



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

"Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre"

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA
ASOCIADA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSA (*Rosa hybrida* L).**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA
NADIA ZENIL LUGO.

Diciembre de 2013.
Chapingo, Estado de México



**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA ASOCIADA AL
ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSA (*Rosa hybrida* L.).**

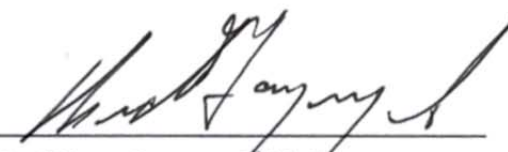
Tesis realizada por Nadia Zenil Lugo bajo la dirección del comité asesor indicado,
aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR


Dra. María Teresa Beryl Colinas León

ASESOR


Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR


Dra. María Teresa Martínez Damián

ASESOR


Dr. Juan Martínez Solís

LECTOR EXTERNO


Dr. Manuel Mandujano Piña

Chapingo, México, Diciembre de 2013.

AGRADECIMIENTOS

A **mi padre y Señor Jesucristo** por su gracia, por su amor y por haber dejado una puerta abierta para mí, la cual nadie pudo cerrar, porque en mis fuerzas era imposible lograrlo.

Al **Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo** por haberme dado la oportunidad de estudiar un Doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al pueblo de México** por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

A la **Dra. María Teresa Colinas León** por haberme estimulado a terminar, por su amistad, apoyo incondicional, y por creer que lo podía lograr.

Al **Dr. Héctor Lozoya Saldaña, a la Dra. Ma. Teresa Martínez Damián, al Dr. Juan Martínez Solís y al Dr. Manuel Mandujano Piña** por apoyarme desinteresadamente, por su tiempo, su dedicación y por sus aportaciones durante mi estancia en el Doctorado, en la revisión del escrito y en el proceso de trámites.

Al **Q.F.B. Cecilio Bautista Bañuelos** por su amistad, su tiempo, experiencia y esfuerzo dedicado en la fase del establecimiento del experimento y de laboratorio.

A mi esposo **Arturo Salgado** por apoyarme con las niñas, con la tesis, moralmente y económicamente para poder terminar mis estudios.

A mi papá **José Zenil** y hermanos: **Hugo, Luz, Nilze y Daniel** por su amor, ánimos y apoyo de todo tipo durante mi Doctorado y siempre.

A **Enedina Tránsito** y a la **Mra. Jose** por haberme apoyado a cuidar a las niñas, porque sin su ayuda no lo hubiera logrado.

A las siguientes personas por apoyarme durante el establecimiento del experimento:
Nilze, Rosita, Rosa Lidia, Perlita, Luis, Bengy y abuelita Rosita.

A mis herman@s en Cristo: **Rocio Salgado, Nancy, Mare, Elia, Angeles y Memo** por su amistad, oraciones y ánimos.

A mi amiga **Inés Figueroa** y a mi amigo **Teo** por su amistad, momentos de estudio y ayuda desinteresada en todo momento.

A **Karina**, secretaria de Fisiología Vegetal, a **Angeles** secretaria del Postgrado de Horticultura y a **Lalo** por ayudarme amablemente siempre y especialmente durante el proceso de los tramites.

Al Ing. **Anselmo Angel** por el material vegetal y negociar que se estableciera parte del experimento en la empresa Flores de Chiltepec, S. A. de C. V.

DEDICATORIA

A mi padre Celestial, a Aby y a Arce.

*“¿Se olvidará la mujer de lo que dio a luz, para dejar de compadecerse del fruto de su vientre?
Aunque olvide ella, yo nunca me olvidare de ti” Isaías 49:15*

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora de la presente Tesis, nació en la comunidad de San Nicolás, Jacala, Hidalgo, México, el 22 de Junio de 1977. Realizó sus estudios de Educación Superior en la Universidad Autónoma Chapingo, donde cursó la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia del año 1996 al 2000. Trabajó como gerente de ventas de invernaderos en la empresa ACEA, S, A, de C, V en el año 2002 y la mitad del 2003. Realizó la Maestría en Fisiología Vegetal en el Colegio de Postgraduados en el periodo 2003-2005. En el 2008 ingreso al Doctorado en Ciencias en Horticultura en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA ASOCIADA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSA (*Rosa hybrida* L)

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION ASSOCIATED TO OXIDATIVE STRESS IN ROSE (*Rosa hybrida* L)

Nadia Zenil Lugo¹, Ma. Teresa Colinas León²

RESUMEN GENERAL

Con el propósito de entender mejor el efecto de las soluciones preservantes sobre el estrés oxidativo en tallos florales de rosa, se hicieron dos experimentos. En el primero se ensayó Floralife[®] 200a nivel productor junto con Crysall[®] T bag y HQCa nivel consumidor. Se midió la vida de florero (VF), el contenido de fenoles totales (CFT) y la capacidad antioxidante total (caT) mediante dos métodos: DPPH y ABTS en hoja y en pétalo. La VF fue de: 13, 11 y 9 días para los tratados con Crysall[®], HQC y el testigo, respectivamente y se relacionó con la mayor caT y CFT en hoja, los métodos se correlacionaron positiva y significativamente entre sí ($r=0.91^{**}$) en hoja y ($r=0.93^{**}$) en pétalo. En el segundo experimento se probaron tres preservantes a nivel productor: Benzoato de sodio, Cystar[®] y Floralife[®] 200 y se evaluó la actividad enzimática de peroxidasa (POD), polifenol oxidasa (PO), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), la caT, el CFT, antocianinas y la peroxidación lipídica de las membranas celulares en hoja. Los tallos florales del testigo y los tratados con benzoato tuvieron una VF de 3 días, con Cystar de 4.4 y con Floralife[®] de 5.8. La mayor VF se relacionó con una mayor caT, CFT, alta actividad de la SOD y la CAT, menor actividad de la POD y POL, menor peroxidación lipídica de la membrana y contenido de antocianinas. Estos resultados sugieren que la aplicación de soluciones preservantes comerciales mejoran las defensas antioxidantes, estabilizan la membrana y retrasan la senescencia.

Palabras adicionales: *Rosa hybrida* L, actividad enzimática, antioxidantes no enzimáticos, preservantes.

GENERAL ABSTRACT

In order to understand the effect of preservative solutions in the antioxidant response of rose flower stems, two experiments were undertaken. In the first, Floralife[®] 200 at the producer level together with Crysall T[®] bag and HQC at consumer level was tested. Variables evaluated were vase life (VF), total phenol content (CFT) and the total antioxidant capacity (caT) using two methods DPPH and ABTS in leaf and petal. The VF was of 13, 11 and 9 days for stems treated with CHRYSAL, HQC and the control, respectively, and it was related with a higher caT and CFT in leaf, both methods were correlated positively and significantly ($r=0.91^{**}$) in leaf and ($r=0.93^{**}$) in petal. In the second experiment three solutions were tried: Benzoate, Cystar[®] and Floralife[®] 200, enzymatic activity of peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PO), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), caT, CFT, anthocyanins and membrane peroxidation were evaluated in leaves. Floral stems of the control and those treated with benzoate had a VF of 3 days, with Cystar[®] of 4.4 days and with Floralife[®] of 5.8 days. The highest VF was related to a higher caT, CFT, higher activities of SOD and CAT, lower activities of POD and PO, lower membrane peroxidation and anthocyanin content. These results suggest that commercial preservative solutions improve anti-oxidative defense, stabilize membrane integrity leading to a delay in senescence.

Key words: *Rosa hybrida* L, enzymatic activity, non-enzymatic, antioxidants, preservative solutions.

¹ Tesista

² Directora

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	v
DATOS BIOGRÁFICOS	vi
RESUMEN GENERAL Y GENERAL ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2 FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE LOS ENSAYOS DPPH/ABTS EN ROSA EN SOLUCIONES PRESERVANTES.....	4
2.1 RESUMEN	5
2.2 ABSTRACT.....	6
2.3 INTRODUCCIÓN	7
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
2.6 CONCLUSIONES	24
2.7 LITERATURA CITADA	24

3. ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSAS DE CORTE EN SOLUCIONES PRESERVANTES	29
3.1 RESUMEN	30
3.2 ABSTRACT.....	31
3.3 INTRODUCCIÓN	32
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.6 CONCLUSIONES	61
3.7 LITERATURA CITADA.....	62
4 CONCLUSIONES GENERALES	69
5 LITERATURA CITADA GENERAL	69
6 ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

1. FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIDA MEDIANTE LOS ENSAYOS DPPH/ABTS EN ROSA EN SOLUCIONES PRESERVANTES

- Cuadro 1. Capacidad antioxidante total (caT) determinada por los métodos ABTS y DPPH y contenido de fenoles totales de hoja y pétalo de rosa ‘Freedom’ tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero. n=4.....17
- Cuadro 2. Comparación de medias entre hoja y pétalo de la capacidad antioxidante total (caT) determinada por los métodos DPPH y ABTS y contenido de fenoles totales de rosa ‘Freedom’ tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.....19
- Cuadro 3. Coeficientes de correlación lineal entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante total (caT) determinada por los métodos DPPH y ABTS en hojas y pétalos de rosa ‘Freedom’ tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.....20
- Cuadro 4. Coeficientes de correlación lineal entre los ensayos ABTS y DPPH, en hojas y pétalos de rosa ‘Freedom’ tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.....23

2. ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSAS DE CORTE EN SOLUCIONES PRESERVANTES

- Cuadro 1. Comparación de medias de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife®. en un pulso de 24 h, a los 1, 2, 3 y 4 días después de florero, n=4.....50
- Cuadro 2. Comparación de medias de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife®. en un pulso de 24 h, a los 1, 2, 3 y 4 días después de florero, n=4.53

Cuadro 3. Comparación de medias del contenido de malondialdehído (MAD) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife®. en un pulso de 24 h, a los 1, 2, 3 y 4 días después de florero, n=4.	58
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

1 FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIDA MEDIANTE LOS ENSAYOS DPPH/ABTS EN ROSA EN SOLUCIONES PRESERVANTES

Figura 1. Tallos florales de Rosa hybrida L, cultivar Freedom	10
Figura 2. Curva estándar del antioxidante de referencia Trolox para: a) ABTS y b) DPPH.....	14
Figura 3. Tallos florales de rosa “Freedom” tratados con: a) agua, b) CHRYSAL y c) HQC a los 9, 11 y 13 días de florero (ddf). Misma letra por día son estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$).	15

2 ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSAS DE CORTE EN SOLUCIONES PRESERVANTES

Figura 1. Comparación de medias de vida de florero de flores de rosa “Freedom”, en tres soluciones preservantes: Benzoato de sodio, Cystar® y Floralife® Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$, $n=10$).	42
Figura 2. Tallos florales de rosa tratados con: a) agua, b) Benzoato de sodio, c) Floralife® y d) Cystar® al día 3 de florero (ddf).	44
Figura 3. Tallos florales de rosa tratados con: a) agua, b) Benzoato de sodio, c) Floralife® y d) Cystar® al día 4 de florero (ddf).	44
Figura 4. Capacidad antioxidante total (a) y contenido de fenoles totales (b), de tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife® en un pulso de 24 h.....	47

Figura 5. Comparación de medias del contenido de antocianinas de tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife® en un pulso de 24 h, a los 1, 2, 3 y 4 ddf. Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$, $n=4$).	49
Figura 6. Actividad enzimática de la SOD en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife® en un pulso de 24 h.	52
Figura 7. Actividad enzimática de la POL y la POD en tallos florales de rosa “Freedom” con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife® en un pulso de 24 h.	56
Figura 8. Contenido de malondialdehído (MAD) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife®. en un pulso de 24 h	60

ÍNDICE DE ANEXOS

A. FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIDA MEDIANTE LOS ENSAYOS DPPH/ABTS EN ROSA EN SOLUCIONES PRESERVANTES

Cuadro 1A. Cuadrados medios y significancia estadística en hoja para las variables capacidad antioxidante total (caT) medida mediante los ensayos ABTS y DPPH y fenoles totales de tallos florales de rosa “Freedom” a los 3, 6, 9 y 11 días de florero	71
Cuadro 2A. Cuadrados medios y significancia estadística en pétalo para las variables capacidad antioxidante total (caT) medida mediante los ensayos ABTS y DPPH y fenoles totales de tallos florales de rosa “Freedom” a los 3, 6, 9 y 11 días de florero	72
Figura 1A. Capacidad antioxidante total medida por los métodos a) ABTS y b) DPPH en mM de TEAC g-1 de PF y contenido de fenoles en mg de ácido tánico g-1 de PF (c), en hoja y pétalos de rosa en dos soluciones pulso y el testigo	73

B. ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSAS DE CORTE EN SOLUCIONES PRESERVANTES

Cuadro 1B. Cuadrados medios y significancia estadística al día 1 de florero para las variables: capacidad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas, MAD, SOD, CAT, POD y POL en tallos florales de rosa “Freedom”.	74
Cuadro 2B. Cuadrados medios y significancia estadística al día 2 de florero para las variables: capacidad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas, MAD, SOD, CAT, POD y POL en tallos florales de rosa “Freedom”.	74
Cuadro 3B. Cuadrados medios y significancia estadística al día 3 de florero para las variables: capacidad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas, MAD, SOD, CAT, POD y POL en tallos florales de rosa “Freedom”.	75

Cuadro 4B. Cuadrados medios y significancia estadística al día 4 de florero para las variables: capacidad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas, MAD, SOD, CAT, POD y POL en tallos florales de rosa “Freedom”.....	75
Cuadro 5B. Comparación de medias de la capacidad antioxidante total (caT), contenido de fenoles totales, actividad de la peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (POL) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife®. en un pulso de 24 h.....	76

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La rosa (*Rosa hybrida* L) pertenece a la familia de las rosáceas y es la más demandada en todo el mundo (Khalighi, 2010). Es usada con propósitos decorativos y es apreciada por su belleza, delicadeza y aroma (Elgimabi, 2010). También es reconocida por su alto valor económico, especialmente es utilizada como materia prima en la industria de cosméticos y perfumes. Adicionalmente juega un rol vital en la manufacturación de varios productos de importancia medicinal y nutricional. Sin embargo, la principal idea del cultivo de la rosa es obtener flores de corte (Butt, 2003).

En las rosas de corte, como resultado del proceso natural de senescencia, así como de los diferentes tipos de estrés a los que son sometida durante su almacenamiento y transporte, se presenta un incremento de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y una pérdida de la capacidad antioxidante (Zimmermann y Zentgraf, 2004). Las ERO son altamente dañinas para la célula, ya que al reaccionar con los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, estos modifican su estructura y función y ocasionan alteraciones metabólicas que conducen a la muerte celular (Sato *et al.*, 2001), lo cual disminuye la calidad, vida de anaquel y valor comercial de las rosas (Hodges *et al.*, 2004).

Con el fin de proteger a las membranas y organelos celulares de los efectos dañinos causados por las ERO, la planta posee mecanismos de defensa antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos distribuidos en los organelos celulares. Enzimas tales como la Superóxido Dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6),

Peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7), Ascorbato Peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y Glutación Reductasa (GR, EC 1.6.4.2) son ejemplos de mecanismos enzimáticos (Mittler *et al.*, 2004); mientras que moléculas de bajo peso molecular como los fenoles, ascorbato, glutatión, α -tocoferol y β -caroteno, pertenecen a los mecanismos no enzimáticos (Bowler *et al.*, 1994).

Los antioxidantes son compuestos que retardan o previenen la oxidación de otras moléculas y su papel principal es terminar con las reacciones de oxidación e inhibir otras reacciones oxidándose ellos mismos. Un aumento en los mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, es determinante en la protección contra el estrés oxidativo (Foyer y Noctor, 2005). Algunos productos como la adenina, el benzoato, el manitol, formato y tiourea son eliminadores de radicales hidroxilo, por lo que su utilización en soluciones experimentales puede minimizar o eliminar los efectos nocivos de dichos radicales, disminuir el estrés oxidativo y mantener por más tiempo la vida de las flores de corte (Toivonen, 2004).

El estrés oxidativo en frutos y vegetales se puede detectar tanto directamente por medio de la acumulación de ERO, incremento de los productos de la peroxidación de los lípidos, incremento en la permeabilidad de la membrana o acumulación de pigmentos oscuros; o indirectamente por los cambios en los componentes antioxidantes o en los sistemas enzimáticos antioxidantes (Toivonen, 2004).

