



UNIVERSIDAD DE MURCIA
Facultad de Biología

**Respuestas fisiológicas, moleculares y
fitoquímicas de variedades de *Brassica oleracea*
(Grupo Italica) sometidas a estrés abiótico**

D^a. María del Carmen Rodríguez Hernández
2013



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

CEBAS-CSIC

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN VEGETAL y
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**Respuestas fisiológicas, moleculares y
fitoquímicas de variedades de *Brassica oleracea*
(Grupo Italica) sometidas a estrés abiótico**

Trabajo realizado para optar al Título de Grado de Doctor por la Universidad de
Murcia

D^a. María del Carmen Rodríguez Hernández

2013

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han sido recogidos en las siguientes publicaciones científicas:

- **Trabajos originales de investigación, publicados en revistas científicas incluidas en el SCI**

Rodríguez-Hernández MC, Moreno DA, Carvajal M, García-Viguera C, Martínez-Ballesta MC. 2012. Natural Antioxidants in Purple Sprouting Broccoli under Mediterranean Climate. *Journal of Food Science* 77 (10): C1058-C1063.

Rodríguez-Hernández MC, Moreno DA, Carvajal M, Martínez-Ballesta MC. 2013. Interactive effects of boron and NaCl stress on water and nutrient transport in two broccoli cultivars. *Functional Plant Biology*. <http://dx.doi.org/10.1071/FP12314>.

M. Carmen Rodríguez-Hernández, Sonia Medina, Angel Gil-Izquierdo, M. Carmen Martínez-Ballesta, Diego A. Moreno. Broccoli isothiocyanates content and in vitro availability according to variety and origin. Aceptado en *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*.

Maria del Carmen Rodriguez-Hernandez, Diego A. Moreno, Micaela Carvajal, Maria del Carmen Martinez-Ballesta. Sulphur metabolism in two broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars under the interaction of salinity and elevated CO₂. En preparación.

- **Libros**

M.C. Rodríguez-Hernández, MC Martínez-Ballesta, DA Moreno, R Domínguez-Perles, C García-Viguera, M Carvajal. 2010. Condiciones medioambientales que determinan la fisiología y el metabolismo secundario de nuevas variedades de brócoli. XIII Simposio Ibérico de Nutrición Mineral de las Plantas. San Sebastián. In: Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales en la nutrición mineral de las plantas. Jose María Estavillo Aurre y col., (Eds) ISBN: 978-84-614-3065-9.

- **Congresos científicos**

M.C. Rodríguez-Hernández, MC Martínez-Ballesta, DA Moreno, R Domínguez-Perles, C García-Viguera, M Carvajal. 2010. Condiciones medioambientales que determinan la fisiología y el metabolismo secundario de nuevas variedades de brócoli. XIII Simposio Ibérico de Nutrición Mineral de las Plantas. San Sebastián. Participación: 1 comunicación póster.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis la Dra. M^a Carmen Martínez Ballesta y el Dr. Diego Ángel Moreno Fernández, por haber confiado en mí y darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, pero sobre todo por su gran ayuda y apoyo, sin olvidar el tiempo y la paciencia invertidos, para formarme científica y personalmente. Sois grandes personas y magníficos profesionales. Gracias de todo corazón.

A la profesora de investigación la Dra. Micaela Carvajal por haberme aceptado en su grupo y sin cuyo apoyo no estaría aquí. Gracias por tu disponibilidad constante durante todo este tiempo, sin ti nada de esto sería posible.

Al jefe del Departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC, el Dr. Vicente Martínez por haberme aceptado en su departamento y haber hecho este trabajo posible.

A la Dra. María Asunción Morte por aceptar la tutoría de esta Tesis y por su disposición durante este tiempo.

A mi compañera y amiga la Dra. Beatriz Muries, a la que le agradezco toda su ayuda y apoyo durante esta Tesis y sobre todo por su amistad fuera del centro.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio, que me habéis ayudado en esta Tesis: Diana, Fernando Alemán, Fernando Caballero, Mario, M^a José, Raúl, Santi, Amadeo, Pedro, Tere, Carmen, Nieves... Mil perdones a quien se me haya podido olvidar, sois muchos para recordar de un tirón.

