelkar SM, Chang Y-M, Shaw J-F, 2008. Transgenic broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with antisense chlorophyllase (*BoCLH1*) delays postharvest yellowing. *Plant Science*, 174: 25–31

Chevalier C, Bourgeois E, Pradet A, Raymond P, 1995. Molecular cloning and characterization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Molecular Biology*, 28: 473-485

Chope GA, Terry LA, White PJ, 2007. The effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the physical and biochemical characteristics of onion cv. SS1 bulbs during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 44: 131–140

Chung B-C, Lee SY, Oh SA, Rhew TH, Nam HG, Lee C-H, 1997. The promoter activity of sen 1, a senescence-associated gene of *Arabidopsis*, is repressed by sugars. *Journal of Plant Physiology*, 151: 339-345

Clarkson, G.J., Rothwell, S.D., Taylor, G., 2005. End of day harvest extends shelf life. *HortScience*, 40: 1431-1435

Costa ML, Civello PM, Chaves AR, Martínez GA, 2002. Characterization of Mg-dechelataze activity obtained from *Fragaria* × *ananassa* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 111-118

Costa ML, Civello PM, Chaves AR y Martínez GA. 2005a. Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) heads. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 85: 1154-1160

Costa ML, Civello PM, Chaves AR, Martínez GA, 2005b. Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 35: 191-199

Costa ML, Vicente AR, Civello PM, Chaves AR, Martínez GA, 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 39: 204–210

Couey HM, 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. *HortScience*, 24: 198– 201

Coupe SA, Sinclair BK, Greer LA, Gapper NE, Watson LM, Hurst PL, 2003a. Analysis of acid invertase gene expression during the senescence of broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 28: 27-37.

Coupe SA, Sinclair BK, Watson LM, Heyes JA, Eason JR, 2003b. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 54: 1045-1056

da Silva JC, Donizeti Alves J, Alves de Alvarenga A, Murad Magalhaes M, Einstein do Livramento D, Deitos Fries D, 2003. Invertase and sucrose synthase activities in coffee plants sprayed with sucrose solution. *Scientia Agricola*, 60: 239-244

Dieuaide M, Broquisse R, Pradet A, Raymond P, 1992. Increased Fatty Acid α -Oxidation after Glucose Starvation in Maize Root Tips. *Plant Physiology* 99: 595-600

Doehlert DC, Kuo TM, 1990. Sugar Metabolism in Developing Kernels of Starch-Deficient Endosperm Mutants of Maize. *Plant Physiology*, 92: 990-994

Downs CG, Somerfield SD, Davey MC, 1997. Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 11: 93-100

Eason JR, Vre L, Somerfield S, Heyes JA, 1997 Physiological changes associated with *Sandersonia aurantiaca* flower senescence in response to sugar. *Postharvest Biology and Technology*, 12: 43-50

Eason JR, Ryan DJ, Watson LM, Hedderley D, Christey MC, Braun RH, Coupe SA, 2005. Suppression of the cysteine protease, aleurain, delays floret senescence in *Brassica oleracea*. *Plant Molecular Biology*, 57: 645–657

Eason JR, Ryan DJ, Watson LM, Pinkney T, Hedderley D, Christey MC, Braun RH, Coupe SA, 2007a. Suppressing expression of a soluble acid invertase (BoINV2) in broccoli (*Brassica oleracea*) delays postharvest floret senescence and downregulates cysteine protease (BoCP5) transcription. *Physiologia Plantarum*, 130: 46-57

Eason JR, Ryan D, Page B, Watson L, Coupe SA, 2007b. Harvested broccoli (*Brassica oleracea*) responds to high carbon dioxide and low oxygen atmosphere by inducing stress-response genes. *Postharvest Biology and Technology*, 43: 358-365

Fan X, Mattheis JP, 2000. Reduction of ethylene induced physiological disorders of carrots and iceberg lettuce by 1-methylcyclopropene. *HortScience*, 35: 1312-1314

Farnham MW, Wilson PE, Stephenson KK, Fahey JW, 2004. Genetic and environmental effects on glucosinolate content and chemoprotective potency of broccoli. *Plant Breeding*, 123: 60-65