Las rosas son flores de corte de gran importancia comercial; y de ahí que muchos estudios han sido dirigidos para mantener su calidad después de la cosecha (Yamada *et al.*, 2007). Sin embargo, son pocos los estudios de los sistemas antioxidantes relacionadas con esta especie. El impacto del estrés oxidativo sobre la calidad de las flores de corte hacen que se requiera más información de los antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos; así como también de los productos utilizados en los tratamientos dirigidos a reducir el estrés oxidativo (Gene, 2004). Dicha información proporcionará un mejor entendimiento de los mecanismo de la senescencia (Kumar *et al.*, 2008), y ayudará a mantener por más tiempo la calidad y vida poscosecha de las flores (Gene, 2004). El objetivo del presente trabajo fue evaluar distintas soluciones preservantes como pulso por 24 h, sobre: 1) algunos componentes antioxidantes, 2) la capacidad antioxidante total, 3) la peroxidación lipídica, 4) los sistemas enzimáticos de las enzimas polifenol oxidasa (POL), peroxidasa (POD), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y 5) la vida de floreo de rosas de corte “Freedom”

**2 FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA
MEDIANTE LOS ENSAYOS DPPH/ABTS EN ROSA EN SOLUCIONES
PRESERVANTES**

2.1 RESUMEN

Tallos de rosa 'Freedom' se evaluaron en dos soluciones preservantes: 8-citrato de hidroxiquinoleína (HQC) y Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag (Chrysal[®]) en un pulso de 24 h a temperatura ambiente (24 ± 2 °C, 60-70 % HR) y agua como testigo. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue un tallo floral. Se evaluó la vida de florero, el contenido de fenoles totales con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante total (caT) con los ensayos DPPH y ABTS tanto en hoja como en pétalo. Se realizó el ANOVA y correlaciones simples entre la caT y el contenido de fenoles, y entre ambos ensayos. Los resultados muestran que las soluciones preservantes promueven un aumento en la caT y contenido de fenoles totales en hoja, pero no en pétalo. Las hojas de los tallos florales tratados con Chrysal[®] presentaron los mayores contenidos de fenoles totales y caT, mientras que el testigo los menores. La vida media de florero fue de: 13, 11 y 9 días para los tratados con Chrysal[®], HQC y el testigo, respectivamente. El contenido de fenoles totales presentó una relación positiva ($\alpha \geq 0.01$) con la caT: 0.87 y 0.85 medida con el ABTS y 0.92 y 0.85 con el DPPH en hoja y pétalo respectivamente y también ambos métodos se correlacionaron entre sí positiva y significativamente ($r = 0.91$) en hoja y ($r = 0.93$) en pétalo.

Palabras claves: *Rosa hybrida* L, estrés oxidativo, vida de florero 'Freedom'.

2.2 ABSTRACT

Stems of 'Freedom' roses were treated with pulse solutions of 8-hydroxyquinoline citrate (HQC) and Chrystal CLEAR Professional 2® T-bag for 24 h at room temperature (24 ± 2 °C and 60-70 % RH) and compared to the control. A completely random experimental design with 4 replicates was used. The experimental unit was a stem. Vase life was evaluated; total phenol content was estimated with the Folin-Ciocalteu colorimetric assay and total antioxidant capacity (caT) with the assays of DPPH and ABTS in leaf and petal. Variance analysis and simple correlations between antioxidant capacity, phenol content and both methods were done. Results showed that the solutions induced an increase in caT and phenol content in leaf but not in petal. Leaves of floral stems treated with Chrysal® showed the highest phenol content and caT, and the control the lowest. The average vase life was of 13, 11 and 9 days for stems treated with Chrysal®, HQC and the control, respectively. Total phenol content showed a close positive relation ($\alpha \geq 0.01$) with the caT 0.87 and 0.85 measured with ABTS, and 0.92 and 0.85 with DPPH in leaf and petal respectively and both methods were also correlated between them in a positive and significant way for leaf ($r= 0.91$) and petal ($r= 0.93$).

Keys words: *Rosa hybrida* L, oxidative stress, vase life, 'Freedom'.

2.3 INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo se presenta cuando se rompe el equilibrio entre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los niveles de antioxidantes (del Río *et al.*, 1998). Las plantas aún cuando se encuentren en condiciones óptimas producen en muchos de sus procesos metabólicos ERO tales como: radicales superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (HO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (O^1) (Jin *et al.*, 2006), a pesar de esto los mecanismos de defensa antioxidantes proporcionan una protección adecuada contra ellas (del Río *et al.*, 1998).

Durante el manejo postcosecha de las rosas de corte, las ERO se incrementan como resultado del proceso natural de senescencia (Kumar *et al.*, 2008), así como de los diferentes tipos de estrés a los que son sometidas durante su almacenamiento y transporte (Hodgest, 2004). Para contrarrestar los efectos de las ERO las plantas poseen mecanismos bien definidos, los cuales incluyen la activación de enzimas antioxidantes (Jaleel *et al.*, 2006) y antioxidantes no enzimáticos tales como los carotenoides, ácido ascórbico y compuestos fenólicos (Mittler, 2002).

La vida de florero de las rosas (*Rosa hybrida* L.) es generalmente corta (Talebi *et al.*, 2013), para incrementarla se han desarrollado soluciones preservantes de gran aceptación comercial, los más efectivos en lograrlo son los que se usan a nivel consumidor (Ichimura *et al.*, 2006). En clavel (*Dianthus caryophyllus*) y crisantemo (*Dendratema morifolium*) se demostró que la utilización de soluciones preservantes por

tiempos cortos entre 3 y 24 horas con compuestos que actúen como secuestradores de radicales libres disminuyen los niveles de ERO e incrementan la vida de florero (Baker *et al.*, 1977, Zhang y Guo 1998) ya que aumentan los niveles de antioxidantes y enzimas implicadas en la defensa (Zhang y Guo, 1998).

Los métodos analíticos utilizados para determinar los niveles de antioxidantes dependen de los tipos de compuestos de interés. Los antioxidantes pueden ser analizados ya sea como un grupo funcional, grupos de antioxidantes o como antioxidantes individuales. Como grupo funcional pueden ser cuantificados como la capacidad antioxidante total (caT) con cualquiera de los siguientes ensayos: ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo), DMPD (Dicloridrato de N, N-Dimetilpifenilendiamina), FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Ferrica), ORAc (Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno), TRAP (Potencial Antioxidante Reactivo Total), procedimientos quimioluminiscentes y ensayo antioxidante celular (Lako *et al.*, 2008), siendo los más usados el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico y el 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (Kuskoski *et al.*, 2005). Como grupo de antioxidantes, los principales ensayos incluyen la determinación del contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu y el contenido total de antocianinas por diferencia de pH y espectrofotometría. Mientras que técnicas como la cromatografía de gases, electroforesis capilar y cromatografía líquida con detección ultravioleta se utilizan para determinar los antioxidantes individuales en frutos, vegetales y otros extractos de plantas (Lako *et al.*, 2008).

Wang *et al.* (1996), mencionan que la propiedades antioxidantes de algunos vegetales y frutos se deben particularmente al bajo peso molecular de los compuestos fenólicos, los cuales se conocen como potentes antioxidantes. Es por ello que en los últimos años ha habido un creciente interés en el campo de la nutrición, salud y medicina en los extractos crudos de frutas, vegetales, semillas, hojas, raíces y corteza ricos en fenoles. Sin embargo, en otros campos de investigación como la fisiología y tecnología postcosecha y en particular de las ornamentales, hay pocos estudios disponibles y las investigaciones son incipientes (Kahkonen *et al.*, 1999, Toivonen 2004, Jin *et al.*, 2006). De ahí que esta investigación tuvo por objetivos: evaluar el efecto de dos soluciones preservantes sobre la vida de florero, la capacidad antioxidante total y el contenido de fenoles totales; así como determinar la correlación entre el contenido de fenoles y la caT y entre los métodos ABTS y DPPH en pétalos y hojas de rosa.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se cosecharon tallos florales de rosa ‘Freedom’ (Figura 1), cultivados en invernadero en Chiltepec, Estado de México. Las flores se cortaron por la mañana entre 7:00 y 8:00 am, se les aplicó Floralife[®] 200 como solución pulso en la dosis que recomienda el producto. Se almacenaron en seco en la cámara fría a 2.5 °C, para disminuir el calor de campo y al día siguiente se trasladaron al laboratorio.



Figura 1. Tallos florales de *Rosa hybrida* L, cultivar Freedom

Organización experimental

Los análisis de laboratorio se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México. Llegados los tallos florales, se cortaron a una longitud de $70\text{ cm} \pm 1$, se defoliaron 20 cm en la base y se colocaron en agua (pH 8.1, CE 0.28 milimhos) por 2 h para hidratarlos. Pasando este tiempo se les aplicó los tratamientos descritos abajo. Una vez aplicados los tratamientos, a los tallos se les cortó un centímetro de la base y se colocaron individualmente en probetas graduadas de 250 mL conteniendo agua de la llave suficiente para cubrir aproximadamente unos 8-10 cm del tallo, y se cambió ésta cada tercer día. Se realizó un muestreo destructivo antes de aplicar los tratamientos y a los 3, 6, 9 y 11 días de aplicados éstos. Las muestras tanto de pétalos como de hojas se guardaron en bolsas de plástico a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Se midió la vida de florero, la caT y el contenido de fenoles totales.

Diseño de tratamientos

Se aplicaron dos preservantes como soluciones pulso por 24 h a temperatura ambiente (24 ± 2 °C): a) citrato de 8-hidroxiquinoleína (HQC), un germicida efectivo utilizado en flores de corte (Reid, 2002), a 200 mg L^{-1} y b) Chrysal® CLEAR Professional 2 T-bag Floralife (CHRYNAL) el cual se preparó según las indicaciones del fabricante (una bolsa en 4 litros de agua) y adicionalmente se tuvo el testigo, solo agua (pH 8.1, CE 0.28 milimhos).

Obtención del extracto

Los pétalos se liofilizaron. Las hojas se evaluaron al salir de congelación, se les eliminó el margen y la vena central y el resto se trituró finamente. Se pesaron 0.05 g de hoja y 0.005 g de pétalo; en ambos casos se adicionaron 10 mL de una solución etanol: agua destilada al 70 %, el extracto de hoja se homogeneizó en frío con un homogeneizador IKAT-25® y se utilizó inmediatamente, en tanto que el de pétalo se agitó con un agitador Vortex®, se tapó con parafilm® y se dejó reposar por 18 horas en refrigeración a 4 °C. Se prepararon dos extractos: uno para evaluar la caT y otro para los fenoles totales.

Variables evaluadas

Vida de florero. Se contó a partir del día en que las flores se colocaron en probetas hasta que el 50% del total de los tallos florales por tratamiento presentaron al menos uno de los siguientes síntomas de senescencia: 1) cabeceo, ruptura y/o ahorcamiento del tallo

floral, 2) marchitamiento y/o caída de pétalos y 3) abertura del botón floral excesiva o nula (Mor, 1989).

Contenido de Fenoles Totales. Se utilizó el método descrito por Waterman y Mole (1994). Se tomaron 300 μ L del sobrenadante del extracto, 7.7 mL de agua destilada, 0.5 mL de Folin-Ciocalteu, después de 1 min y antes de 8 min se agregaron 1.5 mL de carbonato de sodio al 20%. Esta mezcla se agitó, se dejó reposar 2 h en oscuridad y se tomó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Genesys[®] UV10). La cuantificación de los fenoles se realizó mediante una curva patrón de 20, 30, 40, 60 y 80 μ g de ácido tánico. Los resultados se reportaron en mg de ácido tánico por gramo de peso fresco (PF) ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de PF).

Capacidad Antioxidante Total

Mediante el ensayo ABTS. Se siguió la metodología descrita por Kuskoski *et al.* (2005), con modificaciones de Ozgen *et al.* (2006) y Thaipong *et al.* (2006). Este método evalúa la actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{*+}) con el antioxidante presente en la muestra. El radical se obtuvo tras la reacción del ABTS^{*+} (7 mM) en buffer acetato de sodio 20 mM (pH 4.5) y persulfato de potasio (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) y bajo oscuridad por 16 h y diluido en el mismo buffer hasta obtener una absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 734 nm. La solución stock se mantiene estable a 4 °C por varias semanas y la dilución hasta por 72 horas (Ozgen *et*

al., 2006). Para el ensayo se colocaron 100 μL del extracto diluido (1: 5 con etanol agua 70 %) en tubos de fondo plano, se adicionaron 3900 μL del radical ABTS^{*+} diluido, se agitaron manualmente y se dejaron reposar 2 h en la oscuridad, ya que según Ozgen *et al.* (2006) un tiempo de reacción largo provee una mejor estimación que un corto usando cualquiera de los dos métodos. Se dispuso de una curva de calibración donde el antioxidante sintético de referencia Trolox 1500 μM en etanol al 70 %, se ensayó a una concentración de 0, 150, 300, 450, 600 y 750 μM (Thaipong *et al.*, 2006) en las mismas condiciones (100 μL de Trolox en 3900 μL del radical ABTS^{*+}) (Figura 2).

Mediante el ensayo DPPH. Para el método del DPPH se siguió la metodología citado por Kuskoski *et al.* (2005). Se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical 2,2-difeni 1-1-picrilhidracilo ($\text{DPPH}^{\bullet}$) el cual se reduce en presencia de antioxidantes manifestándose un cambio de color. De forma similar al ABTS, se colocaron 100 μL de la muestra sin diluir en tubos de fondo plano, se adicionaron 3900 μL del radical $\text{DPPH}^{\bullet}$ 100 μM diluido en metanol al 80 %, se agitaron y se mantuvieron en oscuridad por 2 h. La solución stock del radical $\text{DPPH}^{\bullet}$ se preparó diariamente. La curva de calibración se realizó usando Trolox 1500 μM como estándar a una concentración de 0, 300, 600, 900, 1200 y 1500 μM en etanol al 70 % (Thaipong *et al.*, 2006), en las mismas condiciones (100 μL de Trolox en 3900 μL del radical $\text{DPPH}^{\bullet}$). La concentración de $\text{DPPH}^{\bullet}$ en el medio de reacción se calculó por regresión lineal entre la absorbancia (nm) y el porcentaje de inhibición (%) ya que la lectura del radical $\text{DPPH}^{\bullet}$ recién preparado varia ± 40 nm (Figura 2). Para ambos métodos, los resultados se expresaron como actividad antioxidante equivalentes de Trolox (TEAC) en mM de equivalentes de Trolox por gramo de peso fresco (PF) ($\text{mM TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ de PF).

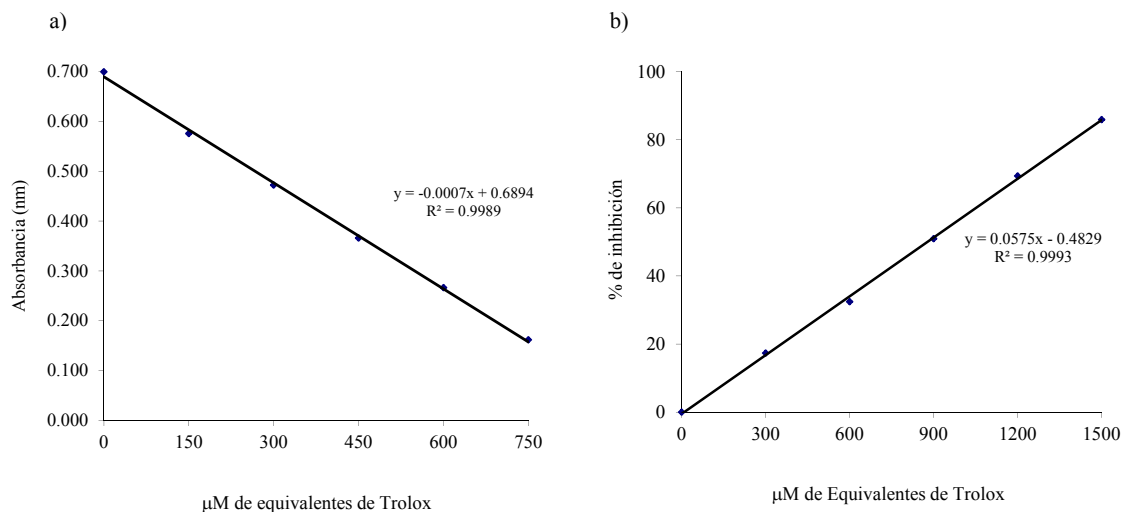


Figura 2. Curva estándar del antioxidante de referencia Trolox para: a) ABTS y b) DPPH.

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental estuvo representada por un tallo floral contenido en una probeta. Para el análisis bioquímico cada muestra se evaluó por cuatuplicado. El análisis de varianza se hizo con el paquete estadístico SAS[®] versión 9.0 (SAS, 2002), y la comparación de medias con la prueba Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante total medida por los ensayos ABTS y DPPH y entre ambos ensayos.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Vida de florero

La vida de florero de los tallos florales tratados con HQC y Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag fue de 11 y 13 días, respectivamente; mientras que la del testigo fue de 9 días (Figura1). Esto coincide con los resultados de Lukaszewska (1997) y Juárez *et al.* (2008), quienes demostraron la efectividad para mantener por más tiempo la vida de florero del HQC 200 mg.L⁻¹ en *Nerinebowdinne* y del Chrysal RVB[®] en rosa ‘Black magic’, respectivamente.

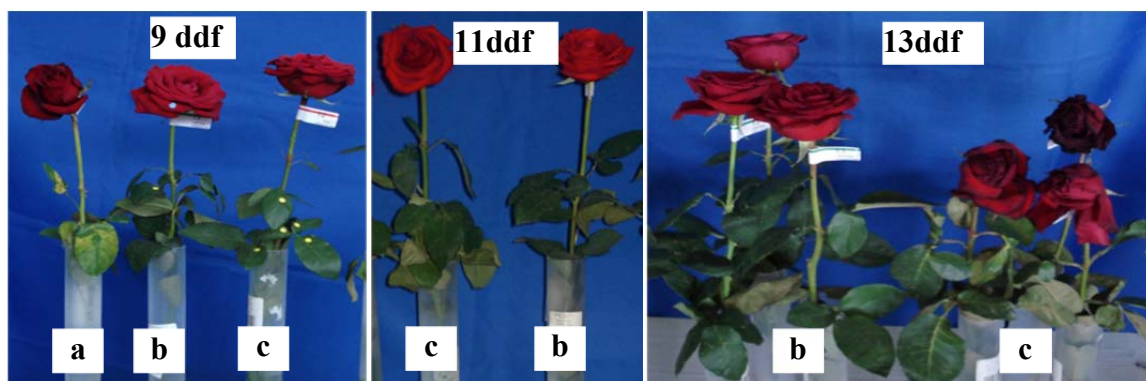


Figura 3. Tallos florales de rosa “Freedom” tratados con: a) agua, b) CHRYSAL y c) HQC a los 9, 11 y 13 días de florero (ddf). Misma letra por día son estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$).