Al Dr. Vicente Gimeno por su ayuda y apoyo especial y a mis compañeros que han estado de pasada por el laboratorio Chokri y Csabi, ojalá hubierais estado más tiempo trabajando conmigo, he aprendido mucho de vosotros.

A todos mis amig@s de toda la vida, por su cariño y amistad. Sois como mis hermanos.

Muy especialmente, quiero dedicar mi Tesis, a mi familia, por su increíble apoyo y cariño.

A mis padres José Antonio y Maricarmen, por quererme y apoyarme siempre. Sois los mejores padres del mundo. ¡¡Os quiero muchísimo!!

A mi hermano, José Antonio, por su apoyo constante y porque es muy especial para mí. ¡¡Te quiero!!

A mis suegros Antonia y José Miguel por compartir conmigo todos estos años y quererme como a una hija. Tengo mucha suerte de teneros.

Finalmente, quiero agradecerle a mi querido Josemi, que es todo para mí, por su cariño y por estar conmigo siempre. Eres lo más grande y la mejor persona que conozco. No se qué haría sin ti.

El fin del camino es el principio.

*Un creador es un hombre que en algo perfectamente conocido encuentra
aspectos desconocidos (Ernesto Sábato, 1911-2011).
Doctor Honoris Causa por la Universidad de Murcia 1989*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El brócoli.....	3
1.1.1. Características generales.....	3
1.1.2. Origen y distribución	4
1.1.3. Cultivo de brócoli en la Región de Murcia.....	5
1.1.4. Fases de cultivo.....	7
1.1.5. Propiedades nutritivas y saludables del brócoli.....	8
1.2. Factores ambientales que afectan a los compuestos beneficiosos para la salud presentes en el brócoli.....	10
1.2.1. Problemática de la salinidad	11
1.2.1.1. Salinidad y transporte de agua	16
1.2.1.2. Salinidad y boro	19
1.2.1.3. Salinidad y CO ₂	21
1.3. Importancia del azufre en plantas superiores.....	22
1.3.1. Importancia del metabolismo del azufre para las plantas	22
1.3.2. Metabolismo del azufre	24
1.3.3. Glucosinolatos	28
1.3.4. Compuestos fenólicos	34
2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	41
2.1. Justificación	43
2.2. Objetivos.....	44
2.2.1. Objetivo principal	44
2.2.2. Objetivos parciales.....	45
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
3.1. Material Vegetal	49
3.2. Germinación y cultivo de las plantas	50
3.2.1. Condiciones experimentales en exterior	52
3.2.2. Condiciones experimentales en invernadero	53
3.3. Determinaciones analíticas	54
3.3.1. Determinación de biomasa.....	54
3.3.2. Área foliar.....	54
3.3.3. Pigmentos foliares.....	55
3.3.4. Nutrientes.....	56
3.3.4.1. Cationes y elementos totales.....	56
3.3.4.2. Contenido de aniones.....	56
3.3.4.3. Determinación de carbono y de nitrógeno totales	57
3.3.5. Parámetros de intercambio gaseoso	58
3.3.6. Medidas de relaciones hídricas	59
3.3.6.1. Conductancia hidráulica de raíz (L ₀)	59
3.3.7. MSI. Índice de estabilidad de la membrana plasmática.....	60
3.3.8. Determinación de actividades enzimáticas	61
3.3.8.1. Actividad Serina Acetiltransferasa (SAT)	61
3.3.8.2. Actividad O-acetil-L-serina(tiol)lasi (OASTL)	62
3.3.8.3. Actividad ATP sulfurilasa	64
3.3.8.4. Actividad γ -glutamilcisteina sintetasa (γ -EC sintetasa).....	65
3.3.8.5. Actividad Glutation Sintetasa (GluS)	66
3.3.8.6. Actividad Mirosinasa	68
3.3.9. Determinación del contenido de glutacion (GSH)	70