Ferguson IB, Ben-Yehoshua S, Mitcham EJ, McDonald RE, Lurie S, 2000. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. *Postharvest Biology and Technology*, 21: 1-6

Francis, FJ, 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, 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, Yamauchi N, Shigenaga T, Shigyo M, 2002. Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 24: 163-170

Funamoto Y, Yamauchi N, Shigyo M, 2003. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.) and inhibition of the activity by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 28: 39-46

Gan S y Amasino R M, 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270: 1966-7

Gan S y Amasino R M, 1997. Making sense of senescence. *Plant Physiology* 113: 313-319

Gapper NE, Coupe SA, McKenzie MJ, Sinclair BK, Lill RE, Jameson PE, 2005a. Regulation of Harvest-induced Senescence in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) by Cytokinin, Ethylene, and Sucrose. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24:153-165

Gapper NE, Coupe SA, McKenzie MJ, Scott RW, MC Christey, Lill RE, McManus MT, Jameson PE, 2005b. Senescence down-regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase delays harvest-induced senescence in broccoli. *Functional Plant Biology*, 32: 891-901

García-Plazaola JI, Beceril JM, 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter. *Plant Science*, 143: 125-133

Geingenberger P, 2003. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, 54: 457-465

Gomez-Lobato ME, Civello PM, Martínez GA, 2011. Effects of ethylene, cytokinin and physical treatments on *BoPaO* gene expression of harvested broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 151-158

Gong Y, Mattheis JP, 2003. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on chlorophyll catabolism of broccoli florets. *Plant Growth regulation*, 40: 33-38

Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ, 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell*, 6: 761-772

Graham IA y Eastmond PJ, 2002. Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Progress in Lipid Research*, 41: 156-181

Grbic V, Bleecker AB, 1995. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 8: 465-622

Grennan AK, 2006. Regulation of Starch Metabolism in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiology*, 142: 1343-1345

Guo R, Yuan G, Wang Q, 2011. Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Scientia Horticulturae*, 128: 159–165

Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM, 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition*, 47: 73-88

Hendrix DL, 1990. Carbohydrates and carbohydrate enzymes in developing cotton ovules. *Physiologia Plantarum*, 78: 85-92

Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA y Bleecker AB, 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 5: 553-564

Higgins JD, Newbury HJ, Barbara DJ, Muthumeenakshi S, Puddephat IJ, 2006. The production of marker-free genetically engineered broccoli with sense and antisense ACC synthase 1 and ACC oxidases 1 and 2 to extend shelf-life. *Molecular Breeding*, 17: 7-20

Hörtensteiner S, 2006. Chlorophyll Degradation During Senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 55–77

Hodges DM, Forney CF, Wismer WV, 2001. Antioxidant responses in harvested leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 611-617

Huang L-C, Lai U-L, Yang S-F, Chu M-J, Kuo C-I, Tsai M-F, Sun C-W, 2007. Delayed flower senescence of *Petunia hybrida* plants transformed with antisense broccoli ACC synthase and ACC oxidase genes. *Postharvest Biology and Technology*, 46: 47-53

Hurst P, Cheer V, Sinclair B, Irving D, 1996. Biochemical responses of asparagus to controlled atmosphere storage at 20 °C. *Journal of Food Biochemistry*, 20: 463-472

Ichimura K, Suto K, 1999. Effects of the time of sucrose treatment on vase life, soluble carbohydrate concentrations and ethylene production in cut sweet pea flowers. *Plant Growth Regulation*, 28: 117-122

Ichimura K, Taguchi M, Norikoshi R, 2006. Extension of the Vase Life in Cut Roses by Treatment with Glucose, Isothiazolinonic Germicide, Citric Acid and Aluminum Sulphate Solution. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40: 263-269

Imanishi H, Halevy AH, Kofranek AM, Han S, Reid MS, 1994. Respiratory and carbohydrate changes during ethylene-mediated flower induction in Dutch iris. *Scientia Horticulturae*, 59: 275-284

Irving DD, Joyce DC, 1995. Sucrose supply can increase longevity of broccoli (*Brassica oleracea*) branchlets kept at 22 °C. *Plant Growth Regulation*, 17: 251-256

Itai A, Tanahashi T, 2008. Inhibition of sucrose loss during cold storage in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) by 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, 48: 355-363