Capacidad Antioxidante Total y Contenido de Fenoles Totales

Como resultado de la aplicación de las soluciones preservantes los tallos florales de rosa mantuvieron una mayor capacidad antioxidante total y contenido de fenoles totales en

hojas, pero no en pétalo ($\alpha \leq 0.05$) (Cuadro 1, Figura 1A), lo anterior se explica debido a que el deterioro de las hojas es más lento y puede ser revertido, como ocurre con la aplicación de algunos preservantes, mientras que la senescencia en pétalos es rápida e irreversible (Rubinstein, 2000, Arora, 2008).

Las hojas de los tallos tratados con Chrysal CLEAR Professional 2[®] T-bag presentaron mayor caT medida por ambos métodos y mayor contenido de fenoles totales que el testigo todos los días de medición, mientras que los tratados con HQC únicamente el día 6, pero igual al CHRYSAL. Al día 11, en el cual solo quedaban los tallos tratados con las soluciones preservantes, el mayor contenido de fenoles y de caT se registró en el tratamiento con CHRYSAL, con diferencias significativas en hoja, aunque no en flor (Cuadro 1), a las vez que duraron 2 días más en florero que los tratados con HQC.

Según Howard *et al.*, (2000), el contenido de compuestos fenólicos presentes en los vegetales está influenciado por el tipo de cultivar, las condiciones agronómicas, estado de madurez, así como el manejo y tratamientos postcosecha a los que son sometidos. Lama *et al.* (2013), reportaron que la aplicación de 8-HQS (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) más ácido cítrico (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y 5% de sacarosa en *Rosa hybrida* L. ‘Sunpari’, incrementó el contenido de fenoles totales y de capacidad antioxidante total hacia el final de la senescencia prolongando la vida de florero por 4 días. En otro estudio, González-Aguilar y Zavaleta-Mancera (2012), reportaron que la aplicación de CaCl_2 a la solución de florero de dos variedades de gerbera promovió la acumulación de fenoles y retraso la senescencia. Yuping (2009), reportó que el tratamiento con ácido salicílico amplió

perceptiblemente la vida del florero de flores de Gerbera (*Gerbera jamesonii*) ya que aumentó la actividad antioxidante enzimática, retrasó el inicio de la hidrólisis de la actividad antioxidante y de los componentes estructurales de la célula.

Cuadro 1. Capacidad antioxidante total (caT) determinada por los métodos ABTS y DPPH y contenido de fenoles totales de hoja y pétalo de rosa ‘Freedom’ tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.

Ddf/Tratamiento	Hoja			Pétalo		
	ABTS	DPPH	Fenoles	ABTS	DPPH	Fenoles
Día 1	2,050	1,493	15.30	4,566.82	3,372.81	33.24
Día 3						
CHRYSA	2,988 a	2,150 a	21.2 a	6,538 a	4,749 a	45.1 a
HQC	1,801 b	1,342 b	16.1 b	6,422 a	4,716 a	42.9 a
Testigo	1,701 b	1,215 b	14.4 b	5,978 a	4,170 a	40.5 a
DMSH	663	331	3.4	1,670	1,246	11.7
Día 6						
CHRYSA	4,395 a	2,736 a	32.2 a	5,631 a	4,099 a	34.1 a
HQC	3,178 a	2,253 a	29.2 a	5,623 a	3,971 a	33.0 a
Testigo	2,136 b	1,417 b	17.7 b	5,427 a	3,807 a	31.5 a
DMSH	1,201	706	8.8	1,973	1,370	11.9
Día 9						
CHRYSA	3,819 a	2,973 a	31.1 a	5,365a	4,122 a	35.2 a
HQC	3,090 ab	2,473 ab	25.51 ab	4,755 a	3,774 a	33.3 a
Testigo	2,340 b	1,800 a	19.8 b	4,606 a	3,306 a	31.6 a
DMSH	1,138	982	9.1239	1,322	1,008	12.7
Día 11						
CHRYSA	4346 a	2,422 a	22.3 a	8,748 a	5610 a	54.6 a
HQC	3406 b	1,880 b	19.1 b	5,345 a	4075 a	42.6 a
DMSH	831	512	2.7	5,352	2517	27.3

Valores con la misma letra en el sentido de columna por día son estadísticamente iguales, según Tukey ($p \leq 0.05$). Ddf= días de florero, HQC= citrato de 8- hidroxiquinoleína, CHRYSA= Chrysal CLEAR Professional 2® T-bag Floralife, Testigo= agua, DMSH= diferencia mínima significativa honesta, ABTS= caT determinada con el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+}), DPPH= caT determinada con el radical radical 2,2-difenil 1-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) en mM TEAC · g⁻¹ de PF) y fenoles en mg g⁻¹ de PF.

Similarmente en este estudio, se considera que un mayor contenido de fenoles y de la caT en las hojas de las rosas tratadas con las soluciones preservantes (Cuadro 1) pudo proteger las células del daño oxidativo y retrasó la senescencia. Scandalios (2005), sugiere que un aumento en la síntesis de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, ascorbato, α -tocoferol, carotenoides y fenoles disminuyen los daños oxidativos ocasionados por las ERO lo que se cree retarda el proceso de senescencia. Los compuestos fenólicos contrarrestan el efecto de los radicales libres, ya que poseen un amplio espectro de actividad bioquímica como antioxidantes y secuestradores de éstos (Proestos *et al.*, 2005).

Comparación entre los valores del ABTS y el DPPH

Los resultados muestran que para todos los días de medición en hoja y en pétalo, los valores obtenidos mediante el ABTS expresados como TEAC son mayores que los obtenidos con el ensayo del DPPH (Cuadro 1). Esto se explica, ya que el radical ABTS^{•+} por su baja selectividad reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real; mientras que el DPPH es más selectivo que el ABTS^{•+} y, a diferencia de éste, no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (Roginsky y Lissi, 2005).

Capacidad antioxidante total y contenido de fenoles totales en hoja y pétalo

En todos los días de medición, los pétalos presentaron mayor capacidad antioxidante total medida por ambos métodos y contenido de fenoles totales que las hojas ($\alpha= 0.05$)

(Cuadro 2). Estos resultados coinciden con Vinockur *et al.* (2006), quienes encontraron mayor actividad antioxidante en infusiones de tés de pétalos de rosa que en el té verde. Puesto que la relación entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante total tiende a ser lineal (Vinockur *et al.*, 2006), la mayor actividad antioxidante en infusiones de té de pétalos de rosa de color rojo fue debida a una mayor cantidad de compuestos fenólicos derivados del ácido gálico y de antocianinas, los cuales aportaron un 55 % y 10 % del contenido total, respectivamente, mientras que en el té verde la aportación del ácido gálico fue de 10 % y no se encontraron antocianinas

Cuadro 2. Comparación de medias entre hoja y pétalo de la capacidad antioxidante total (caT) determinada por los métodos DPPH y ABTS y contenido de fenoles totales de rosa ‘Freedom’ tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.

Ddf	ABTS	DPPH	Fenoles
Día 3			
Pétalo	6,313 a	4,545 a	42.8 a
Hoja	2,163 b	1,569 b	17.2 b
DMSH	632	469	4.1
Día 6			
Pétalo	5,560 a	3,959 a	32.9 a
Hoja	3,236 b	2,135 b	26.4 b
DMSH	863	549	5.5
Día 9			
Pétalo	4,909 a	3,734 a	33.4 a
Hoja	3,083 b	2,282 b	25.5 b
DMSH	664	486	5.6
Día 11			
Pétalo	7,047 a	4,843 a	48.6 a
Hoja	3,876 b	2,151 b	20.7 b
DMSH	2664	1253	11.8

Valores con la misma letra en el sentido de columna son estadísticamente iguales, según Tukey ($p \leq 0.05$). Ddf= días de florero. DMSH= diferencia mínima significativa honesta, ABTS= caT determinada con el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺), DPPH= caT determinada con el radical radical 2,2-difeni 1-1-picrilhidracilo (DPPH⁺) en mM TEAC $\cdot g^{-1}$ de PF y fenoles en mg $\cdot g^{-1}$ de PF.

Correlación entre la Capacidad Antioxidante Total y el contenido de Fenoles Totales

En el Cuadro 3 se observa una relación lineal positiva y significativa entre el contenido de fenoles totales y la caT obtenida mediante los ensayos DPPH y ABTS.

Cuadro 3. Coeficientes de correlación lineal entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante total (caT) determinada por los métodos DPPH y ABTS en hojas y pétalos de rosa ‘Freedom’ tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.

Correlación	Días de florero				
	3	6	9	11	Total
ABTS Y Fenoles					
Hoja	0.87*	0.93**	0.93**	0.97*	0.87**
Pétalo	0.93**	0.84*	0.96**	0.94*	0.85**
DPPH Y Fenoles					
Hoja	0.90**	0.95**	0.91**	0.93*	0.92**
Pétalo	0.87*	0.87*	0.93**	0.97*	0.85**

*,**=Significativo ($P \leq 0,05$ y $0,01$, respectivamente). ABTS= caT determinada con el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺), DPPH= caT determinada con el radical radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]).

El coeficiente de correlación (r) entre los fenoles y la caT medida con el ensayo ABTS fue de 0.87 y 0.85 y con el DPPH de 0.92 y 0.85 para hoja y pétalo, respectivamente. Dudonné *et al.* (2009), en un estudio en 30 especies diferentes de plantas, en las que se incluye *R. damasena*, encontraron entre la caT y el contenido de fenoles totales una r de 0.94 con DPPH y 0.97 con ABTS. Vinokur *et al.* (2006), también reportaron una correlación positiva y significativa de 0.79 con DPPH en 12 cultivares de rosa y Youwei y Younghong (2007) de 0.96 con ABTS en *R. rugosa*. Los compuestos fenólicos son

considerados el principal grupo fitoquímico que contribuye a la actividad antioxidante de las plantas (Balasundram *et al.*, 2006), esto explica la relación lineal positiva y significativa entre el contenido de fenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu y la caT obtenida por los ensayos DPPH y ABTS encontrada en este experimento (Cuadro 3). Dicha relación no fue completamente lineal ya que el método de Folin-Ciocalteu es específico para compuestos fenólicos y la actividad antioxidante también puede ser exhibida por compuestos no fenólicos (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). Además es posible que se presenten interacciones antagonistas o sinergistas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos que pueden afectar la actividad (Odabasoglu *et al.*, 2005).

Correlación entre los métodos DPPH y ABTS

Existen numerosos métodos publicados para medir la capacidad antioxidante total *in vitro*, que pueden clasificarse en dos tipos: ensayos basados en transferencia de átomos de hidrógeno y ensayos basados en la transferencia de electrones. Los primeros aplican un esquema de reacción competitiva, en el cual el antioxidante y el sustrato compiten por radicales peroxilo térmicamente generados; los segundos miden la capacidad de un antioxidante para reducir un oxidante, el cual cambia de color cuando se reduce. El cambio de la intensidad del color está correlacionado con la concentración de antioxidantes de la muestra. Ensayos basados en la transferencia de electrones incluyen la determinación de fenoles totales por reactivo de Folin-Ciocalteu, DPPH y ABTS (Huang *et al.*, 2005).

Los ensayos ABTS y DPPH han sido ampliamente utilizados para determinar la capacidad antioxidante de extractos de plantas ya que requieren equipos estándar, son los más fáciles de implementar y sus resultados son rápidos y reproducibles (Dudonne *et al.*, 2009; Kuskoski *et al.*, 2005). El ABTS se ha utilizado ampliamente con éxito para medir la actividad antioxidante de distintas sustancias, se considera un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable y presenta una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica. El ABTS^{*+} es un radical que una vez activado (oxidado) presenta varios máximos de absorción (414, 645, 734, 815 nm). Dicho ensayo es particularmente interesante en extractos vegetales debido a la absorción de la longitud de onda en 734 nm que al encontrarse próximo al espectro infrarrojo elimina interferencias de color (Li *et al.*, 2008). El método del DPPH se ha utilizado ampliamente para medir la actividad antioxidante debido al tiempo relativamente corto requerido para el análisis. El $\text{DPPH}^{\bullet}$ es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica, pero solo puede disolverse en medio orgánico (Kuskoski *et al.*, 2005).

A pesar de las diferencias metodológicas, los resultados obtenidos por ambos métodos permiten alcanzar conclusiones similares (Kuskoski *et al.*, 2005). Las correlaciones obtenidas entre ambos ensayos (ABTS y DPPH) fueron altamente significativas en los cuatro días de medición: 0.91 en hoja y 0.93 en pétalo (Cuadro 4). Dudonné *et al.* (2009), en extractos acuosos de 30 plantas, al correlacionar ambos métodos encontraron

resultados similares ($r= 0.91$). Lo cual indica que la capacidad antioxidante total de extractos de *Rosa hybrida* L, puede medirse indistintamente con cualquiera de estos ensayos. Dichos métodos se correlacionan entre si ya que se basan en una de las estrategias más aplicadas en la medida *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, la cual consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, por lo que el cambio de la intensidad del color ocurre de forma proporcional con la concentración de antioxidantes de la muestra (Kuskoski *et al.* (2005).

Cuadro 4. Coeficientes de correlación lineal entre los ensayos ABTS y DPPH, en hojas y pétalos de rosa ‘Freedom’ tratados con dos soluciones preservantes a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.

Correlación	Días de florero				
	3	6	9	11	Total
Hoja					
ABTS Y DPPH	0.98**	0.97**	0.90**	0.98**	0.91**
Pétalo					
ABTS Y DPPH	0.93**	0.93**	0.91**	0.97*	0.93**

*, ** = Significativo ($P \leq 0,05$ y $0,01$, respectivamente). ABTS= Capacidad antioxidante total determinada con el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺⁺), DPPH= Capacidad antioxidante total determinada con el radical radical 2,2-difeni 1-1-picrilhidracilo (DPPH*).

2.6 CONCLUSIONES

Los tallos florales de rosa tratados con las soluciones preservantes a nivel consumidor mantuvieron el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante total en sus hojas, lo cual se reflejó en el mantenimiento por más tiempo de la vida de florero. Tanto en pétalo como en hoja el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante total, así como los ensayos DPPH y ABTS se correlacionaron positiva y significativamente, por lo que dichos ensayos pueden utilizarse independientemente como métodos analíticos para determinar niveles de antioxidantes.

2.7 LITERATURA CITADA

- Arora, A. 2008. Biochemistry of flower senescence. pp 51-85. *In*: G. Paliyath; D. Murr; A.K. Handa and S. Lurie (Eds.). Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers. Wiley-Blackwell Publishing. Nueva Delhi.
- Baker, J. E.; Wang, C. Y.; Liberman, M. and Hardenburg, R. E. 1977. Delay of senescence in carnations by a rhizobitoxine analogue and sodium benzoate. *HortScience*. 12: 38-39.
- Balasundram, N.; Sundram, K and Sammar, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agroindustrial by products: Antioxidant Activity. Occurrence and Potential Uses. *Food Chem*. 99 (1): 191-203.
- del Río, L.A.; Pastori, G.M.; Palma J.M.; Sandalio L.M.; Sevilla, F.; Corpas, F.J.; Jiménez,A.; López-Huertas, E.; Hernández, J.A. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol*. 116: 1195-1200.

- Dudonné, S. X. Vitarc, P. Coutière, Woillez, M. and Mérillon, J. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1768-1774.
- González-Aguilar S. y Zavaleta-Mancera H., A. 2012. El CaCl_2 en la vida florero de gerbera: pigmentos, fenoles, lignina y anatomía del escapo. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3 (3): 539-551.
- Hodges, D. M.; Lester, G. E.; Munro, K. M. and Toivonen, P. M. A. 2004. Oxidative stress. Importance for postharvest quality. *HortScience*. 39: 924-929.
- Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H. and Villalon, B. 2000. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum Species*) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48(5): 1713-1720.
- Huang, D.J.; Ou, B. X. and Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem* 53(6): 1841-1856.
- Ichimura, K.; Taguchi, M. and Norikoshi, R. 2006. Extension of the vase life in cut roses by treatment with glucose, isothiazolinonic germicide, citric acid and aluminum sulphate solution. *Jpn. Agr. Res. Q.* 40: 263-269.
- Jaleel, C. A.; Gopi, R.; Alagu L., G. M. and Panneerselvam, R. 2006. Triadimefon induced changes in the antioxidant metabolism and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Sci.* 171: 271-276.
- Jin, J.; Shan, N.; Ma, N.; Bai, J. and Gao, J. 2006. Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha. *Postharvest Biol Technol.* 40: 236-243.
- Juárez H., P.; Colinas L. M., T.; Valdez A., L. A.; Espinosa F., A.; Castro B., R. y Cano G., G. V. 2008. Soluciones y refrigeración para alargar la vida postcosecha de rosa cv. "Black magic". *Rev. Fitotec. Mex.* 31(3):73-77.

- Kahkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S. and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agri. Food Chem.* 47:3954-3962.
- Kumar, N.; Srivastava, G. C. and Dixit K. 2008. Role of sucrose synthase and invertases during petal senescence in rose (*Rosa hybrida* L.). *J Hortic Sci Biotech.* 83: 520-524.
- Kuskoski E., M.; Asuero A., G.; Troncoso, A.; MMancini-Filho, J. and Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc.Tecnol.Aliment.* 25(4): 726-732.
- Lako, J.; Trenerry V., C. and Rochfort, S. 2008. Routine analytical methods for use in South Pacific regional laboratories for determining naturally occurring antioxidants in food. *Int. Food Res. J.* 15(3): 1-11.
- Lama, B.; Ghosal, M.; Kumar, G. S. and Mandal, P. 2013. Assessment of Different Preservative Solutions on VaseLife of Cut Roses. *Journal of Ornamental Plants* *Journal of Ornamental and Horticultural Plants.* 3 (3): 171-181
- Lukaszewska A., J. 1997. Improving keeping qualities of Nerine cut flowers with preservatives. *Acta Hort.* 430: 439-445.
- MacDonald-Wicks, L. K; Wood, L.G and Garg, M. L. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric.* 86(13): 2046-2056.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TrendsPlant Sci.* 7: 405-41.
- Mor, Y. 1989. Long term storage of roses. *Acta Hort.* 261: 271-280.
- Moskova, I.; Todorova, D.; Alexieva, V.; Ivanov, S. and Sergiev, I. 2009. Effect of exogenous hydrogen peroxide on enzymatic and nonenzymatic antioxidants in

- leaves of young pea plants treated with paraquat. *Plant Growth Regul.* 57: 193-202.
- Odabasoglu, F.; Aslan, A.; Cakir, A.; Suleyman, H.; Karagoz, Y. and Bayir, Y. 2005. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia.* 76 (2): 216-219.
- Ozgen, M.; Reese, R. N.; Tulio, A.Z.; Miller, A.R. and Scheerens, J.C. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1151-1157.
- Proestos, C.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G. J. E. and Komaitis, M. 2005. RP- HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agri. Food Chem.* 53: 1190-1195.
- Reid, M. S. 2002. Postharvest handling systems: Ornamental crops. pp 345-348. *In: Postharvest Technology of Horticultural Crops.* University of California Agriculture and Natural Resources. Publication 3311.
- Roginsky, V. and Lissi, E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92 (2): 235-254.
- Rubinstein B. 2000. Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol Biol* 44: 303-318.
- SAS. 2002. SAS/STAT users guide: Statics, Ver. 9.0. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 1503 p.
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Medical Biol. Res.* 38: 995-1014.

- Talebi, S. F.; Mortazavi, S. N. and Sharafi, Y. 2013. Extending vase life of rosa (Cv. 'Sensiro') cut flowers with nitric oxide. *Intl J Agron Plant Prod.* 4 (6): 1178-1183.
- Thaipong, K.; Boonprakoba, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L. and Hawkins. B. D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19: 669-675.
- Toivonen, P.M.A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *Hortscience* 39: 938-942.
- Vinokur, Y.; Rodov, V.; Reznick, N.; Goldman, G.; Horev, B.; Umiel, N. and Friedman, H. 2006. Rose petal tea as an antioxidant-rich beverage: cultivar effects. *J. Food Sci.* 71(1): S42-S47.
- Wang, H.; Cao, G. H. and Prior, R. L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44: 701-705.
- Waterman, P. G. and Mole, S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell. Cientific Publicatons, Oxford. 238 p.
- Youwei, Z. and Yonghong, P. 2007. Changes in antioxidant activity in *Rosa rugosa* flowers at different stages of development. *J. Crop Hort.* 35(4): 397-401.
- Yuping, Z. 2009. Effects of Salicylic Acid on Fresh Keeping of Cut *Gerbera Jamesonii* Flower. *Anhui Agricultural 291 Science Bulletin.*
- Zhang, L. and Guo, W. 1998. Effects of cold dry storage on qualities of cut chrysanthemum flower. *Adv. Hortic.* 2: 705-710.

**3. ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSAS DE CORTE EN SOLUCIONES
PRESERVANTES**

3.1 RESUMEN

Tallos florales de rosa “Freedom”, obtenidos en Chiltepec, Edo. de México, fueron tratados con tres soluciones preservantes a nivel productor: Floralife[®] 200, Cystar[®] y Benzoato de sodio, en un pulso de 24 h, se almacenaron “en seco” por 3 días a 2.5 °C en la cámara fría y se trasladaron a la Central de abastos del D. F. El experimento se estableció en la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México. Se estudió el efecto de las soluciones preservantes sobre la vida de florero (VF), la actividad enzimática de la peroxidasa (POD), polifenol oxidasa (PFO), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), la capacidad antioxidante total (caT), el contenido de fenoles totales (CFT), el contenido de antocianinas y la peroxidación lipídica de las membranas celulares. Los tallos florales del testigo y los tratados con benzoato presentaron una VF de 3 días, con Cystar[®] de 4.4 y con Floralife[®] de 5.8 días. Los tallos tratados con Floralife[®] mantuvieron un mayor CFT y caT a los 2 y 3 días después de florero (ddf), el Cystar[®] solo a los 2 ddf y el benzoato presentó valores similares al testigo en ambos días de medición. En cuanto a la POD y POF, el testigo presentó la máxima actividad 2 ddf y el benzoato 3 ddf, el Floralife[®] y el Cystar[®] 4 ddf. La actividad de la SOD y CAT fue mayor en Floralife[®] y Cystar[®], mientras que la peroxidación de la membrana y el contenido de antocianinas fue menor. Se presentaron correlaciones positivas y significativas entre el CFT y la caT ($r= 0.94$), la POD con la POF ($r= 0.80$) y la SOD con la caT ($r= 0.78$) y el contenido de fenoles($r= 0.75$).

Palabras clave adicionales: peroxidasa, polifenol oxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, MDA

3.2 ABSTRACT

Floral stems of rose “Freedom”, obtained in Chiltepec, Edo. of Mexico, were dealt with three preservative solutions at cultivate level: Floralife[®], Cystar[®], Benzoate of sodium, in a pulse of 24 hours, were stored for 3 days in the cold chamber at 2.5 °C “in dry”, and were later transported to the “Central de Abastos.” in Mexico city. The experiment was conducted in the Chapingo Autonomous University, Texcoco. Mexico State. The enzymatic activity of peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PFO), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), the total antioxidant capacity (caT), the total phenol content (FT) and anthocyanins, lipid peroxidation of cellular membranes and vase life (VL) were evaluated. The floral stems had a VL of 5.8 days with Floralife[®], 4.4 with Cystar[®] and 3 with water and benzoate. The stems treated with Floralife[®] maintained a higher CFT and caT at 2 and 3 days of vase life (ddf), with Cystar[®] only in 2 ddf and the benzoate had similar values to the control in both days of measurement. In relation to POD and POF, the control displayed the maximum activity in day 2, benzoate in day 3, Floralife[®] and Cystar[®] up until the 4th day. The activity of SOD and CAT was greater in Floralife[®] and Cystar[®], while the peroxidation of the membrane and the anthocyanin content were lower. Positive and significant correlations between the CFT and caT appeared ($r= 0.94$), the POD with the POF ($r= 0.80$) and the SOD with caT ($r= 0.78$) and phenols ($r= 0.75$).

Additional key words: peroxidase, polyphenol oxidase, superoxide dismutase, catalase, MDA

3.3 INTRODUCCIÓN

La senescencia de las flores es comúnmente acompañada por el deterioro morfológico, fisiológico y bioquímico ocasionado por la disminución del contenido de proteínas de la fluidez de los lípidos de la membrana y un incremento en la actividad de las proteasas (Arora *et al.*, 2007). También se conoce que las especies reactivas de oxígeno (ERO), están involucradas en los tejidos senescentes de las plantas (Chakrabarty *et al.*, 2009). ERO tales como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) degradan proteínas, lípidos y ácido nucleicos lo cual conduce a la senescencia (Arora *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo se presenta por un desbalance entre la producción de ERO y la defensa antioxidante en cualquier compartimento celular (Oztetic, 2011) Para equilibrar la respuesta oxidante, las plantas dispone de una serie de sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos (Mittler, 2002). En los enzimáticos se incluyen enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD, EC. 1.15.1.1), que cataliza la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular; la peroxidasa (POD, EC. 1.111.1.7) que utilizan múltiples dadores electrónicos, principalmente compuestos fenólicos, para reducir el peróxido; la catalasa (CAT, EC. 1.111.1.6) que elimina al peróxido (Mittler *et al.*, 2004) y la polifenol oxidasa (PFO, EC: 1.14:18.1), la cual cataliza dos reacciones en las que se incluye oxígeno molecular: a) la o-hidroxilación de monofenoles y b) la oxidación de o-difenol a o-quinonas. Entre los no enzimáticos se incluye: glutatión, α -tocoferol, ascorbato, β -caroteno, hidroquinonas, flavonoides, fenoles y ácidos fenólicos (Larson, 1988).

Kumar *et al.* (2008), indicaron que un aumento en los niveles endógenos de peróxido, la peroxidación de los lípidos de la membrana y una disminución de la actividad enzimática antioxidante se pueden considerar los principales factores fisiológicos causantes de la senescencia de las flores de rosa en postcosecha.

Toivonen (2004), menciona que la senescencia puede ser aplazada por el retardo de la peroxidación, usualmente por la neutralización de radicales libres. En pétalos de clavel se ha reportado que tratamientos con benzoato de sodio (un secuestrador de radicales libres) disminuyen los niveles de peróxido e incrementan la vida de florero en un 70% (Baker *et al.*, 1977). En rosa y crisantemo la adición de citocininas retrasa su senescencia en un 34-56 % (Lukaszewska *et al.*, 1994, Zhang y Guo 1998). Según Pauls y Thompson (1982), las citocininas actúan como un secuestrador de radicales libres protegiendo a la planta contra la senescencia, retrasan la peroxidación de los lípidos de la membrana, reducen la producción de malondialdehído y aumentan los niveles de las enzimas implicadas en la defensa antioxidativa (Zhang y Guo 1998).

Por lo anterior este estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de tres soluciones preservantes (Benzoato de sodio, Cystar[®] y Floralife[®]) utilizados como soluciones pulso por 24 h sobre la vida de florero, capacidad antioxidante, contenido de fenoles, antocianinas, actividad enzimática de las enzimas POD, SOD, CAT y POL y peroxidación lipídica en tallos florales de rosa (*Rosa hybrida* L.) cultivar Freedom.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Tallos florales de rosa (*Rosa hybrida* L) del cultivar Freedom, el cual es un material líder en el mercado nacional.

Soluciones preservantes

Se ensayaron las siguientes soluciones preservantes como tratamiento pulso por 24 horas: 1) Benzoato de sodio, un antioxidante comercial, a una dosis de 300 mg L⁻¹; 2) Floralife[®] 200, un producto comercial que se recomienda como pretratamiento en flores recién cortada, en la dosis indicada en el producto (10 mL por litro de agua) y 3) 6-benzyladenina [n-(fenilmetil)-1 H-purina-6 amina], un regulador del crecimiento vegetal basado en una citocinina natural, cuyo nombre comercial es Cystar[®], a una dosis de 0.0114 g L⁻¹ (0.5 mL de producto comercial por litro de agua) y el testigo (solamente agua de la llave, pH 8.1, CE 0.28 milimhos).

Organización experimental.

Todo el procedimiento se realizó como normalmente se hace en la empresa Flores de Chiltepec, S. A. de C. V. Tallos florales de rosa 'Freedom' cultivadas bajo invernadero en Chiltepec, Estado de México, se cosecharon por la mañana entre 8:00 y 9:00 am, se trasladaron a la zona de empaque. Ahí, se cortaron a una longitud de 75 cm ± 2, se defoliaron 20 cm en la base, se clasificaron, para cada tratamiento se hicieron dos

paquetes homogéneos de 25 tallos en cuanto se refiere a su etapa evolutiva y apariencia, se colocaron en cubetas conteniendo 4 litros de la solución preservante y se llevaron a la cámara fría hasta terminar el pulso (24 h). Terminado éste se extrajeron de la cámara fría para su empaque y nuevamente se les cortó 1 cm en su base. Se envolvieron en papel Craf® y bolsas de PVC negro, se metieron en cajas de cartón (almacenamiento en “seco”) y se regresaron a la cámara fría por 3 días más a $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Después del almacenamiento refrigerado, las cajas conteniendo los tallos florales se transportaron a la Central de Abastos de la Ciudad de México y de ahí al laboratorio de Usos Múltiples de la Universidad Autónoma Chapingo, México. Las condiciones del laboratorio fueron 40-50 % H. R. Temperatura $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luz controlada (12 horas de oscuridad y 12 horas de luz, 1000 lux). En esta etapa los tallos se dejaron a $70 \pm 2\text{ cm}$ de longitud y, una vez aplicados los tratamientos, se colocaron individualmente en probetas graduadas de 250 mL conteniendo agua de la llave (pH 8.1, CE 0.28 milimhos), la cual cubrió aproximadamente 8-10 cm de la base del tallo y se cambió diario.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones para las variables respuestas bioquímicas y 10 para la vida de florero. La unidad experimental estuvo representada por un tallo floral contenido en una probeta. Las mediciones se realizaron diariamente por 8 días. Para el análisis bioquímico cada repetición se evaluó por triplicado.

Variables respuesta

Vida de florero

Se contó en 10 flores, a partir del día en que las flores se colocaron en probetas hasta que el $\geq 50\%$ de los tallos florales por tratamiento presentaron al menos uno de los siguientes síntomas de senescencia: 1) cabeceo, ruptura y/o ahorcamiento del tallo floral, 2) marchitamiento y/o caída de pétalos y 3) abertura del botón floral excesiva o nula (Mor, 1989).

Obtención del extracto para fenoles y caT

Se pesaron 0.02 g de hoja finamente picadas (sin el margen y la vena central), se adicionaron 10 mL de una solución etanol: agua destilada al 70 % y se homogeneizó en frío con un homogeneizador de tejidos vegetales IKA T-25[®], por aproximadamente 20 segundos.

Contenido de Fenoles Totales

Se utilizó el método descrito por Waterman y Mole (1994). Se tomaron 300 μL del sobrenadante, 7.7 mL de agua destilada, 0.5 mL de Folin-Ciocalteu, después de 1 min y antes de 8 min se agregaron 1.5 mL de carbonato de sodio al 20%, esta mezcla se agitó, se dejó reposar 2 h en oscuridad y se leyó en un espectrofotómetro Genesys[®] UV10 a 760 nm. La cuantificación de los fenoles se realizó mediante una curva patrón de 20, 30, 40, 60 y 80 μg de ácido tánico. Los resultados se reportaron en mg de ácido tánico g^{-1} de peso fresco (PF) ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de PF).

Capacidad Antioxidante Total mediante el ensayo ABTS

Se siguió la metodología descrita por Kuskoski *et al.* (2005), con modificaciones de Ozgen *et al.* (2006) y Thaipong *et al.* (2006). El radical se obtuvo tras la reacción del ABTS^{•+} (7 mM) en buffer acetato de sodio 20 mM (pH 4.5) y persulfato de potasio (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) y bajo oscuridad por 16 h y diluido en el mismo buffer hasta obtener una absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 734 nm. La solución stock se mantiene estable a 4 °C por varias semanas y la dilución hasta por 72 horas (Ozgen *et al.*, 2006). Para el ensayo se colocaron 100 μ L del extracto diluido (1: 5 con etanol agua 70:30) en tubos de fondo plano, se adicionaron 3900 μ L del radical ABTS^{•+} diluido, se agitaron manualmente y se dejaron reposar 2 h en la oscuridad, ya que según Ozgen *et al.* (2006), un tiempo de reacción largo provee una mejor estimación que un corto usando cualquiera de los dos métodos. Se dispuso de una curva de calibración donde el antioxidante sintético de referencia Trolox 1500 μ M en etanol al 70 %, se ensayó a una concentración de 0, 150, 300, 450, 600 y 750 μ M (Thaipong *et al.*, 2006) en las mismas condiciones (100 μ L de Trolox en 3900 μ L del radical ABTS^{•+}). Los resultados se expresaron como actividad antioxidante equivalentes de Trolox (TEAC) en mM de TEAC g^{-1} de peso fresco (PF) (mM TEAC $\cdot g^{-1}$ de PF).

Antocianinas

Se empleó la metodología que utilizaron Kannangara y Hansson (1998); se pesaron 0.02 g de tejido fresco de pétalos de rosa y se colocaron en un mortero frío. La muestra se maceró con nitrógeno líquido hasta formar una pasta homogénea, se le agregaron 10 mL de HCl 0.1 N, esta mezcla se centrifugó para clarificar la solución a 20,000 g por 30

min. Se midió la absorbancia a 516 nm en un espectrofotómetro Genesys® UV10. El procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de oscuridad. El contenido de antocianinas se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$C = \frac{(ABS_{516} / 4.48NM) * 100}{Peso\ de\ la\ muestra} * F.D.$$

Donde: C= contenido de antocianinas (mg de cianidina g⁻¹ PF), ABS₅₁₆=absorbancia medida a la muestra, 4.48 NM= coeficiente de extinción molar a 516 (4.48 nm⁻¹ cm⁻¹), 100 constante y F.D= Factor de dilución.