3.3.10. Extracción y determinación de vitamina C.....	70
3.3.11. Extracción y determinación de glucosinolatos y compuestos fenólicos	71
3.3.12. Extracción y determinación de antocianinas	73
3.3.13. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	75
3.3.14. Análisis de isotiocianatos (ITCs).....	76
3.3.15. Análisis de aminoácidos por HPLC-MS	77
3.3.16. Técnicas de proteómica	79
3.3.16.1. Extracción de proteínas de membrana plasmática.....	79
3.3.16.2. Electroforesis SDS-PAGE.....	82
3.3.16.3. Western-Blotting	83
3.3.16.4. Immunodetección	85
3.4. Análisis estadístico	86
4. CAPÍTULO I. FISIOLÓGÍA Y ANTIOXIDANTES NATURALES EN DIFERENTES VARIEDADES DE BRÓCULI PÚRPURA	89
4.1. Introducción.....	91
4.2. Diseño experimental	91
4.3. Resultados.....	93
4.4. Discusión	100
4.5. Conclusiones.....	105
5. CAPÍTULO II. FACTORES MEDIOAMBIENTALES COMO MODULADORES DE LA FISIOLÓGÍA DE NUEVAS VARIEDADES DE BRÓCULI.	107
5.1. Introducción.....	109
5.2. Diseño experimental	109
5.3. Resultados.....	111
5.4. Discusión	121
5.5. Conclusiones.....	126
6. CAPÍTULO III. EFECTO DE LA INTERACCIÓN DEL ESTRÉS POR BORO Y SALINIDAD SOBRE EL TRASPORTE DE AGUA Y NUTRIENTES EN DOS CULTIVARES DE BRÓCULI	127
6.1. Introducción.....	129
6.2. Diseño experimental.....	129
6.3. Resultados.....	130
6.4. Discusión	141
6.5. Conclusiones.....	149
7. CAPÍTULO IV. EFECTO DE LA INTERACCIÓN DEL ELEVADO CO ₂ Y SALINIDAD SOBRE EL METABOLISMO DEL AZUFRE EN DOS CULTIVARES DE BRÓCULI (<i>Brassica oleracea</i> L.).	151
7.1. Introducción.....	153
7.2. Diseño experimental.....	153
7.3. Resultados.....	154
7.4. Discusión	167
7.5. Conclusiones.....	173
8. CAPÍTULO V . ISOTIOCIANATOS DEL BRÓCULI – CONTENIDO Y DISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i> SEGÚN LA VARIEDAD Y EL ORIGEN.	175
8.1. Introducción.....	177
8.2. Diseño experimental.....	177
8.3. Resultados.....	179
8.4. Discusión	191
8.5. Conclusiones.....	196
9. CONCLUSIONES.....	197

10. BIBLIOGRAFÍA	203
------------------------	-----

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El brócoli

1.1.1. Características generales

El brócoli (*Brassica oleracea* L. variedad Italica) también conocido como brócoli o brécol, pertenece a la familia *Brassicaceae* o crucíferas, al igual que la col, las coles de Bruselas, la coliflor, la rúcula, los rábanos, etc.

El nombre de “brócoli” procede del latín “brachium” que significa “rama” y hace referencia a la forma ramificada de sus cabezuelas florales. Es muy parecido a su pariente cercano, la coliflor, pero generalmente es de color verde y presenta pedúnculos florales menos prietos o compactos, conformando un ramillete o pella.



Figura 1.1. Brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica).

Esta planta posee abundantes floretes carnosos, dispuestos en forma de árbol, sobre ramas que nacen de un grueso tallo comestible. La gran masa de cabezuelas está rodeada de hojas. Las hojas del brócoli permanecen erguidas, con peciolo