Jacobsson A, Nielsen TM, Sjöholm I, Wendin K, 2004. Influence of packaging material and storage condition on the sensory quality of broccoli. *Food Quality and Preference*, 15: 301-310

Jeffery D, Smith C, Goodenough P, Prosser I, Grierson D, 1984. Ethylene-Independent and Ethylene-Dependent Biochemical Changes in Ripening Tomatoes. *Plant Physiology*, 74: 32-38

Jeffery E & Araya M, 2008. Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews*, 8: 283-298

Jiang W, Sheng Q, Zhou X, Zhang M, Liu X, 2002. Regulation of coriander senescence by 1-methylcyclopropene and ethylene. *Postharvest Biology and Technology*, 26: 339-345

Jin Y, Ni D-A, Ruan Y-L, 2009. Posttranslational Elevation of Cell Wall Invertase Activity by Silencing Its Inhibitor in Tomato Delays Leaf Senescence and Increases Seed Weight and Fruit Hexose Level. *The Plant Cell*, 21: 2072-2089

John I, Drake R, Farrell A, Cooper W, Lee P, Horton P y Grierson D, 1995. Delayed leaf senescence in ethylene deficient ACC-oxidase antisense tomato plants-molecular and physiological analysis. *The Plant Journal*, 7: 483-490

Jones ML, en *Plant Cell Death Processes*, Capítulo 4: Changes in Gene Expression during Senescence. Editor: Larry D. Noodén ISBN: 978-0-12-520915-1. El Sevier, 2004

Jones RB, Faragher JD, Winkler S, 2006. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, 41: 1-8

Kariola T, Brader G, Li J, Palva ET, 2005. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *Plant Cell*, 17: 282-294

Kim JY, Mahé A, Brangeon J, Prioul JL, 2000. A Maize Vacuolar Invertase, IVR2, Is Induced by Water Stress. Organ/Tissue Specificity and Diurnal Modulation of Expression. *Plant Physiology*, 124: 71-84

Kim HJ, Chen F, Wang X, Choi JH, 2006. Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7263-7269

King AI, Joyce DC, Reid MS, 1988. Role of Carbohydrates in Diurnal Chilling Sensitivity of Tomato Seedlings. *Plant Physiology*, 86: 764-768

King GA, y Morris SC, 1994. Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119: 1000-1005

Kiyota M, Numayama N, Goto K, 2006. Circadian rhythms of the L-ascorbic acid level in Euglena and spinach. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biol.* 84: 197-203

Klieber A, Porter KL, Collins G, 2002. Harvesting at different times of day does not influence the postharvest life of Chinese cabbage. *Scientia Horticulturae*, 96: 1-9

Koch KE, 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47: 509-540

Ku VVV, Wills RBH, 1999. Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 17: 127-132

Kubota C, Rajapakse NC, Young RE, 1997. Carbohydrate status and transplant quality of micropropagated broccoli plantlets stored under different light environments. *Postharvest Biology and Technology*, 12: 165-173

Kumar N, Srivastava GC, Dixit K, 2008. Hormonal regulation of flower senescence in roses (*Rosa hybrida* L.). *Plant Growth Regulation*, 55:65-71

Kushad MM, Brown AF, Kurilich AC, Juvik JA, Klein BP, Wallig MA, Jeffery EH, 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1541-1548

Lange DD y Cameron AC, 1994. Postharvest shelf life of sweet basil (*Ocimum basilicum*). HortScience, 29: 102-103

Latté KP, Appel K-E, Lampen A, 2011. Review: Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. Food and Chemical Toxicology, 49: 3287-3309

Lee H-S, Sturm A, 1996. Purification and Characterization of Neutral and Alkaline Invertase from Carrot. Plant Physiology, 112: 1513-1522

Leja M, Mareczek A, Starzyńska A, Rozek S, 2001. Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage. Food Chemistry, 72: 219-222

Lemoine ML, Civello M, Martínez G y Chaves AR, 2007. Influence of a postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 87: 1132-1139

Li G, Riaz A, Goyal S, Abel S, Quiros CF, 2001. Inheritance of three major genes involved in the synthesis of aliphatic glucosinolates in *Brassica oleracea*. Journal of The American Society for Horticultural Science, 126: 427-431