Peroxidación lipídica

Se estimó por el nivel de producción de malondialdehído (MDA) con una ligera modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Kuk *et al.* (2003). 0.02 g de hoja se homogeneizaron en 5 mL de una solución de TBA al 0.5 % en ácido tricloroacético al 20 %. El extracto vegetal resultante se calentó 90 °C en un “baño maría” por 25 minutos y rápidamente se enfrió en un baño de hielo. Después de esto las muestras se centrifugaron a 20,000 g y se registró la absorbancia del sobrenadante a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Genesys® UV-10. El valor de la absorbancia no específica a 600 nm se restó a la lectura de 532 nm. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción de 156 mM⁻¹ cm⁻¹. Los resultados se reportaron en nmol g⁻¹ de PF.

Actividad enzimática

Obtención del extracto para la CAT, POD y POL

Se pesaron 0.05 g de hojas en tubos de fondo plano y se agregaron 5 mL de solución Tris-HCL (pH 8.5) mas Polivinil pirrolidona (PVP). Esta mezcla se homogeneizó en un homogeneizador de tejidos IKA T-25[®] en frío por aproximadamente 20 segundos, se decantó y se centrifugó a 20,000 g a 4 °C durante 20 min. Se esperó que las muestras tomaran su temperatura ambiente (22 a 24 °C) y se utilizó el sobrenadante para los ensayos. Todos los ensayos se midieron en sensibilidad ½ luz visible en un espectrofotómetro Genesys[®] UV10.

Catalasa (EC. 1.11.1.6.; CAT)

Se realizó mediante la metodología descrita por Luck (1974). Para iniciar la reacción en una celda de cuarzo se colocaron 30 mL de Tris-HCl 10 mM (pH 8.5), 0.1 mL de H₂O₂ al 0.88 % y 0.1 mL de sobrenadante. Una vez agitada la muestra se midió la disminución de la absorbancia a 240 nm a los 20, 60 y 120 segundos. La actividad enzimática se reportó como U g⁻¹ de peso fresco (PF), donde U= Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la descomposición 1 µmol de H₂O₂. Se utilizó el coeficiente de extinción de 67 mM⁻¹cm⁻¹.

Peroxidasa (EC. 1.11.1.7.; POD)

Se determinó usando el método de la oxidación del guayacol por Flurkey y Jen (1978). Para el ensayo en una celda de cuarzo se colocaron siguiendo el orden: 2.6 ml solución

reguladora TRIS-HCL sin PVP (pH 7.1), 100 μ l H₂O₂ al 0.25 %, 250 μ l de guaiacol 0.1 M y 200 μ l del extracto. Se agitó y se registró el incremento de la absorbancia a 470 nm a los 30, 60 y 120 segundos. Se calibró con la solución reguladora TRIS-HCL sin PVP (pH 7.1). La actividad enzimática se reportó como U g⁻¹ de peso fresco donde U=Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 μ mol de tetraguaicol min⁻¹. Se utilizó el coeficiente de extinción de 1.5 mM⁻¹cm⁻¹.

Polifenol oxidasa (EC. 1.14.18.1.; PFO)

Se determinó por el método de Lamikanra (1995). En una celda de cuarzo se colocaron 2.6 mL de catecol 60 mM y 400 μ l del sobrenadante. Se midió el incremento de la absorbancia a 420 nm a los 20, 30 y 60 segundos. La actividad enzimática se reportó como U g⁻¹ de PF, donde U= Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 μ mol de o-benzoquinona min⁻¹. Se utilizó el coeficiente de extinción de 184 mM⁻¹cm⁻¹.

Superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1.; SOD)

La enzima se extrajo con el método descrito por Bonnet *et al.* (2000), 0.05 g de hoja se homogeneizaron con 5 mL de Buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 7.8) en frío, en un homogenizador de tejidos IKA T-25[®] por 20 segundos y se centrifugaron a 20,000 g durante 20 min a 4 °C. Para la actividad de la enzima se siguió la metodología utilizada por Beyer y Fridovich (1987). Se preparó la siguiente mezcla de reacción: 27 mL de buffer de Fosfatos 0.05 M (pH 7.8) conteniendo 0.1 mM de EDTA, 1.5 mL de L-metionina (30 mg·mL⁻¹ en agua desionizada), 1 mL de Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

(1.41 mg·mL⁻¹ en agua desionizada) y 0.75 mL de Triton X-100 al 1% (en agua desionizada). Se pusieron 3.0 mL de esta mezcla en tubos de fondo plano, se les adicionó 0.03 mL de Riboflavina (4.4 mg·100 mL⁻¹ en agua desionizada) y 0.5 mL del sobrenadante: La mezcla se iluminó por 7 minutos con lámparas de luz fluorescente de 20 watts Grolux[®] y se midió la absorbancia a 560 nm. La formación de NBT Formazan debida al incremento en la absorbancia será la velocidad de reacción; la absorbancia en ausencia de SOD y en presencia de varias cantidades de SOD será utilizada para determinar el número de unidades·mL⁻¹ de SOD en la solución (Stauffer, 1989). Una Unidad, U·g⁻¹ de Peso Fresco de SOD, es igual a la cantidad de sobrenadante que fotoinhibe el 50% de la formación de NBT (Giannopolities y Ries, 1977).

Análisis estadístico

El análisis de datos se efectuó mediante el programa SAS[®] (Statistical Analysis System) versión 9.0 (SAS, 2002). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y cuando se presente significancia estadística en el ANOVA se aplicó adicionalmente la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Mediante el coeficiente de correlación de Pearson[®] se realizaron correlaciones entre las variables deseadas.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de varianza

El análisis de varianza mostró que las soluciones preservantes tienen efectos significativos sobre todas las variables evaluadas (Cuadro 1B, 2B, 3B y 4B).

Vida de florero (VF)

El análisis de varianza mostró diferencias significativas para esta variable ($\alpha \leq 0.05$). Los tallos florales tratados con la solución preservante Floralife[®], presentaron la mayor vida de florero (5.8 días), seguidos por los de Cystar[®] (4.5 días), mientras que el Benzoato de sodio (2.9 días) y el testigo (3.1 días) la menor (Figura 1).

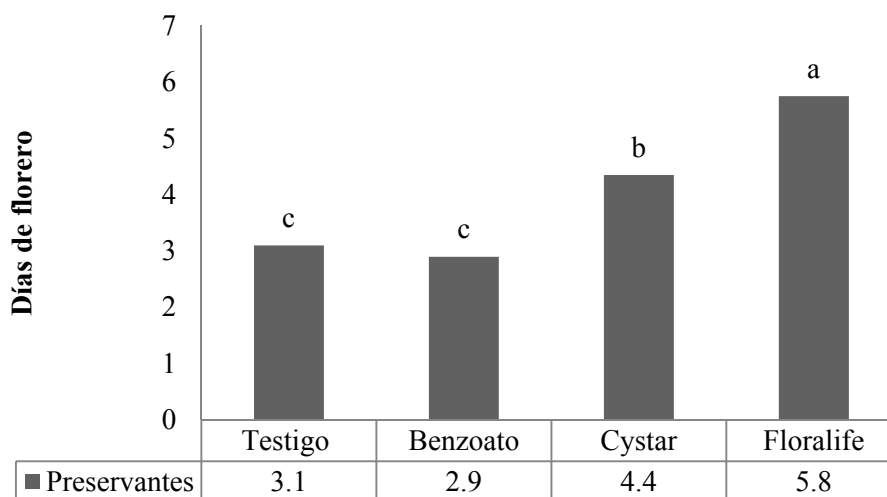


Figura 1. Comparación de medias de vida de florero de flores de rosa “Freedom”, en tres soluciones preservantes: Benzoato de sodio, Cystar[®] y Floralife[®]. Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$, $n = 10$).

En rosa las soluciones comerciales han sido más eficientes para mantener la vida de florero por más tiempo que otros productos químicos (Juárez *et al*, 2008). Las soluciones comerciales, como el Floralife[®] en sus fichas técnicas no traen especificados los ingredientes de su composición, pero se sabe que estos productos comerciales traen una mezcla completa de ingredientes, en la que se incluye: un germicida, azúcares, hormonas e hidratantes.

En el caso del Cystar[®], este producto tiene como ingrediente activo la 6-benzyladenina, una citocinina. Varios estudios han demostrado que esta es eficiente en controlar la senescencia y mantener por más tiempo la vida de florero de las flores cortadas (Serek y Reid 1997). Thomas *et al.*, (2003), mencionan que los síntomas asociados a la senescencia pueden ser efectivamente disminuidos y/o retardados con la aplicación exógena de citocininas y aunque los mecanismos inhibitorios por parte de las mismas no están claramente comprendidos, se reporta que sus propiedades se relacionan directamente con su capacidad antioxidante al capturar radicales libres. En flores de crisantemo, tratamientos postcosecha con benciladenina (BA) mantuvieron la flor por más tiempo al mantener la estabilidad de la membrana, retrasar la peroxidación de los lípidos de la membrana y reducir la salida de electrolitos (Zhan y Guo, 1998).

Aunque en otros estudios el benzoato de sodio a la concentración ensayada 300 mg L⁻¹ ha sido eficiente para prolongar la vida de florero de rosas (Ketsa y Sribunma, 1985), en este experimento no tuvo efectos significativos sobre la vida de florero de las rosas. Según Accati-Garibaldi y Deambrogio (1993), cada solución es única, no solo para una determinada especie, sino también para el cultivar (Figura 1, 2 y 3).



Figura 2. Tallos florales de rosa tratados con: a) agua, b) Benzoato de sodio, c) Floralife® y d) Cystar® al día 3 de florero (ddf).



Figura 3. Tallos florales de rosa tratados con: a) agua, b) Benzoato de sodio, c) Floralife® y d) Cystar® al día 4 de florero (ddf).

Capacidad antioxidante total (caT) y contenido de fenoles

El contenido de fenoles totales se relacionó significativa y positivamente con la capacidad antioxidante total ($r= 0.94^*$) pues presentaron un comportamiento similar durante la vida de florero. Germano *et al.* (2002), sugieren que un alto contenido de fenoles pueden ser la razón de una alta actividad antioxidante y Xiangqun *et al.* (2000), encontraron en yemas de rosa que los fenoles hacen una contribución importante a la actividad antioxidante total.

Los resultados del presente estudio muestran que las soluciones preservantes tuvieron efectos significativos sobre la caT y el contenido de fenoles totales en el día 2, 3 y 4 de florero ($\alpha \leq 0.05$, Cuadro 5B). En el día 2 Los tallos florales tratados con Floralife[®] presentaron los valores mayores de caT (4,952 mM TEAC $\cdot$ g⁻¹ de PF), seguido por los de Cystar[®] (mM TEAC $\cdot$ g⁻¹ de PF) y los menores el benzoato y el testigo (3,517.7 y 3,032 mM TEAC $\cdot$ g⁻¹ de PF), respectivamente. Similarmente para fenoles los tallos florales tratados con Floralife presentaron el valor más alto (24.31 mg $\cdot$ g⁻¹ de PF), seguido por el Cystar[®] (21.0 mg $\cdot$ g⁻¹ de PF) y los menores el benzoato y el testigo (18.35 y 16.75 mg $\cdot$ g⁻¹ de PF), respectivamente (Cuadro 5B y Figura 4).

En el día 3 de florero, en relación al testigo, los tallos de rosa tratados con la solución de Floralife[®] presentaron mayor contenido de fenoles y de caT pero igual a los de Cystar[®]; mientras que el benzoato y el Cystar[®] no tuvieron efecto significativo sobre estas variables. Los valores para la caT fueron: 4,256, 3,616, 3,200 y 2,633 mM TEAC $\cdot$ g⁻¹ de PF y para los fenoles de: 23.36, 19.29, 17.63 y 15.95 mg $\cdot$ g⁻¹ de PF para los tallos

tratados con Floralife[®], Cystar[®], testigo y benzoato y, respectivamente (Cuadro 5B y Figura 4).

Al día 4, en las flores del tratamiento de benzoato de sodio y del testigo la senescencia era muy avanzada y ya habían sido consideradas no aptas para vida de florero, sin embargo las mediciones fueron registradas para fines comparativos del estrés oxidativo. En este día, los tallos florales del testigo, en relación a los demás tratamientos presentaron un incremento considerable en el contenido de fenoles y de caT. Dicho comportamiento se observó en todos los tratamientos un poco después de considerar a la flor no apta para florero (Cuadro 5B y Figura 4). Según Kar y Mishra (1976), un incremento del contenido de fenoles durante la senescencia puede deberse a la presencia de fenoles de las vacuolas rotas y aminoácidos fenólicos liberados por proteólisis de la vacuola y a que durante la senescencia hay un incremento en los niveles de antioxidantes como una estrategia defensiva contra el estrés oxidativo (Cavaioulo *et al.*, 2013).

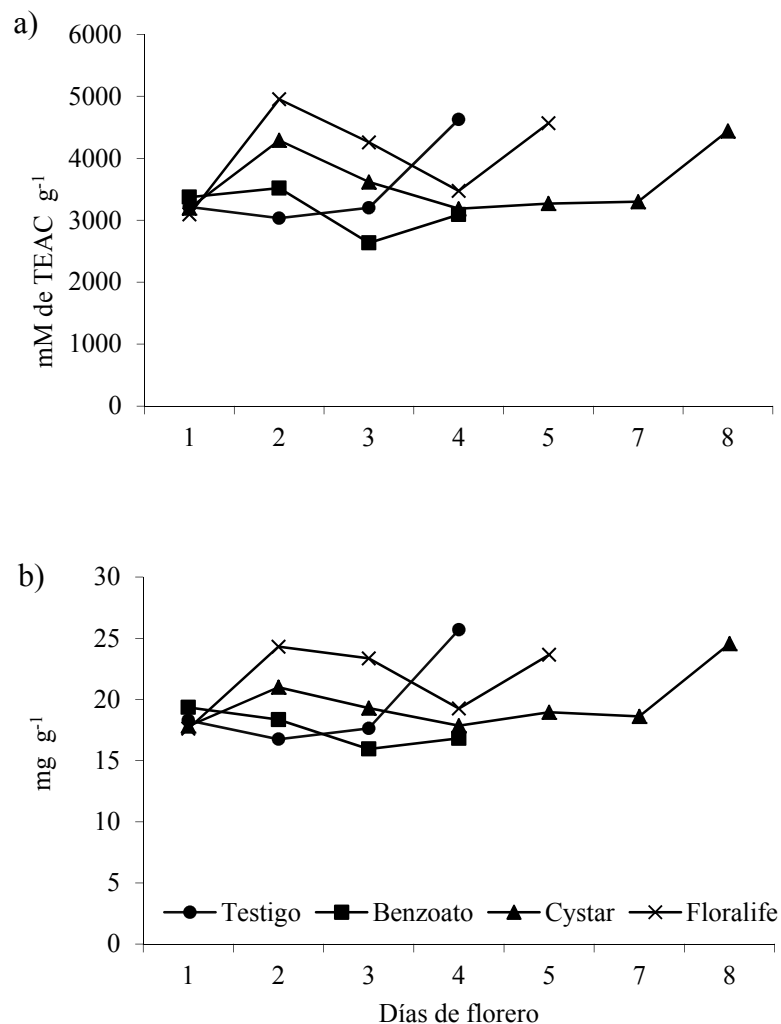


Figura 4. Capacidad antioxidante total (a) y contenido de fenoles totales (b), de tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife® en un pulso de 24 h.

Del efecto de las soluciones preservantes Cystar® y Floralife®, en el día 2 y 3, éstas retrasaron la senescencia al mantener altos niveles de fenoles y actividad antioxidante. Se ha sugerido que los fenoles desempeñan un papel protector celular clave en estas circunstancias de estrés (Dixon y Paiva, 1995). Así, los derivados de hidroxycinamatos y los flavonoides han sido implicados en la protección frente a la peroxidación de los

lípidos, proceso que provoca el deterioro de las membranas y la pérdida de compartimentación, y por tanto la funcionalidad de la célula (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Lama *et al.* (2013), reportaron que la aplicación de 8-HQS ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) más ácido cítrico ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) y 5% de sacarosa en *Rosa hybrida* L. ‘Sunpari’, incrementó el contenido de fenoles totales y de capacidad antioxidante total hacia el final de la senescencia prolongando la vida de florero por 4 días. Yuping *et al.* (2009), reportaron que la utilización del ácido salicílico (un fenol) amplió perceptiblemente la vida del florero de flores de Gerbera (*Gerbera jamesonii*), ya que aumentó la actividad antioxidante enzimática, retrasó el inicio de la hidrólisis de la actividad antioxidante y de los componentes estructurales de la célula, disminuyó la producción de etileno y la actividad y sensibilidad de la ACC-oxidasa.

En cuanto al efecto del benzoato, al presentar niveles de fenoles y de capacidad antioxidante total similares al testigo, no fue capaz de afectar significativamente la vida de florero, al respecto Foyer (1993), sugirió que la tolerancia al estrés se debe a un incremento en la capacidad antioxidante de las plantas.

Antocininas

En relación con el testigo, los tallos tratados con las soluciones pulso Floralife[®], Cystar[®] y benzoato, presentaron menor contenido de antocianinas en los días 2 y 4. Para el día 3, los tallos tratados con Floralife[®] y Cystar[®] presentaron el menor contenido de antocianinas (60.52 y 62.62 mg de cianidina g^{-1} PF, respectivamente) y los tratados con

benzoato el mayor (81.0 mg · g⁻¹ PF) (Figura 1). Las antocianinas estuvieron muy relacionadas con la peroxidación lipídica, la actividad de las enzimas SOD, POL y POD y los niveles de fenoles. En el día 2 el testigo tuvo la máxima actividad de las enzimas POL y POD, menor actividad de SOD y bajos niveles de caT y fenoles, el día 3 los tratados con benzoato presentaron el mismo comportamiento (Cuadro 5B). Al respecto Cavaouiolo *et al.* (2013) señalan que durante la senescencia de las flores la acumulación de antocianinas incrementa, y la aplicación de inhibidores o retardantes del etileno como el 1-metilciclopropeno, aumentan o retarda su acumulación, lo cual indica que la biosíntesis de los compuestos fenólicos puede ser responsable de la lisis celular en los pétalos.