alargados, limbos con hojas lobuladas de color verde grisáceo, muy onduladas y con lóbulos profundos, así como nervaduras marcadas, blancas. Las pellas de brócoli son claras y ligeramente menores de tamaño que en las coles o coliflores, y con la superficie más granulada, y constituyen conglomerados parciales más o menos cónicos que suelen terminar en este tipo de formación en el ápice, en bastantes casos muy marcada. La pella de brócoli puede llegar a desarrollar 20 centímetros de diámetro, y alcanzar 2 kg, distinguiéndose colores diferentes según variedades: moradas, rojizas, blancas o amarillentas, siendo la más común la verde oscura en el tallo y verde azulado en el extremo de la flor (Figura 1.1). Es importante resaltar la posible aparición de brotes laterales en los brócolis de pella blanca en contraposición a la ausencia de este tipo de brotes en la coliflor. La raíz es pivotante con raíces secundarias y superficiales. Las flores del brócoli son pequeñas, en forma de cruz de color amarillo y el fruto es una silicua de valvas ligeramente convexas con un único nervio longitudinal. Produce abundantes semillas redondas y de color rosáceo.

1.1.2. Origen y distribución

El origen del brócoli se asienta en los países con climas templados a orilla del Mediterráneo oriental, en Oriente Próximo (Asia Menor, Líbano, Siria). La Península de Anatolia, Líbano o Siria acogerían los primeros ejemplares de esta planta, provenientes de una especie silvestre común con las coles y coliflores.

Durante la época de dominio del Imperio Romano, esta hortaliza llegaría hasta la Península Itálica donde fue cultivada para su consumo, llegando a ser muy popular en el país transalpino. Pero sería mucho más tarde, a mediados del siglo XX, cuando su producción se desarrollaría en Europa.

En la actualidad, su cultivo se extiende por Europa y diversas naciones donde destacan Japón y Estados Unidos. Éste último, es el mayor productor mundial, gracias a las plantaciones ubicadas en California, que poseen un clima muy similar al del arco mediterráneo.

En España el cultivo de brócoli adquiere especial importancia en el Sureste, desde donde se distribuye al resto de la península y al extranjero. El clima templado mediterráneo resulta óptimo para su cultivo, y en la actualidad, con la introducción de nuevas variedades, se persigue poder producir brócoli todo el año (Proexport 2012).

1.1.3. Cultivo de brócoli en la Región de Murcia

El cultivo de brócoli se inició en Murcia en la década de 1980 con 878 hectáreas. A principios del siglo XXI, la producción de brócoli en la Región de Murcia alcanzaba las 100.000 toneladas anuales, sobrepasando las 150.000 toneladas durante 2003-2004. En 2008 la Región de Murcia (Figura 1.2) aportó el 44 % de la producción de brócoli y coliflor de España, el 9 % de la producción de la Unión Europea y el 1.1 % de la producción mundial. En la actualidad, 33 años después del inicio del cultivo en la Región de Murcia, el cultivo de brócoli ocupa 10.781 hectáreas, con un incremento del 12.2 % de su superficie (Ver murciaeconomia.com).

La Región de Murcia es la principal productora de brócoli en España, y prácticamente la totalidad de la producción se dedica a la exportación. Los países más consumidores son: Reino Unido, Francia y Holanda, que reciben un 65 % del total de la producción española que en la campaña de enero-agosto de 2012 ascendió

a 73.316 Tm (Brócoli y Coliflor 190.253 Tm, Proexport). En nuestro país no está muy extendido el consumo, aunque se está introduciendo de manera importante en los últimos años (Ver masbrocoli.com).



Figura 1.2. Zonas de producción de brócoli en la Región de Murcia (2008).

El cultivo de brócoli ha ido en aumento en estos años debido en parte a los cultivos de producción intensiva desarrollados a partir del Traspase Tajo-Segura y la potencia económica de este producto en los mercados europeos. Las áreas con mayor densidad de cultivos son (Figura 1.2): Valle del Guadalentín con Lorca y Totana a la cabeza (en las pedanías de Tercia, Tiata, Cazalla en la primera y Raiguero o Lébor en la segunda), el Campo de Cartagena (Balsapintada de Fuente Álamo; Pozo Estrecho, El Albuñón y Rincón de San Ginés en Cartagena), así como Lobosillo de Murcia, El Mojón de Beniel o Archivel de Caravaca de la Cruz.

1.1.4. Fases de cultivo

El brócoli se desarrolla en diversas fases:

-Crecimiento: la planta desarrolla solamente hojas.