Li JR, Yu K, Wei JR, Ma Q, Wang BQ, Yu D, 2010. Gibberellin retards chlorophyll degradation during senescence of *Paris polyphylla*. Biologia Plantarum 54: 395-399

Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382

Linthorst HJ, Van Der Does C, Brederode FT, Bol JF, 1993. Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase. Plant Molecular Biology, 21: 685-694

Lloyd JR, Kossmann J, Ritte G, 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. Trends in Plant Science, 10: 130-137

Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A, Perata P, 2005. A Genome-Wide Analysis of the Effects of Sucrose on Gene Expression in Arabidopsis Seedlings under Anoxia. *Plant Physiology*, 137: 1130-1138

Louda JW, Li J, Liu L, Winfree MN, Baker EW, 1998. Chlorophyll-*a* degradation during cellular senescence and death. *Organic Geochemistry*, 29: 1233-1251

Lu Y, Gehan JP, Sharkey TD, 2005. Daylength and Circadian Effects on Starch Degradation and Maltose Metabolism. *Plant Physiology*, 138: 2280-2291

Lurie S, 1998. Review: Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14: 257-269

Ma G, Wang R, Wang C-R, Kato M, Yamawaki K, Qin F, Xu H-L, 2009. Effect of 1-methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli. *Plant Growth Regulation*, 57: 223-232

Mach JM, Castillo AR, Hoogstraten R, Greenberg JT, 2001. The Arabidopsis-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 771-776

Makhlouf J, Castaigne F, Azul J, Willemot C y Gosselin A. 1989. Long-term storage of broccoli under controlled atmosphere. *HortScience*, 24: 322-328

Martin T, Frommer WB, Salanoubat M, Willmitzer L, 1993. Expression of an Arabidopsis sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *The plant Journal* 4: 367-377

Más P, Yanovsky MJ, 2009. Time for circadian rhythms: plants get synchronized. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 574-579

Matile P, Schellenberg M, Peisker C, 1992. Production and release of a chlorophyll catabolite in isolated senescent chloroplasts. *Planta*, 187:230-235

Matile P, Hörtensteiner S y Thomas H. 1999. Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular*, 50: 67-95

McKenzie MJ, Greer LA, Heyes JA, Hurst PL, 2004. Sugar metabolism and compartmentation in asparagus and broccoli during controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 32: 45-56

Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428

Mita S, Suzuki-ujii K, Nakamura K , 1995. Sugar-inducible expression of a gene for beta-amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 107: 895-904

Muñoz FJ, Baroja-Fernández E, Morán-Zorzano MT, Viale AM, Etxeberria E, Alonso-Casajús N, Pozueta-Romero J, 2005. Sucrose Synthase Controls Both Intracellular ADP Glucose Levels and Transitory Starch Biosynthesis in Source Leaves. *Plant Cell Physiology*, 46: 1366-1376

Murray R, Lucangeli C, Polenta G, Budde C, 2007. Combined pre-storage heat treatment and controlled atmosphere storage reduced internal breakdown of 'Flavorcrest' peach. *Postharvest Biology and Technology*, 44: 116-121

Nägele T, Henkel S, Hörmiller I, Sauter T, Sawodny O, Ederer M, Heyer A, 2010. Mathematical Modeling of the Central Carbohydrate Metabolism in *Arabidopsis* Reveals a Substantial Regulatory Influence of Vacuolar Invertase on Whole Plant Carbon Metabolism. *Plant Physiology*, 153: 260-272

Nakamura K, Ohto M, Yoshida N, Nakamura K, 1991. Sucrose induced accumulation of P-amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiology*, 96: 902-909

Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, A-H-Mackerness S, Buchanan-Wollaston V, 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2285-2292

Nelson N, 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of the Biological Chemistry*, 153: 375-380

Nishikawa F, Kato M, Hyodo H, Ikoma Y, Sigiura M, Yano M, 2003. Ascorbate metabolism in harvested broccoli. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2439-2448

Nishikawa F, Kato M, Hyodo H, Ikoma Y, Sugiera M, Yano M, 2005a. Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 56: 65-72