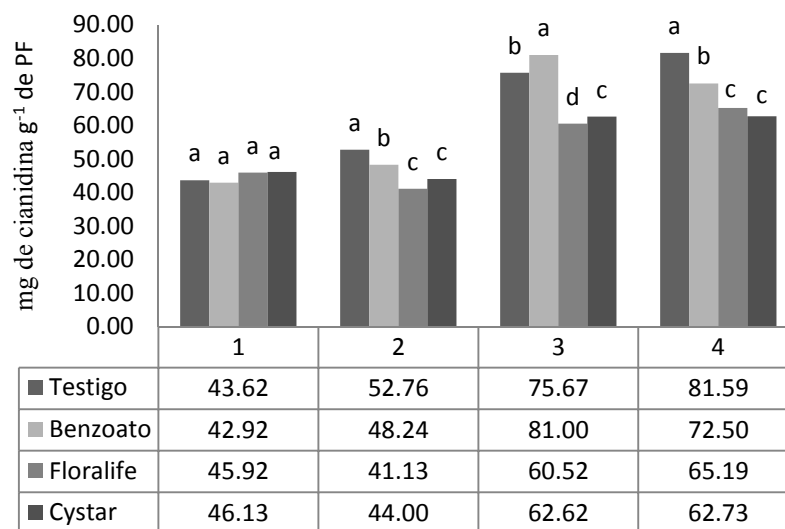


Figura 5. Comparación de medias del contenido de antocianinas de tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife® en un pulso de 24 h, a los 1, 2, 3 y 4 ddf. Medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $n=4$).

Superóxido Dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)

La enzima SOD tuvo una correlación significativa con los fenoles($r=0.75^*$), y con la capacidad antioxidante total ($r=78^*$). En general, los tallos tratados con las soluciones preservantes Floralife[®] y Cystar[®] presentaron mayor actividad de la SOD que el testigo ($\alpha \leq 0.05$). Ezhilmathi *et al.* (2007), mencionan que algunas soluciones preservantes pueden modificar la actividad antioxidante de las enzimas.

Cuadro 1. Comparación de medias de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar[®] y Floralife[®]. en un pulso de 24 h, a los 1, 2, 3 y 4 días después de florero, n=4.

Tratamiento	Ddf			
	1	2	3	4
Testigo	447.5 a	445.8 c	495.0c	608.6 a
Benzoato	480.6 a	510.7 b	410.7d	462.4 c
Cystar [®]	473.7 a	607.9 a	557.6 b	485.6bc
Floralife [®]	463.6 a	660.5 a	614.0 a	523.0 b
CV	98	54.92	53.57	42.52
DMHS	10.5	14.7	14.6	13.1

Medias con la misma letra dentro de columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con ($P \leq 0.05$). Ddf= Días después de florero. DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. CV= Coeficiente de variación. En $U.g^{-1}$ de PF.

Al día 2, los tallos tratados con Floralife[®] y Cystar[®] presentaron la mayor actividad (660.5 y 607.9 $U.g^{-1}$ de PF), seguidos por los del benzoato (510.7 $U.g^{-1}$ de PF) y el testigo la menor (415.75 $U.g^{-1}$ de PF). Al día 3 los tratados con el Floralife[®] tuvieron la mayor actividad enzimática de la SOD (614.0 $U.g^{-1}$ de PF), seguidos por los del Cystar (557.6

U.g⁻¹ de PF) y el testigo (495 U.g⁻¹ de PF), teniendo el benzoato (410.7 U.g⁻¹ de PF) la menor (Cuadro 1 y Figura 6). Otros estudios, han encontrado resultados similares. En clavel (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Optima), en relación al testigo, se registró una mayor actividad de la SOD con la aplicación de BA a una dosis de 30 g L⁻¹ (Karimi *et al.*, 2012) y en flores de gerbera (*Gerbera jamesonii* Dune) (Danaee *et al.*, 2013) y de tulipán (Mohammadi *et al.*, 2012) a una dosis de 50 mg L⁻¹.

En las soluciones preservantes Cystar[®] y Floralife[®] una alta actividad de la SOD pudo ayudar a mantener la fluidez de los lípidos de la bicapa, al estabilizar el sistema de membranas (Scandalios, 1993). En rosa (*Rosa hybrida*) la aplicación de BA (50 mg L⁻¹) junto con sacarosa (50 g L⁻¹) mostró mantener la actividad de la SOD en los pétalos y disminuyó la peroxidación de la membrana (Singh *et al.*, 2008). Hernández *et al.* (1994). encontraron que un alto índice de estabilidad de la membrana del tejido del pétalo pudo haber protegido los organelos celulares como la mitocondria, vacuola y el cloroplasto, que contienen la SOD. Lo anterior se apoya en que la actividad de la SOD estuvo muy relacionada con la actividad de la POL, la POD, el contenido de antocianinas, los fenoles y la caT. La menor actividad de la SOD en el testigo se presentó en el día 2, mientras que en el benzoato en el día 3, misma que fue acompañada por una mayor actividad de la POD y de la POL, mayor contenido de antocianinas, menor caT y menos fenoles en ambos tratamientos. Los tallos tratados con Floralife[®] y Cystar[®] por su parte, cuando mantuvieron alta la actividad enzimática de la SOD, presentaron bajos niveles de POL, POD, altos niveles de fenoles y caT y bajos niveles de antocianinas (Cuadro 1 y 5B y Figuras 4 y 5).

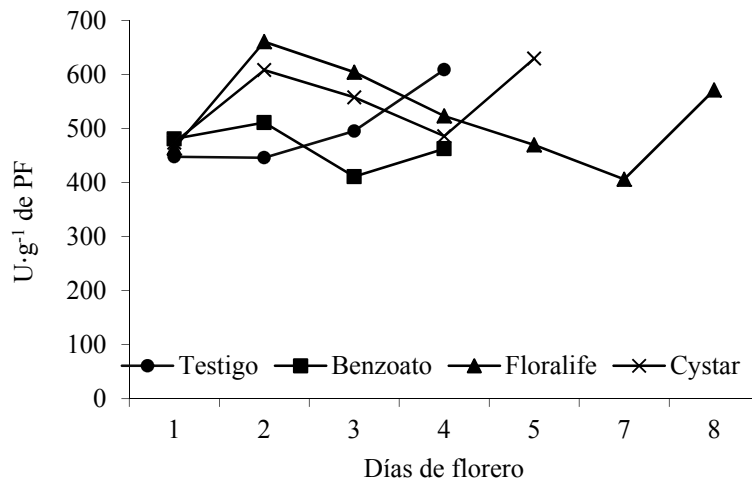


Figura 6. Actividad enzimática de la SOD en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife® en un pulso de 24 h.

En el testigo la actividad de la SOD fue baja al inicio (447.45 U.g⁻¹ de PF día 1 y 445.7 U.g⁻¹ de PF, día 2), el día 3 se incrementó a 495 U.g⁻¹, (sin embargo hasta aquí su actividad fue menor que los tratados con Cystar® y Floralife®) y al día 4 subió a 608 U.g⁻¹ y fue mayor que en los tratados con soluciones preservantes. El mismo comportamiento se presentó también para los otros tratamientos en la etapa final de su senescencia, con resultados estadísticamente significativos con la actividad del día anterior (Cuadro 1 y Figura 6). Dicho comportamiento puede explicarse a que en la etapa final de la senescencia la isoenzima Mn-SOD puede sintetizarse como una respuesta al incremento de O₂⁻ y su mayor actividad durante esta etapa puede estar asociada con su localización mitocondrial. La senescencia es un fenómeno activo dependiente de energía y la mitocondria permanece intacta hasta la última etapa de la

senescencia. Mn-SOD es una enzima inductiva, mientras que la Fe-SOD, se sugiere ser constitutiva (Hernández *et al.*, 1994).

Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

Los resultados muestran que las soluciones tuvieron efecto significativo sobre la actividad enzimática de la catalasa en el día 3 y 4. En relación al testigo, los tallos florales tratados con Floralife® y Cystar® registraron la mayor actividad: 765.05 y 705.28 U g⁻¹ de PF en el día 2 y 1059.72 y 977.53 U g⁻¹ de PF en el día 3, para Floralife® y Cystar®, respectivamente. Al respecto, Ezhilmathi *et al.* (2007), mencionan que algunas soluciones preservantes pueden modificar la actividad antioxidante de las enzimas. El tratamiento de benzoato de sodio no tuvo efecto significativo sobre la actividad antioxidante de esta enzima ($\alpha \leq 0.05$). (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de medias de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife®. en un pulso de 24 h, a los 1, 2, 3 y 4 días después de florero, n=4.

Tratamiento	Ddf			
	1	2	3	4
Testigo	572.23 a	421.46 b	767.93 b	458.18 a
Benzoato	520.56 a	529.46 b	812.47 b	446.26 a
Cystar®	549.11 a	705.28 a	977.53 a	394.51 a
Floralife®	507.22 a	765.05 a	1059.72 a	372.54a
CV	10	9.6	10.1	12
DMHS	105.6	117.5	173.6	104.41

Medias con la misma letra dentro de columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con ($P \leq 0.05$). Ddf= Días después de florero. DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. CV= Coeficiente de variación. En U.g⁻¹ de PF.

La enzima CAT junto con la SOD constituyen la primera línea de defensa celular en contra de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (del Río *et al.*, 2003). Las células muestran una respuesta de defensa contra la acumulación de radicales libres por el incremento de la actividad de la SOD y de la CAT (Khan, 2006). Una alta actividad enzimática de la catalasa en tallos florales de rosa tratados con las soluciones pulso Floralife® y Cystar® el día 2 y 3 (Cuadro 2), pudo ser debida a que la baja peroxidación de lípidos en la membrana mantuvieron intactas las células donde se encuentran dicha enzima, ya que es sabido que las citocininas mantienen la integridad celular y las proteínas (Whitehead 1994). En clavel (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Optima), la aplicación de BA a una dosis de 30 g L⁻¹ incrementó la actividad de la CAT en relación al testigo (Karimi *et al.*, 2012 y en flores de gerbera (*Gerbera jamesonii* Dune), una dosis de 50 mg L⁻¹ de BA, indujo una mayor actividad de la catalasa (Danaee *et al.*, 2013).

Polifenol oxidasa (POL, EC 1.14.18.1) y Peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7)

Las peroxidasas se han implicado en muchos procesos metabólicos tales como el catabolismo de hormonas, la oxidación de fenoles, el entrecruzamiento de los polisacáridos y las proteínas estructurales de la pared celular, la polimerización de la lignina, la maduración de frutas y la defensa contra patógenos. La POD, además de ser parte del sistema antioxidante, ha sido vinculada, junto con la Polifenoloxidasa (PFO), con el pardeamiento enzimático de los tejidos (Christensen *et al.*, 1998).

La enzima Polifenol oxidasa y la Peroxidasa estuvieron correlacionadas positiva y significativamente ($r= 0.80^*$). La actividad enzimática de esta enzima fue afectada por

las soluciones preservantes ($\alpha \leq 0.05$). En la figura 8 se observa la actividad enzimática de la POL y la POD durante la vida de florero de los tallos florales de rosa “Freedom”. La máxima actividad de estas enzimas se presentó en diferentes días para los distintos tratamientos. Al día uno todos los tratamientos estadísticamente fueron iguales, al día 2 el testigo registró la máxima actividad en ambas enzimas (1,871.67 U g⁻¹ de PF para POD y 35.46 U g⁻¹ de PF para POL), al día tres el benzoato (2,631.2 U g⁻¹ de PF para POD y 38.7 U g⁻¹ de PF para POL y al día 4 el Floralife[®] y el Cystar[®] tuvieron la mayor actividad (2736.1 y 2352.9 U g⁻¹ de PF y para POD 52.6 y 48.56 U g⁻¹ de PF para POL), en el orden mencionado (Cuadro 5B y Figura 7).

Considerando que en la senescencia de la rosa los niveles de H₂O₂ se incrementan (Kumar *et al.*, 2008) y que se produce lisis de las vacuolas que contienen los fenoles, se dan las condiciones adecuadas para que la actividad enzimática aumente significativamente, lo que permite que dicha actividad medida *in vitro* se manifieste *in vivo* como el pardeamiento enzimático (Rogiers *et al.*, 1998). En el testigo y el benzoato, la actividad de la POL y la POD, estuvo muy relacionada con una baja actividad de la SOD y de la CAT, alto contenido de antocianinas y menor contenido de fenoles en los días en que se presentó la máxima actividad enzimática de ambas enzimas (Cuadro 1, 2 y 5B, Figura 4, 5, 6 y 7).

La polifenol oxidasa es capaz de catalizar reacciones de oxidación de compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular y la presencia de los compuestos oxidados por la enzima son precursores de las reacciones de pardeamiento que ocurren en los procesos de pos-recolección y manipulación de vegetales (Ayaz *et al.*, 2008). Por

su parte, la peroxidasa necesita de un compuesto de carácter fenólico como donador de protones para generar la respectiva quinona (Hansber, 2002).

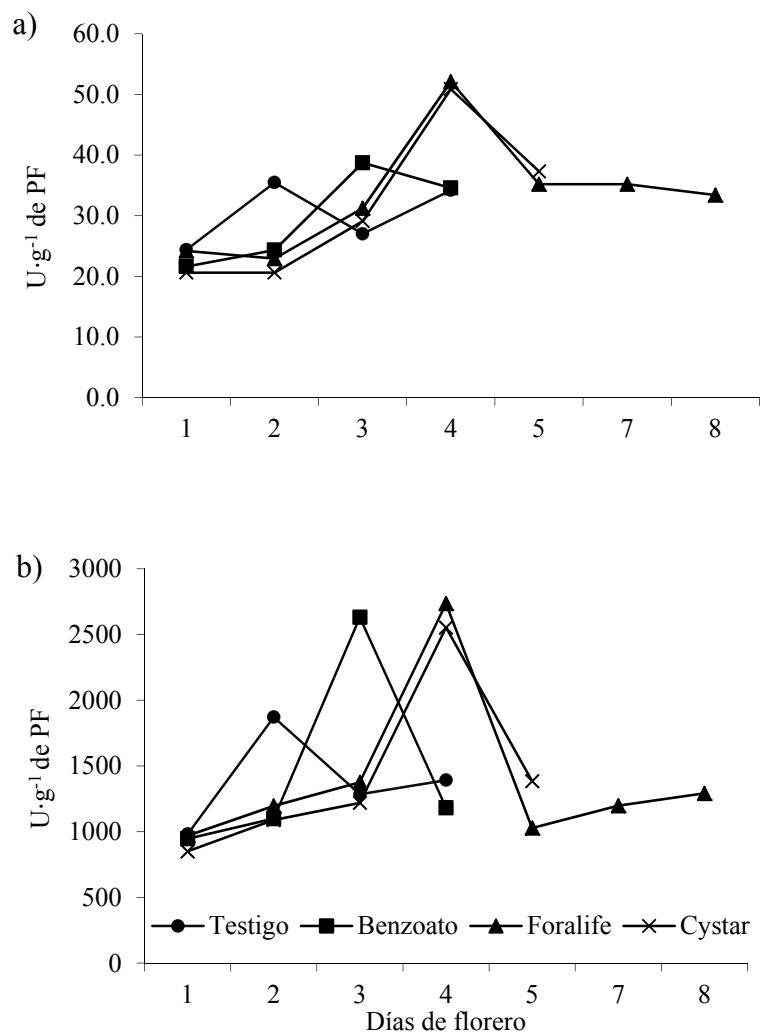


Figura 7. Actividad enzimática de la POL y la POD en tallos florales de rosa “Freedom” con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Foralife® en un pulso de 24 h.

Se sabe que la PFO y POD catalizan la oxidación de fenoles propios de las células a quinonas, las cuales son altamente reactivas con proteínas, ácidos nucleicos, flavonoides

y otras quinonas; estas reacciones, además de generar colores pardos, reducen las propiedades sensoriales de textura y color, disminuye la calidad, lo cual provoca la muerte del tejido (Halpin *et al.*, 1989; Cano *et al.*, 1990). En este estudio, en los tallos florales tratados con el benzoato y en el testigo, una alta actividad enzimática de la POL y la POD en el día 3 y 2, respectivamente, estuvo asociada con una menor vida de florero. Mientras que en los tratados con Cystar[®] y Floralife[®], una baja actividad los días 1, 2 y 3 con la mayor vida de florero.

Peroxidación lipídica

La pérdida de la integridad de la membrana es la fase final e irreversible de la senescencia. La principal característica en los tejidos senescentes, es un incremento de la peroxidación de lípidos de la membrana, con la correspondiente producción de malondialdehído (MAD), un producto secundario de la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados, el cual es utilizado frecuentemente como un excelente medidor de la peroxidación lipídica (Bailly *et al.*, 1996), y como un estimador del grado del estrés oxidativo presente en los tejidos (Hodges y Forney, 2000).