-Inducción floral: el brócoli se cultiva principalmente durante las estaciones de otoño e invierno debido a la necesidad de temperaturas entre 10-17 °C durante varios días y varias horas al día, para inducir la floración (Jiang et al. 2011), pero siguen brotando hojas de tamaño más pequeño que en la fase de crecimiento.

-Formación de pellas: la planta desarrolla en la yema terminal una pella y, al mismo tiempo, en las yemas axilares de las hojas ocurre la fase de inducción floral con la formación de nuevas pellas secundarias, que serán bastante más pequeñas que la principal.

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

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

El cultivo del brócoli requiere menos riego que otros vegetales, ya que se produce durante la temporada lluviosa del año, lo cual es particularmente importante en zonas con recursos hídricos limitados. Por tanto, la resistencia del cultivo a temperaturas relativamente bajas y a la sequía, así como a la salinidad como veremos posteriormente, convierte al brócoli en una hortaliza de gran interés científico y socio-económico.

1.1.5. Propiedades nutritivas y saludables del brócoli

En los últimos años, se ha prestado una atención creciente al papel de la dieta en la salud humana, en relación a la reducción del riesgo de padecer un gran número de enfermedades (Finley et al. 2001; Jeffery et al. 2003; Rao y Rao 2007). Investigaciones epidemiológicas y clínicas han establecido relaciones significativas entre un mayor consumo de frutas y hortalizas y una menor incidencia en diferentes enfermedades crónicas de tipo cardiovascular, neurológico y así como en diversos tipos de cáncer (Ames et al. 1993; Hooper y Cassidy 2006).

Los alimentos de origen vegetal, incluyendo las hortalizas de *Brassica*, contienen gran cantidad de nutrientes y antioxidantes naturales, tales como minerales, vitaminas y compuestos fenólicos (Duthie et al. 2006). En este sentido, más del 85 % de la vitamina C de nuestra dieta la aportan las frutas y las hortalizas, y aunque el contenido de vitamina C varía significativamente entre las crucíferas, el brócoli en particular es una fuente rica de vitaminas A, C, E, B1, K y folatos (Moreno et al. 2006) que confieren propiedades antioxidantes y colaboran en la formación del colágeno, huesos, dientes, glóbulos rojos y blancos. Por estas y otras propiedades, el brócoli es un reconocido vegetal promotor de la salud, conocido como 'la hortaliza con mayor valor nutritivo' en relación al porcentaje de peso de producto comestible (Pascual 1994). Está compuesto principalmente por agua y tiene un alto contenido en fibra, lo que conlleva que su nivel de calorías aportadas al organismo tras su ingesta sea mínimo, por lo que se recomienda en dietas de control de peso.

Los compuestos bioactivos presentes en frutas y hortalizas, son metabolitos y compuestos químicos del metabolismo secundario de los vegetales, que se

encuentran en cantidades pequeñas en las plantas, con respecto a otros macronutrientes, pero que contribuyen significativamente a regular los mecanismos de protección frente a situaciones de estrés y tienen propiedades biológicas de interés para la prevención de algunas enfermedades en los humanos que los consumen (Hooper y Cassidy 2006). Además, contribuyen al mantenimiento de los tejidos corporales, aumentan la resistencia a las infecciones, regulan el correcto desarrollo del sistema nervioso e intervienen en el crecimiento, y resultan beneficiosos para la elaboración de enzimas en el hígado (Moreno y García Viguera 2008, Jeffery y Araya 2009). Entre los compuestos bioactivos del brócoli, cabe destacar a los glucosinolatos (Finley et al. 2001; Keck y Finley 2004) y los compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos hidroxicinámicos) (Podsdek 2007), además de otros nutrientes como carotenoides (López-Berenguer et al. 2009), fibra (que le confiere cierto poder laxante) y elementos minerales esenciales para la salud (Moreno et al. 2006). Se sabe que los elementos minerales (Na, K, Ca, Mg, Cl y P) son esenciales para los seres humanos y se requieren cantidades superiores a 50 mg/día, mientras que los elementos traza (Fe, Zn, Cu, Mn, I, F, Se, Cr, Mo, Co y Ni) se requieren en cantidades inferiores a ≤ 50 mg/día. Entre los minerales del brócoli, destaca el potasio, aunque cuenta también con cantidades específicas de calcio, zinc, yodo, hierro y magnesio. Los nutrientes minerales intervienen en la generación de impulsos nerviosos, así como en la actividad muscular, regulación de agua en la célula, funcionamiento de diversos órganos internos como los intestinos y mejora de la inmunidad en general. Los minerales, en concreto el yodo, son indispensables para el funcionamiento de la glándula tiroidea, controlando así ciertas funciones metabólicas como la regulación de la temperatura corporal y el desarrollo del cerebro del feto durante el embarazo (Martínez-Ballesta et al. 2010).