Nishikawa F, Iwamab T, Kato M, Hyodob H, Ikomac Y, Yano M, 2005b. Effect of sugars on ethylene synthesis and responsiveness in harvested broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 36: 157-165

Noctor G, Foyer CH, 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279

Noh YS, Amasino RM, 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Molecular Biology*, 41: 181-194

Oh MM, Rajashekar CB, 2009. Antioxidant content of edible sprouts: effects of environmental shocks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 2221-2227

Ohtsuka T, Ito H, Tanaka A, 1997. Conversion of chlorophyll *b* to chlorophyll *a* and the assembly of chlorophyll with apoproteins by isolated chloroplasts. *Plant Physiology*, 113: 137-47

Orzechowski S, 2008. Starch metabolism in leaves. *Acta Biochimica Polonica*, 55: 435-445

Page T, Griffiths G, Buchanan-Wollaston V, 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiology*, 125: 718-727

Pan J, Vicente AR, Martinez GA, Chaves AR, Civello PM, 2004. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1831-1838

Paull RE, Chen NJ, 2000. Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 21: 21-37

Pogson BJ, Downs CG y Davies KM, 1995. Differential expression of two 1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid oxidase genes in broccoli after harvest. *Plant Physiology*, 108: 651-657

Pogson BJ y Morris SC, 1997. Consequences of cool storage of broccoli on physiological and biochemical changes and subsequent senescence at 20 °C. *Journal of the American Society for the Horticultural Sciences*, 122: 553-558

Pourtau N, Jennings R, Pelze E, Palla J, Wingler A, 2006. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* 224: 556-568

Pramanik BK, Matsui T, Suzuki H, Kosugi Y, 2005. A sucrose synthase gene from broccoli: cDNA cloning, sequencing and its expression during storage. *Biotechnology*, 4: 288-295

Price J, Laxmi A, St. Martin SK, Jang J-C, 2004. Global Transcription Profiling Reveals Multiple Sugar Signal Transduction Mechanisms in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16: 2128-2150

Pruzinská A, Anders I, Tanner G, Roca M, Hörtensteiner S, 2003. Chlorophyll breakdown: pheophorbide *a* oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the *accelerated cell death 1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100: 15259-64

Rapaka VK, Faust JE, Dole JM, Runkle ES, 2007. Diurnal carbohydrate dynamics affect postharvest ethylene responsiveness in portulaca (*Portulaca grandiflora* 'Yubi Deep Rose') unrooted cuttings. *Postharvest Biology and Technology*, 44: 293-299

Rapaka VK, Faust JE, Dole JM, Runkle ES, 2008. Endogenous carbohydrate status affects postharvest ethylene sensitivity in relation to leaf senescence and adventitious root formation in *Pelargonium* cuttings. *Postharvest Biology and Technology*, 48: 272-282

Rausch T, Greiner S, 2004. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696: 253-261

Reinbothe C, Springer A, Samol I, Reinbothe S, 2009. Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence, *The FEBS Journal*, 276: 4666-4681

Ren K, Tu K, Pan L, Chen Y, 2005. Kinetic modelings of broccoli color changes during chilled storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30: 180-193

Rodríguez-Aguilera R, Oliveira JC, 2009. Review of Design Engineering Methods and Applications of Active and Modified Atmosphere Packaging Systems. *Food Engineering Reviews*, 1:66-83

Roitsch T, Ehneß R, Goetz M, Hause B, Hofmann M, Sinha AK, 2000. Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 815-825

Rojas-Graü MA, Oms-Oliu G, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O, 2009. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 875-889

Rolland F, Moore B, Sheen J 2002. Sugar sensing and signalling in plants. *Plant Cell*, 14: S185-S205

Rose R, Rose C, Omi S, Forry K, Durall D, Bigg W, 1991. Starch Determination by Perchloric Acid vs Enzymes: Evaluating the Accuracy and Precision of Six Colorimetric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 2-11

Rothan C, Duret S, Chevalier C, Raymond P, 1997. Suppression of ripening-associated gene expression in tomato fruit subjected to a high CO₂ concentration. *Plant Physiology*, 114: 255-263

Salisbury FB, Ross CW, 2000. *Fisiología de las plantas. Lípidos y otros productos naturales*, págs. 471-497. Editorial Paraninfo-Thompson Learning, Madrid, España