En los tallos florales de todos los tratamientos se presentó un deterioro de la membrana, medido por el aumento del malondialdehído, conforme avanzó la senescencia (Cuadro 3 y Figura 8). Siendo menor dicho deterioro en los tratados con Floralife[®], ya que durante todos los días de medición registraron bajos contenido de MAD (75.83, 84.08, 108.84 y 130.9 nmol g⁻¹ de PF en el ddf 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Los tallos tratados con el Cystar[®] por su parte en relación al testigo también tuvieron menor contenido de MAD

en el día 2 y 4 ddf; (104.21 y 138.31 nmol g⁻¹ de PF, respectivamente). El testigo y el benzoato fueron iguales todos los días de medición excepto en el día 4 en el cual el testigo tuvo mayor contenido de MAD (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de medias del contenido de malondialdehído (MAD) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar[®] y Floralife[®]. en un pulso de 24 h a los 1, 2, 3 y 4 días después de florero, n=4.

Tratamiento	Ddf			
	1	2	3	4
Testigo	81.8 a	115.29 a	127.65 a	156.23 a
Benzoato	77.97 a	112.03 a	122.26 ab	151.46 b
Cystar [®]	82.14 a	104.21 b	115.11 bc	138.31 c
Floralife [®]	75.83 c	84.08 c	108.84 c	130.90 d
CV	2.6	2.5	4.44	3.97
DMHS	8.4	5.4	11.03	12.43

Medias con la misma letra dentro de columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con ($P \leq 0.05$). Ddf= Días después de florero. DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. CV= Coeficiente de variación. MAD en nmol g⁻¹ de PF.

Se ha demostrado que la senescencia de pétalos de rosa y clavel va acompañada por un aumento en la formación de radicales libres (van Staden *et al.*, 1987, Kumar *et al.*, 2008), La senescencia puede ser aplazada por el retraso de la peroxidación, usualmente por la neutralización de los radicales libres. Según Thomas *et al.* (2003), los síntomas asociados a la senescencia pueden ser efectivamente disminuidos y/o retardados con la aplicación exógena de citoquininas, cuyas propiedades se relacionan directamente con su capacidad antioxidante al capturar radicales libres. Las citocininas retrasan la

senescencia ya que mantienen la integridad celular y las proteínas (Whitehead 1994), previenen la peroxidación de ácidos grasos en la membrana, activan la defensa antioxidante y retrasan el daño oxidativo durante la senescencia (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007).

Algunas soluciones preservantes pueden actuar como atrapadoras de ERO y así disminuir la peroxidación de la membrana (Ezhilmathi *et al.*, 2007). Se ha reportado que tratamientos poscosecha con benciladenia (BA) mantienen la longevidad de la flor mejorando la estabilidad de las membranas, retrasando la peroxidación de los lípidos y reduciendo la salida de electrolitos. Efectos de la estabilización de la membrana han sido reportados en rosa con BA más sacarosa (Singh *et al.*, 2008) y en crisantemo con BA (Zhang y Guo 1998).

Los cambios físicos en las membranas llevan a la desnaturalización de las proteínas y desorganización de los lípidos y cambios en la actividad de las enzimas asociadas al estrés oxidativo (Thomas *et al.*, 2003). La estabilidad de la membrana de los tallos florales tratados con Cystar[®] y Floralife[®] pudo haber protegido a los organelos celulares como la mitocondria, las vacuolas y el cloroplasto, los cuales contienen a las enzimas (Hernández *et al.*, 2004). Así los tallos florales tratados con Floralife[®] y Cystar[®], mantuvieron altos niveles de las enzimas SOD y CAT y bajos niveles de la POL y POD (Cuadro 1, 2 y 5B y Figura 6 y 7).

Los altos niveles de las enzimas SOD y CAT y bajos de POL y POD en los tallos tratados con Floralife[®] y Cystar[®] permitieron un mayor contenido de fenoles totales, y

dado su carácter antioxidante protegieron a la célula del daño oxidativo durante la senescencia de los (Dixon y Paiva, 1995). Los fenoles han sido implicados en la protección frente a la peroxidación de los lípidos, proceso que provoca el deterioro de la membranas y la pérdida de compartimentación, y por tanto la funcionalidad de la célula (Rice-Evans *et al.*, 1997). El mecanismo de protección de lípidos por los polifenoles ocurre en el estado inicial y, más efectivamente, durante el estado de propagación de la oxidación lipídica por captura de los radicales libres, inhibiendo de esta manera la reacción en cadena (Decker, 1995).

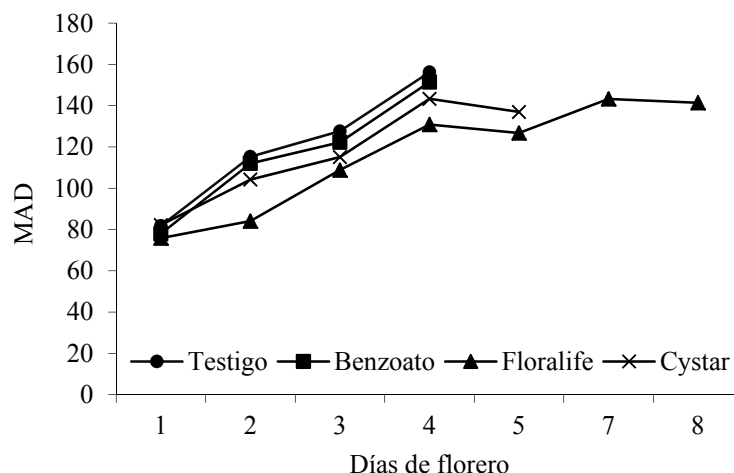


Figura 8. Contenido de malondialdehído (MAD) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife®. en un pulso de 24 h

3.6 CONCLUSIONES

Las soluciones preservantes Floralife[®] y Cystar[®] retrasaron la senescencia de los tallos florales de rosa “Freedom” al mantener la integridad de la membrana, ya que protegieron a esta del daño oxidativo.

La integridad de la membrana permitió un buen funcionamiento de las enzimas, los tallos florales tratados con Floralife[®] y Cystar[®] mantuvieron una alta actividad enzimática de la SOD y la CAT, pero una baja de la POL y la POD.

Al mantenerse la integridad de la membrana en los tallos florales tratados Cystar[®] y Floralife[®], el retraso de la senescencia se caracterizó por un mayor contenido de fenoles, una mayor caT y menor contenido de antocianinas.

Todos los tallos florales en la última etapa de su senescencia incrementaron significativamente su caT, contenido de fenoles totales y la actividad de la SOD, como un mecanismo de defensa final ante el estrés oxidativo.

3.7 LITERATURA CITADA

- Accati-Garibaldi, E. and Deambrogio, F. 1993. Effect of sucrose on postharvest physiology of rose cv. Serena. *Acta Hort. (ISHS)*. 337: 105-114.
- Arora, A.; Singh, V. P; Sindhu, S. S.; Rao, D. N. and Voleti, S. R. 2007. Oxidative stress mechanisms during flower senescence. *Plant Stress, Global Science Books*, 2: 157-172.
- Ayaz, F. A.; Demir, O.; Torun, H.; Kolcuoglu, Y. and Colak, A. 2008. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chem.* 106: 291-298.
- Bailly, C.; Benamar, A.; Corbineau, F. and Dome, D. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seed as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol. Plant.* 97: 104-110.
- Baker, J.E.; Wang, C.Y.; Liberman, M. and Hardenburg, R.E. 1977. Delay of senescence in carnations by a rhizobitoxine analogue and sodium benzoate. *Hort. Sci.* 12: 38-39.
- Beyer F. W. and Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
- Bonnet, M.; Camares, O. and Veisseire, P. 2000. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *J. Exp. Bot.* 346: 945-953.
- Cano, P.; Marín, M. A. and Fúster C. 1990. Effects of Some Thermal Treatments on Polyphenoloxidase and Peroxidase Activities of Banana (*Musa cavendishii*, var enana). *J. Sci. Agric.* 51: 223-231

- Cavauiolo, M.; Cocetta, G. and Ferrante, A. 2013. The Antioxidants Changes in Ornamental Flowers during Development and Senescence. *Antioxidants*. 2: 132-155.
- Chakrabarty, D.; Kumar, V. A. and Kumar, D S. 2009. Oxidative stress and activity as the basis of senescence in (day lily) flowers. *Journal of Horticulture and Forestry*, 1: 113-119.
- Christensen, J. H., Bauw, G.; Welinder, K. G.; Van Montagu, M. and Boerjan, W. 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol*. 118: 125-135.
- del Rio, A. L.; Sandalio, M. L.; Altomare, A. D. and Zilinskas, A. B. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J. Exp. Bot*. 54(384): 923-933.
- Danaee, E.; Naderi, R.; Kalatejari, S. and Moghadam, L. 2013. Evaluation the Effect of Nanosilver with Salicylic Acid and Benzyladenine on Longevity of Gerbera Flowers. *J. Basic. Appl. Sci. Res*. 3(8): 682-690
- Dixon, R.A. and Paiva, N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7: 1085-1097.
- Ezhilmathi; K.; Singh, V. P.; Arora A. and Sairam, R .K. 2007. Effect of 5-sulfosalicylic acid on antioxidant activity in relation to vase life of gladiolus cut flowers. *Plant Growth Regul*. 51: 99-108.
- Flurkey, W. H. and Jen, J. 1978. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci*. 43(6): 1828-1831.
- Foyer, C. H. 1993. Ascorbic Acid. pp. 31-58. *In* Antioxidants in higher plants. Alscher RG, Hess JL (Eds.) CRC. Boca Ratón, FL, EEUU.

- Germano, M. P.; Pasquale, R. D.; Angelo, V. D.; Catania, S.; Silvari, V. and Costa, C. 2002. Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. J. Agric. Food Chem. 50: 1168-1171
- Giannopolities, C. N. and Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases. Plant Physiol. 59: 309-314.
- Halpin, B.; Pressey, R.; Jen, J. and Mondy, N. 1989. Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*). J. Food Sci. 54: 644-649.
- Hansberg, T. W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje bioquímico 26: 19-54.
- Hernandez, J. A.; del Rio L. A. and Sevilla, F. 1994 Salt stress induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna radiata* (L.). New Phytol. 126:37-44
- Hodges, D. M. and Forney, C. F. 2000. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. J. Exp. Bot. 51:645-655
- Juárez H., P.; Colinas L., M. T.; Valdez A., L. A.; Espinosa F., A.; Castro B., R. y Cano G., G. V. 2008. Soluciones y refrigeración para alargar la vida postcosecha de rosa cv. "Black magic". Rev. Fitotec. Mex. 31(3): 73-77.
- Khan, N. A. 2006. Ethylene action in plants. Springer. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Netherlands. 206 p.
- Kannangara C. and Hansson M. 1998. Arrest of chlorophyll accumulation prior to anthocyanin formation in *Euphorbia pulcherrima*. Plant Physiol. Biochem. 36: 843-848.

- Kar, M. and Bandhu, M. D. 1976. Catalase, peroxidase and poly phenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Biochemistry and Enzymology*. 57: 315-319
- Karimi, M.; Ghorbanali, M. N. and Hedayat, N. Z. 2012. Effects of Anti-Ethylene Treatments on Ethylene Production and Antioxidant Activities in Cut Spray Carnation. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 20(2): 173-182
- Ketsa, S. and Sribunma, R. 1985. Pulsing effect of sucrose and sodium benzoate on senescence of 'Christian Dior' cut roses. *Kasetsart J. Natl. Sci.* 19: 261-264.
- Kuk, Y.; Shin, J.; Burgos, N.; Hwang, T.; Han, O.; Cho, H.; Jung, S.; and Guh, J. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science*. 43:2109-2117.
- Kumar, N.; Srivastava, G. C. and Dixit, K. 2008. Anti-oxidant metabolism during rose (*Rosa hybrida* L.) petal senescence. *J. Hort. Sci. Biotech.* 83: 755-759.
- Kumar, N.; Srivastava, G. C. and Dixit, K. 2007. Role of superoxide dismutase during petal senescence in rose (*Rosa hybrida* L.). *J. Hort. Sci. Biotech.* 82:673-678
- Kuskoski, E.; M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A.; Mancini-Filho, J. M. y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25(4):726-732.
- Lama, B.; Ghosal, M.; Kumar, G. S. and Mandal, P. 2013. Assessment of Different Preservative Solutions on VaseLife of Cut Roses. *Journal of Ornamental Plants Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. 3 (3): 171-181
- Lamikanra, O. 1995. Enzymatic browning of muscadine grapes products, pp: 166-177. *In: Enzymatic browning and its prevention*. Lee, C. L. and Whitaker, J R. (eds.). ACS. Washington, DC. USA.
- Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27: 969-978.

- Luck, H. 1974. Methods in Enzymatic Analysis, 2, 885 p.
- Lukaszewska, J. A.; Bianco, J.; Barthe, P.; Marie, T. and Le Page-Degivry. 1994. Endogenous cytokinins in rose petals and the effect of exogenously applied cytokinins on flower senescence. *Plant Growth Regul.* 14: 119-126
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-41
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M. and Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9(10): 490-498.
- Mohammadi, K.; khaligi, A.; Moghadam, A. R. L and Ardebil, Z. A. 2012. The effects of benzyl adenine, gibberellic acid and salicylic acid on quality of tulip cut flowers. *Nternational. Res. J. Appl. Basic. Sci.* 4(1): 152-154
- Ozgen, M.; Reese, R. N.; Tulio, A.Z.; Miller, A.R. and Scheerens, J.C. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1151-1157.
- Oztetic, E. 2001. An Introduction to Oxidative Stress in Plants and the Role of Non-Enzymatic Antioxidants. pp.1-29. *In: Oxidative stress in plants. Causes, Consequenses and Tolerance.* Anjum, N. A.; Umar, S. and Ahmad A, (eds.). I. K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi. India.
- Pauls, K. P. and Thompson, J. E. 1982. Effects of cytokinins and antioxidants on the susceptibility of membranes to ozone damage. *Plant Cell Physiol.* 23: 821-832.
- Reezi, S.; Babalar, M. and Kalantari, S. 2009. Silicon alleviates salt stress, decreases malondialdehyde content and affects petal color of saltstressed cut rose (*Rosa xhybrida* L.) 'Hot Lady'. *Afric J Biotechnol.* 8(8): 1502-1508.

- Rice-Evans, A. C.; Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2(4): 152-158.
- Rogiers, S. Y.; Kumar, G.N.M. and Knowles, N.R. 1998. Maturation and Ripening of Fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are Accompanied by Increasing Oxidative Stress. *Ann Bot.* 81: 203-211.
- SAS. 2002. SAS/STAT users guide: Statics, Ver. 9.0. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 1503 p.
- Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101(1): 7-12.
- Serek, M. and Reid, M. S. 1997. Use of growth regulators for improving the post harvest quality of ornamentals. *Perishables Handling* 92: 7-8
- Singh, A.; Kumar, J. and Kumar, P. 2008. Effect of plant growth regulators and sucrose on postharvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. *Plant Growth Regul.* 55: 221-229.
- Stauffer, C. E. 1989. Enzyme assays for food scientists. Van Nostrand Reinhold. New York. USA. 317 p.
- Thaipong, K.; Boonprakoba, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L. and Hawkins. B. D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19: 669-675.
- Thomas, H.; Ougham, H. J.; Wagstaff, C. and Stead, A. 2003. Defining Senescence and Death. *J. Exp. Bot.* 54(385):1127-1132.
- Toivonen, P. M. A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *Hort. Sci.* 39: 938-942.

- Van Standen, J.; Featonby-Smith, B. C.; Mayak, S.; Spiegelstein, H. and Halevy, A. H. 1987. Cytokinins in cut carnations flowers. II. Relationship between endogenous ethylene and cytokinin levels in the petals. *Plant Growth Regul.* 5: 75-86.
- Waterman, P.G. and S. Mole. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell scientific Publications, Oxford, UK. 238 p.
- Whitehead, C.H. 1994. Ethylene sensitivity and flower senescence. pp. 269-285. *In*: Scott R. J, Stead D (eds), Molecular and cellular aspects of plant reproduction. Cambridge University Press, Cambridge.
- Xiangqun, G.; Lars, B.; Viktor, T. and Madeleine, U. 2000. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J. Sci. Food and Agric.* 80: 2021-2027
- Yuping, Z. 2009. Effects of Salicylic Acid on Fresh Keeping of Cut *Gerbera Jamesonii* Flower. *Anhui Agricultural 291 Science Bulletin*.
- Zamani, S.; Kazemi, M. and Aran, M. 2011. Postharvest life of cut rose flowers as affected by salicylic acid and glutamin. *World Appl. Sci J.* 12(9):1621-1624.
- Zavaleta–Mancera H., A.; López–Delgado H.; Loza–Tavera H.; Mora–Herrera M.; Trevilla–García C.; Vargas–Suarez, M. and Ougham, H. J. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark–senescence. *J. Plant Physiol.* 164: 1572-1582
- Zhang, Z. H. and Guo, W. M. 1998. Regulation of 6-BA on membrane permeability of cut chrysanthemum in vase periods. *Adv. Hortic.* 2: 697-701

4 CONCLUSIONES GENERALES

A excepción del benzoato de sodio, las soluciones preservantes, tuvieron efectos positivos sobre los antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos, lo cual se reflejó en una mayor vida de florero de tallos florales de rosa “Freedom”. Las formulaciones comerciales fueron las más efectivas en potencializar dichos cambios. La utilización de estas a nivel productor y a nivel consumidor aumenta la vida de florero casi al doble, que siendo utilizadas solamente a nivel productor.