En los últimos años, se están conociendo variedades de brócoli de color púrpura o morado, importantes debido a su alto contenido en compuestos bioactivos, como antocianos (Lewis et al. 1991; Pallauf et al. 2008) que son compuestos que atraviesan la barrera hematoencefálica y pueden influir en el comportamiento cognitivo (Andres-Lacueva et al. 2005), mucho mayor que las tradicionales variedades verdes (Pérez-Balibrea et al. 2010).

1.2. Factores ambientales que afectan a los compuestos beneficiosos para la salud presentes en el brócoli

Como ya se ha dicho anteriormente, el brócoli es una planta que muestra una alta presencia de compuestos bioactivos (Kurlich et al. 2002, Moreno et al. 2006). Existen diferentes factores que afectan a la calidad nutricional, el rendimiento del cultivo y su contenido en compuestos bioactivos, como son: genotipo (Schonhof et al. 2004; West et al. 2004; Charron et al. 2005a), las condiciones climáticas y de crecimiento (Hale 2001; Vallejo et al. 2003; Rangkadilok et al. 2004; Podsedek 2007, Björkman et al. 2011), las prácticas agronómicas y parámetros ecofisiológicos (fecha de plantación, duración del periodo de cultivo, temperatura, radiación, humedad relativa, grado de hidratación, madurez en cosecha) (Moreno et al. 2008; Diksha y Awasthi 2009), y el posterior almacenado y procesado del brócoli (Jeffery et al. 2003; Kleinhenz y Wszelaki 2003; Abercrombie et al. 2005; Padilla et al. 2007b). Cuando se habla de variaciones en el contenido de fitoquímicos a consecuencia de los factores que influyen en el cultivo, como determinantes de la cantidad de estos compuestos en el momento de la recolección, siempre ha de tenerse en cuenta que son un conjunto de factores, y que rara vez o en ninguna ocasión se

debe a un factor medioambiental aislado (Schreiner 2005). Específicamente, el contenido de glucosinolatos se ve afectado por la temperatura ambiente y el fotoperiodo (Charron y Sams 2004), y la estación del año (Rosa et al. 1996). Además, existen grandes diferencias en los niveles de glucosinolatos que se han observado en *Brassica* spp., con la utilización de distintas variedades, métodos analíticos, y condiciones ambientales (Cartea et al. 2008). De hecho, Schönhof et al. en 2004, demostró cómo variaba el contenido de glucosinolatos con distintas especies de *Brassica*, y posteriormente, Domínguez-Perlés et al. en 2010, demostraron cómo variaban los compuestos bioactivos y el contenido de nutrientes en distintos cultivares de brócoli, según el cultivar, el órgano y el estrés salino aplicado. Además, el contenido hídrico de la planta también afecta al contenido en fitoquímicos. Así, el brócoli se puede enriquecer en glucosinolatos y compuestos fenólicos controlando el aporte de agua, lo que podría explicarse como un mecanismo adaptativo de la planta a las condiciones de estrés hídrico (Paschold et al. 2000; Bañuelos et al. 2003).