Schaffer A, Sagee O, Goldschmidt E, Goren R, 1987. Invertase and sucrose synthase activity, carbohydrate status and endogenous IAA levels during *Citrus* leaf development. *Physiologia Plantarum*, 69: 151-155

Schenk N, Schelbert S, Kanwischer M, Goldschmidt EE, Dörmann P, y Hörtensteiner S, 2007. The chlorophyllases *AtCLH1* and *AtCLH2* are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 581: 5517-5525

Scheumann V, Schoch S, Rüdiger W., 1998. Chlorophyll *a* formation in the chlorophyll *b* reductase reaction requires reduced ferredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 35102-35108

Sharma R, Schopfer P, 1987. Phytochrome-mediated regulation of b-amylase mRNA in mustard (*Sinapsis alba* L.) cotyledons. *Planta*, 171: 313-320

Sicher RC, Kremer DF, Harris WG, 1984. Diurnal Carbohydrate Metabolism of Barley Primary Leaves. *Plant Physiology*, 76: 165-169

Sisler EC, Serek M, 2003. Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. *Plant Biology*, 5: 473-80

Singh MB, Knox RB, 1984. Invertases of Liliium Pollen. Characterization and activity during in vitro germination. *Plant Physiology*, 74: 510-515

Slack CR, 1964. The physiology of sugar-cane. Diurnal fluctuations in the activity of soluble invertase in elongating internodes. *Australian Journal of Biological Sciences*, 18: 781-788

Smeekens S, 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 49-81

Smith AM, 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*, 2: 335-341

Stoppani MI, Francescangeli N, Wolff R, Marti H, 2000. Efecto de la fecha de trasplante, del híbrido y del uso de manta térmica y mulch plástico sobre el rendimiento y la calidad de la pella de brócoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica* Plenck) cultivado a campo durante la estación fría. Libro de actas del XXIII Congreso Argentino. X Congreso Latinoamericano. III Congreso Iberoamericano de Horticultura, Mendoza, Argentina.

Sturm A, Chrispeels MJ, 1990. cDNA Cloning of Carrot Extracellular β -Fructosidase and Its Expression in Response to Wounding and Bacterial Infection. *The Plant Cell*, 2: 1107-1119

Sturm A, 1999. Invertases: Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7

Sheen J, Zhou L, Jang J-C, 1999. Sugars as signalling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 410-418

Suzuki A, Kanayama Y, Yamaki S, 1996. Occurrence of Two Sucrose Synthase Isozymes during Maturation of Japanese Pear Fruit. *Journal of the American Society for the Horticultural Sciences*, 121: 943-947

Suzuki Y, Asoda T, Matsumoto Y, Terai H, Kato M, 2005. Suppression of the expression of genes encoding ethylene biosynthetic enzymes in harvested broccoli with high temperature treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 36: 265-271

Takamiya K, Tsuchiya T y Ohta H, 2000. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends in Plant Science*, 5: 426-431

Thomas H, Donnison I, 2000. Back from the brink: plant senescence and its reversibility. En: Bryant J, Garland JM, Hughes SG, eds. *Programmed cell death in animals and plants*. Oxford, UK: Bios, Oxford. 149-162

Thomas H, Stoddart L. 1975. Separation of chlorophyll degradation form other senescence processes in leaves of a mutant genotype of meadow fescue (*Festuca pratensis* L.). *Plant Physiology*, 56:438-441

Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong Y, 1998. Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research*, 37: 119-141

Tian MS, Downs CG, Lill RE, King GA, 1994. A role for ethylene in the yellowing of broccoli. *Journal of the American Society for the Horticultural Sciences*, 119: 276-281

Tian M, Talebul Islam, Stevenson D, Irving D, 1997. Color, ethylene production, respiration, and compositional changes in broccoli dipped in hot water. *Journal of the American Society for the Horticultural Sciences*, 122: 112-116

Toivonen PMA, 1997. The effects of storage temperature, storage duration, hydro-cooling, and micro-perforated wrap on shelf life of broccoli (*Brassica oleracea* L., *Italica* Group) *Postharvest Biology and Technology*, 10: 59-65