5 LITERATURA CITADA GENERAL

- Bowler, C.; Van Camp, W.; Van Montagu, M. and Inzé, D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13(3): 199-218.
- Butt, S .J. 2003. A Review on prolonging the vase life of Roses. *Pakistan Rose Annual*. Published by Pakistan National Rose Society, pp 49-53.
- Elgimabi, M. E. 2011. Vase life extension of rose cut flower (*Rosa hybrida*) as influenced by silver nitrate and sucrose pulsing. *Am. J. Agric. & Biol. Sci.* 6 (1): 128-133.
- Foyer, C. H. and Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic link between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17:1866-1875.
- Gene E. L. 2004. Introduction to the work. *HortScience*. 39: 922-942.

- Hodges, D. M.; Lester, G. E.; Munro, K. M. and Toivonen, P. M. A. 2004. Oxidative stress. Importance for postharvest quality. HortScience. 39: 924-929.
- Kar, M. and Mishra, D. 1976. Catalase peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol. 57(2): 315-319.
- Khalighi, A. 2010. Floriculture. Rozbahan Press. 392 p.
- Kumar N, Srivastava G. C, Dixit K. 2008. Flower bud opening and senescence in roses (*Rosa hybrida* L.). Plant Growth Regul. 55: 81-99.
- Sato, Y.; Murakami, T.; Funatsuki, H.; Matsuba, S.; Saruyama, H. and Tanida, M. 2001. Heat shock mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. J. Exp. Bot. 52: 1-7.
- Toivonen, P. M. A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. Hortscience 39: 938-942.
- Yamada, K.; Ito, M.; Oyama, T.; Nakada, M.; Maesaka, M.; and Yamaki S. 2007. Analysis of sucrose metabolism during petal growth of cut roses. Postharvest Biol. Technol. 43: 174-177.
- Zavaleta-Mancera, H. A.; López-Delgado, H.; Loza-Tavera, H.; Mora-Herrera, M.; Trevilla-García, C.; Vargas-Suarez, M. and Ougham, H. J. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. J. Plant Physiol. 164:1572-1582
- Zimmermann, P. and Zentgraf, U. 2004. Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Blattseneszenz während der Entwicklung von Pflanzen. Gesunde Pflanz. 56: 208-217.

6 ANEXOS

A. FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIDA MEDIANTE LOS ENSAYOS DPPH/ABTS EN ROSA EN SOLUCIONES PRESERVANTES.

Cuadro 1A. Cuadrados medios y significancia estadística en hoja para las variables capacidad antioxidante total (caT) medida mediante los ensayos ABTS y DPPH y fenoles totales de tallos florales de rosa “Freedom” a los 3, 6, 9 y 11 días de florero

FV	Día 3		
	ABTS	DPPH	Fenoles
Preservantes	4,097,682.58	2,057,824.37	101.04
Error	1,015,106.31	252,322.16	27.02
CV (%)	15.52	10.67	10.06
Media	2,163.24	1,569.39	17.22
Significancia	**	**	*
	Día 6		
	ABTS	DPPH	Fenoles
Preservantes	10,234,054.42	3,562,058.94	469.50
Error	3,333,190.09	1,150,896.72	180.95
CV (%)	18.81	16.75	17.02
Media	3,234.77	2,135.34	26.35
Significancia	*	*	*
	Día 9		
	ABTS	DPPH	Fenoles
Preservantes	4,371,967.21	1,417,094.19	256.64
Error	2,988,953.87	2,228,635.98	192.22
CV (%)	18.69	21.80	18.15
Media	3,083.07	2,282.16	25.46
Significancia	*	*	*
	Día 11		
	ABTS	DPPH	Fenoles
Preservantes	2,461,891.74	669,584.85	30.42
Error	1,385,625.44	524,838.02	15.25
CV (%)	12.13	13.63	7.58
Media	3,960.71	2,169.57	21.03
Significancia	*	*	*

ABTS= caT determinada con el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺⁺), DPPH= caT determinada con el radical radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) en mM TEAC g⁻¹ PF) y fenoles en mg de ácido tánico g⁻¹ de PF. CV= Coeficiente de variación. NS; *, **= No significativo, significativo al 5 y 1, respectivamente

Cuadro 2A. Cuadrados medios y significancia estadística en pétalo para las variables capacidad antioxidante total (caT) medida mediante los ensayos ABTS y DPPH y fenoles totales de tallos florales de rosa “Freedom” a los 3, 6, 9 y 11 días de florero.

FV	Día 3		
	ABTS	DPPH	Fenoles
Preservantes	698,340.40	846,274.05	41.72
Error	6,441,471.09	3,583,750.95	315.58
CV (%)	13.40	13.88	13.83
Media	6,312.57	4,545.12	42.82
Significancia	NS	NS	NS
	Día 6		
	ABTS	DPPH	Fenoles
Preservantes	106,542.11	171,373.76	13.01
Error	8,988,507.96	4,331,602.11	327.72
CV (%)	17.97	17.52	18.36
Media	5,560.47	3,959.56	32.86
Significancia	NS	NS	NS
	Día 9		
	ABTS	DPPH	Fenoles
Preservantes	1,295,439.84	1,341,466.71	25.93
Error	4,033,045.33	2,346,736.81	370.42
CV (%)	13.64	13.67	19.21
Media	4,908.78	3,734.24	33.39
Significancia	NS	NS	NS
	Día 11		
	ABTS	DPPH	Fenoles
Preservantes	17,365,747.55	3,534,736.61	219.01
Error	22,297,342.85	4,930,527.81	580.19
CV (%)	33.51	22.93	24.78
Media	7,046.43	4,842.51	48.59
Significancia	NS	NS	NS

ABTS= caT determinada con el radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺), DPPH= caT determinada con el radical radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) en mM TEAC g⁻¹ PF) y fenoles en mg de ácido tánico g⁻¹ de PF. CV= Coeficiente de variación. NS; *, **= No significativo, significativo al 5 y 1%, respectivamente

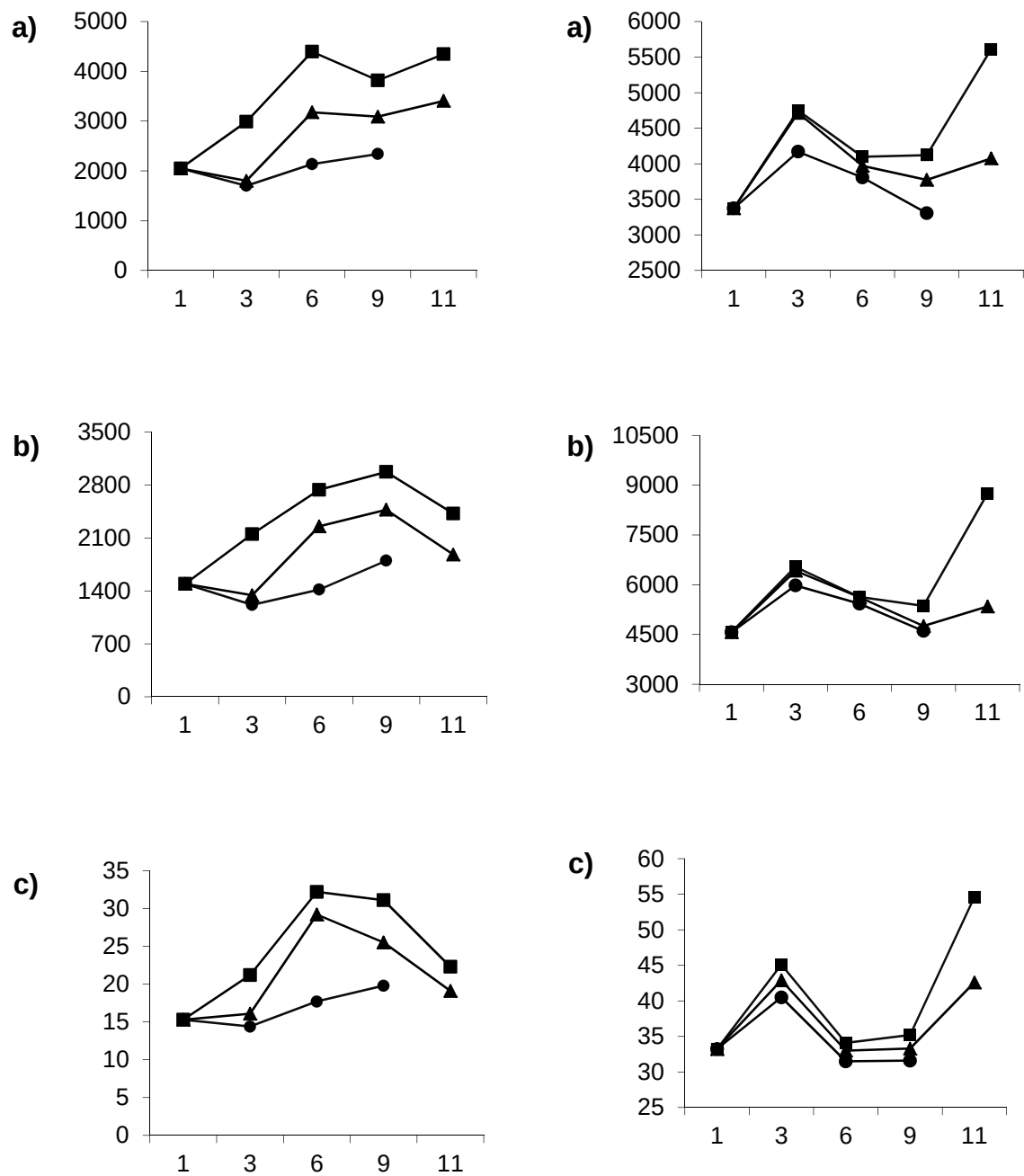


Figura 1A. Capacidad antioxidante total medida por los métodos a) ABTS y b) DPPH en mM de TEAC g⁻¹ de PF y contenido de fenoles en mg de ácido tánico g⁻¹ de PF (c), en hoja y pétalos de rosa en dos soluciones pulso y el testigo

● Testigo ■ CHRYSAL ▲ HQC

B. ESTRÉS OXIDATIVO EN ROSAS DE CORTE EN SOLUCIONES PRESERVANTES

Cuadro 1B. Cuadrados medios y significancia estadística al día 1 de florero para las variables: capacidad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas, MAD, SOD, CAT, POD y POL en tallos florales de rosa “Freedom”.

FV	Fenoles	caT	Antocianinas	MAD
Preservantes	7.22	160,593.46	93.32	295.02
Error	9.27	277,166.51	23.38	52.68
CV (%)	9.38	10.28	3.48	8.4
Media	18.27	3,218.27	40.09	80.68
Significancia	NS	NS	NS	**

FV	SOD	CAT	POD	POL
Preservantes	5,207.47	68,473.19	43,131.57	42.29
Error	3,438.66	30,359.65	66,205.05	51.94
CV (%)	10.5	10.05	7.93	9.17
Media	481.61	500.35	937.12	22.69
Significancia	NS	NS	NS	NS

caT= Capacidad antioxidante Total en mM TEAC g⁻¹; MAD= Malondialdehído; SOD: Superóxido dismutasa (U. g⁻¹ de PF); CAT: Catalasa (U. g⁻¹ de PF); POD: Peroxidasa (U. g⁻¹ de PF) y PFO: Polifenol oxidasa (U. g⁻¹ de PF); NS; *, **= No significativo, significativo al 5 y 1 %, respectivamente.

Cuadro 2B. Cuadrados medios y significancia estadística al día 2 de florero para las variables: capacidad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas, MAD, SOD, CAT, POD y POL en tallos florales de rosa “Freedom”.

FV	Fenoles	caT	Antocianinas	MAD
Preservantes	210.62	7,855,840.92	53.14	2,355.28
Error	49.04	1,160,671.13	6.92	79.15
CV (%)	9.81	7.85	1.47	5.4
Media	20.61	3,960.10	51.68	103.90
Significancia	**	**	**	**

FV	SOD	CAT	POD	POL
Preservantes	92,343.6	215,431.91	1,686,014.92	523.49
Error	20,440.98	37,566.76	162,440.87	98.92
CV (%)	14.7	9.59	8.85	11.12
Media	582.59	583.44	1,314.11	25.82
Significancia	**	**	**	**

caT= Capacidad antioxidante Total en mM TEAC g⁻¹; MAD= Malondialdehído; SOD: Superóxido dismutasa (U. g⁻¹ de PF); CAT: Catalasa (U. g⁻¹ de PF); POD: Peroxidasa (U. g⁻¹ de PF) y PFO: Polifenol oxidasa (U. g⁻¹ de PF); NS; *, **= No significativo, significativo al 5 y 1 %, respectivamente.

Cuadro 3B. Cuadrados medios y significancia estadística al día 3 de florero para las variables: capacidad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas, MAD, SOD, CAT, POD y POL en tallos florales de rosa “Freedom”.

FV	Fenoles	caT	Antocianinas	MAD
Preservantes	102.01	4,921,381.87	1.456,82	810.7
Error	32.33	1,420,852.67	9,88	331.51
CV (%)	8.84	10.87	1,3	11.03
Media	18.56	3,163.85	69,97	118.47
Significancia	**	**	**	*

FV	SOD	CAT	POD	POL
Preservantes	37,647.91	41.904,55	5,421,154.26	312.97
Error	14,977.88	82.091,67	244,598.74	100.98
CV (%)	14.6	10,1	8.77	9.17
Media	469.22	818,54	1,627.57	31.51
Significancia	*	*	**	**

caT= Capacidad antioxidante Total en mM TEAC g⁻¹; MAD= Malondialdehído; SOD: Superóxido dismutasa (U. g⁻¹ de PF); CAT: Catalasa (U. g⁻¹ de PF); POD: Peroxidasa (U. g⁻¹ de PF) y PFO: Polifenol oxidasa (U. g⁻¹ de PF); NS; *, **= No significativo, significativo al 5 y 1 %, respectivamente.

Cuadro 4B. Cuadrados medios y significancia estadística al día 4 de florero para las variables: capacidad antioxidante total, fenoles totales, antocianinas, MAD, SOD, CAT, POD y POL en tallos florales de rosa “Freedom”.

FV	Fenoles	ABTS	Antocianinas	MAD
Preservantes	191.16	5,976,862.63	1,043,38	1,635.86
Error	26.11	471,762.75	33,92	31.02
CV (%)	13.79	10.78	2,36	12.43
Media	19.91	3,592.72	71,27	144.23
Significancia	**	**	**	**

FV	SOD	CAT	POD	POL
Preservantes	70,933.52	50.315,89	7,931,946.76	1,083.34
Error	3,358.04	29.681,92	537,645.33	272.29
CV (%)	13.1	12,17	10.73	11.21
Media	516.8	408,5	1,971.91	42.47
Significancia	**	NS	**	**

caT= Capacidad antioxidante Total en mM TEAC g⁻¹; MAD= Malondialdehído; SOD: Superóxido dismutasa (U. g⁻¹ de PF); CAT: Catalasa (U. g⁻¹ de PF); POD: Peroxidasa (U. g⁻¹ de PF) y PFO: Polifenol oxidasa (U. g⁻¹ de PF); NS; *, **= No significativo, significativo al 5 y 1 %, respectivamente.

Cuadro 5B. Comparación de medias de la capacidad antioxidante total (caT), contenido de fenoles totales, actividad de la peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (POL) en tallos florales de rosa “Freedom” tratados con tres soluciones preservantes: Benzoato, Cystar® y Floralife®. en un pulso de 24 h.

Tratamiento	caT	FENOLES	POD U,g ⁻¹ de PF	PFO U,g ⁻¹ de PF
Día 1				
Testigo	3213.5 a	18.29 a	982.08 a	24.37 a
Benzoato	3372.4 a	19.35 a	946.86 a	21.60 a
Cystar®	3194.5 a	17.82 a	969.64 a	24.18 a
Floralife®	3092.6 a	17.61 a	849.89 a	20.60 a
CV	10.28	9.38	7.93	9.17
DHS	319.04	1.34	155.93	4.37
Día 2				
Testigo	3032.2	16.75 c	1871.67 a	35.46 a
Benzoato	3517.7 c	18.35 c	1099.73 b	24.32 b
Cystar®	4288.4 b	21 b	1088.69 b	20.60 b
Floralife®	4952.1 a	24.31 a	1196.37 b	22.90 b
CV	7.85	9.81	8.85	11.12
DHS	652.88	1.24	244.24	6.03
Día 3				
Testigo	3200.2 b	17.13 b	1284.2 b	27.00 b
Benzoato	2633.2 b	15.95 b	2631.2 a	38.72 a
Cystar®	3615.9 ab	19.29 ab	1219.4 b	29.09 b
Floralife®	4256.2 a	23.36	1375.5 b	31.22 b
CV	10.87	8.84	8.77	9.17
DHS	722.35	3.44	299.71	6.07
Día 4				
Testigo	4122 a	21.7 a	1392.3 b	34.18 b
Benzoato	3090.1 b	16.82 b	1181.3 b	34.56 b
Cystar®	3184.9 b	17.85 b	2736.1 a	52.6 a
Floralife®	3473.1 b	19.26 b	2552.9 a	50.56 a
CV	10.78	13.79	10.73	11.21
DHS	416.23	3.1	444.35	9.99

Valores con la misma letra en el sentido de las columnas son estadísticamente iguales, según Tukey ($p \leq 0.05$). Ddf= días de florero, DMSH= diferencia mínima significativa honesta, CV= Coeficiente de variación.