1.2.1. Problemática de la salinidad

El estrés salino es el principal estrés abiótico que reduce la productividad de los cultivos en muchas áreas del mundo (Yamaguchi y Blumwald 2005). Así, la salinidad es una de las limitaciones más graves de la producción de los cultivos (Al-Maskri et al. 2010), que está estrechamente relacionada con la absorción de agua y nutrientes por la planta. Altas concentraciones de sales en el medio de crecimiento, alteran el balance hídrico de la planta y la distribución de iones tanto a nivel celular como a nivel de planta completa (López-Berenguer et al. 2009). Estas condiciones

ambientales adversas fuerzan a las plantas a reducir al mínimo la pérdida de agua, ya que su crecimiento depende de la capacidad de mantener una alta tasa fotosintética y, al mismo tiempo, una baja transpiración (Koyro 2006). En este contexto, el crecimiento de las plantas está relacionado con el uso de la energía y el intercambio de gases, por lo que una de las respuestas de las plantas a estas condiciones ambientales adversas, es la inhibición de la capacidad de absorción de agua por la raíz (Martínez-Ballesta et al. 2006). Para conseguir esto, las plantas provocan el cierre de los estomas de las hojas restringiendo de esta forma la entrada de CO₂ y, al mismo tiempo, reduciendo la actividad fotosintética de la planta (Stepien y Johnson 2009).

La salinidad supone un grave problema en la Región de Murcia, ya que se encuentra enclavada en el Sureste de la península ibérica y su clima es, en líneas generales, mediterráneo con netos rasgos semiáridos, ya que es la región europea con mayor escasez de lluvias. La climatología y la mayor demanda de productos agrícolas, provocó una notable expansión de los regadíos abastecidos con aguas subterráneas, lo que inició la sobreexplotación de los acuíferos murcianos (Vera-Nicolás 2005) y, en general, de las zonas con escasa pluviometría, sobre todo en época de sequía. La sobreexplotación de estos recursos, ha originado que en amplias zonas de Almería, Murcia y la Comunidad Valenciana se haya producido un agotamiento de los acuíferos, propiciando un descenso del nivel freático y la consecuente intrusión de aguas salinas, ocasionando una creciente salinidad de las aguas de riego. En el caso de la región mediterránea española, el proceso de la intrusión de agua marina está bastante generalizado (Gentile et al. 2000; Pulido-Leboeuf 2004).

El brócoli es un cultivo moderadamente sensible a la salinidad, aunque presenta mayor tolerancia a ella que otros vegetales comunes como lechuga, cebolla, maíz y zanahoria (del Amor 2011). El agua y las sales minerales disueltas en ella son esenciales para el crecimiento de las plantas, pero la reutilización del agua y las altas tasas de evaporación en regiones áridas o semiáridas, hace que las sales se concentren y ocurra la salinización (López-Berenguer et al. 2006).

La salinidad afecta a los cultivos en los estadios vegetativo y reproductivo, lo que da lugar a un menor desarrollo de la planta en general y su biomasa y rendimiento de frutos (Greenway 1973; Greenway y Munns 1980; Lauchli y Epstein 1990; Martínez-Ballesta et al. 2008a).

El efecto perjudicial de la salinidad, en el crecimiento de las plantas está asociado a:

- (1) Bajo potencial osmótico de la solución del suelo (estrés hídrico) (Pérez-López et al. 2009)
- (2) Interferencia con la nutrición conduciendo a un desequilibrio de nutrientes, como por ejemplo deficiencias de potasio y calcio (Hasegawa et al. 2000)
- (3) Toxicidad iónica asociada a excesivos niveles de Cl^- y Na^+ (estrés salino) (Niu et al. 1995; López-Berenguer et al. 2006)
- (4) Una combinación de estos factores (Marschner 1995; Shannon et al. 1998).

Todas estas causas adversas, afectan por tanto al crecimiento y desarrollo de la planta a nivel fisiológico y bioquímico (Munns 2002) así como a nivel molecular (Tester y Davenport 2003).