Tsuchiya T, Ohta H, Okawa K, Iwamatsu A, Shimada H, Masuda T, Takamiya K, 1999. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 96: 15362-15367

Türk R, Özkurt AS, 1994. The storage of some stone fruits in modified atmosphere. *Acta Horticulturae. International Society for Horticultural Science*, 368: 850-855

Tymowska-Lalanne Z, Kreis M, 1998. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Advances in Botanical Research*, 28: 71-117

van Doorn, WG, 2004. Is petal senescence due to sugar starvation? *Plant Physiology*, 134: 35-42

Van den Ende W, Valluru R, 2009. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany*, 60: 9-18

Vendrell M, McGlasson WB, 1971. Inhibition of Ethylene Production in Banana Fruit Tissue by Ethylene Treatment. *Australian Journal of Biological Sciences*, 24: 885-896

Verlinden S, Garcia JJ, 2004. Sucrose loading decreases ethylene responsiveness in carnation (*Dianthus caryophyllus* cv. White Sim) petals. *Postharvest Biology and Technology*, 31: 305-312

Vicentini F y Matile P, 1993. Gerontosomes, a multi-functional type of peroxisome in senescent leaves. *Journal of Plant Physiology*, 142: 50-6

Vicentini F, Iten F, Matile P, 1995. Development of an assay for Mg-dechelatase of oilseed rape cotyledons, using chlorophyllin as the substrate. *Physiologia Plantarum*, 94:57-63

Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A, 1993. Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength. *Plant Physiology*, 101: 321-327

Watkins CB, 2006. Research review paper: The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, 24: 389-409

Weise SE, Weber APM, Sharkey TD, 2004. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta*, 218: 474-482

Willstätter R, Stoll A, 1913. Investigations on chlorophyll. Authorized English translation by Schertz and Merz. 1928. Science Press. Lancaster, Pennsylvania

Wurr DCE, Hambidge AJ, Fellows JR, Lynn JR, Pink DAC, 2002. The influence of water stress during crop growth on the postharvest quality of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 25: 193-198

Wüthrich KL, Bovet L, Hunziker PE, Donninson IS, Hörtensteiner S, 2000. Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. *The Plant Journal*, 21: 189-198

Yanagisawa S, Yoo S-D, Sheen J, 2003. Differential regulation of *EIN3* stability by glucose and ethylene signaling in plants. *Nature*, 425: 521-525

Yu, SM, 1999. Cellular and Genetic Responses of Plants to Sugar Starvation. *Plant Physiology*, 121: 687-693

Yu TS, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, Lue WL, Hegemann B, Tung SY, Umemoto T, Chapple A, Tsai DL, Wang SM, Smith AM, Chen J, Smith SM, 2005. α -Amylase Is Not Required for Breakdown of Transitory Starch in *Arabidopsis* Leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 9773-9779

Yuan G, Sun B, Yuan J, Wang Q, 2010. Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality, antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets. *Food Chemistry*, 118: 774-781

Zaicovski CB, Zimmerman T, Nora L, Roos Nora F, Silva JA, Rombaldi CV, 2008. Water stress increases cytokinin biosynthesis and delays postharvest yellowing of broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 436-439

Zavaleta-Mancera HA, Thomas BJ, Thomas H, Scott IM, 1999. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves; II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1683-1689

Zeeman SC, Smith SM, Smith AM, 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal*, 401: 13-28

Zeiger E y Taiz L. 2002. Capítulo 16. *Growth and development. Plant Physiology*, segunda edición. Editorial Sinauer, pág. 661.

Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE, 1999. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signalling potential, and seedling survival. *Plant Physiology*, 121: 599-608

Zhang, Y., T. W. Kensler, C. G. Cho, G. H. Posner, and P. Talalay, 1994: Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 91: 3147-3150

Zhang X, Zhang Z, Li J, Wu L, Guo J, Ouyang L, Xia Y, Huang X, Pang X, 2011. Correlation of leaf senescence and gene expression/activities of chlorophyll degradation enzymes in harvested Chinese flowering cabbage (*Brassica rapa* var. *parachinensis*). Journal of Plant Physiology, 168: 2081-2087

Zimmermann P, Zentgraf U, 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. Cellular & Molecular Biology Letters, 10: 515-534