La concentración salina a la cual estos efectos tienen lugar, difiere con el genotipo, la etapa de crecimiento, las interacciones medioambientales y las especies iónicas causantes del estrés. No obstante, en general, concentraciones salinas mayores de 50 mM de NaCl pueden disminuir el rendimiento de muchos cultivos (Shannon et al. 1994; Martínez-Ballesta et al. 2008a). Los mecanismos de tolerancia a la sal son tan complejos, que la variación ocurre no sólo entre especies sino que en muchos casos, también entre los cultivares dentro de una misma especie (Greenway y Munns 1980; Ashraf 2002).

Por otro lado, la relación entre las condiciones ambientales y la nutrición mineral es bastante compleja. Se sabe por Lauchi y Epstein (1990) que la absorción y el transporte de los nutrientes minerales a la planta se altera por la fuerza iónica del medio y por la interacción directa entre los iones que predominan en el medio salino (Na^+ y Cl^-), que da lugar a la deficiencia en el resto de nutrientes. Los mecanismos que las plantas desarrollan para la absorción, transporte y utilización de los nutrientes minerales, no son tan eficientes bajo condiciones salinas como en condiciones normales (Ahmad y Umar 2011). Así, las altas concentraciones de Na^+ y Cl^- en el medio, pueden producir un aumento de la relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/K^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$. Como resultado, la planta se vuelve susceptible al daño osmótico y específico de los iones salinos, además de a los desordenes nutricionales que pueden dar lugar a una reducción de la producción y la calidad (Smith et al. 2010a).

En condiciones de salinidad, los solutos disueltos en la zona de la raíz generan un potencial osmótico negativo que disminuye el potencial hídrico del suelo. Por lo tanto, la planta experimenta dificultades para absorber el agua y disminuye su potencial hídrico así como la presión de turgor, provocando un estrés hídrico (López-Berenguer et al. 2006; López-Pérez et al. 2007). Se produce, una menor

disponibilidad de agua que conduce a un cierre parcial de estomas para disminuir la transpiración (Ashraf 2001), una reducción drástica de la conductividad o conductancia hidráulica de las raíces y una deshidratación general de la planta (Azaizeh y Steudle 1991).

En estas condiciones, ocurre el llamado “ajuste osmótico”, un proceso que consiste en la acumulación activa de solutos en los tejidos de la planta, en respuesta a una disminución de la disponibilidad de agua (Blum et al. 1996). Con ello, se disminuye el potencial de solutos y el potencial hídrico total de los tallos, hojas y raíces y, como resultado, las plantas pueden absorber agua a potenciales hídricos del suelo menores y, mantener la presión de turgor y la actividad fisiológica relacionada con el contenido hídrico, en los tejidos (Acevedo et al. 1999; Marínez-Ballesta et al. 2006).

Altas concentraciones de solutos orgánicos en el citoplasma, incluyendo prolina, sacarosa y glicina-betaina contribuyen al equilibrio osmótico (López-Berenguer et al. 2009). No obstante, poco se sabe sobre la acumulación de glucosinolatos en respuesta al estrés salino, aunque estudios previos indican que los factores ambientales como la luz (Engelen-Eigles et al. 2006), la temperatura (Velasco et al. 2007) y los metales pesados (Coolong et al. 2004; Tolrà et al. 2006) alteran el contenido de glucosinolatos y su composición. López-Berenguer et al. (2008) indicó que el contenido de glucosinolatos aumentaba con el estrés salino moderado. Así, en condiciones salinas, en las hojas jóvenes (metabólicamente más activas) y las inflorescencias, el contenido de glucosinolatos aumenta, posiblemente por la activación de la ruta biosintética o por la activación del transporte a través del floema desde las hojas maduras y senescentes hacia las inflorescencias.

1.2.1.1. Salinidad y transporte de agua

Las plantas se adaptan al estrés salino a través de diferentes mecanismos, incluyendo cambios morfológicos y de desarrollo, así como procesos fisiológicos y bioquímicos (Zhu 2001).

Se ha observado que los altos niveles de NaCl reducen la conductancia hidráulica radicular (López-Berenguer et al. 2006). Como consecuencia, para que la planta pueda realizar los ajustes osmóticos necesarios para recuperar el equilibrio hídrico, sus necesidades energéticas aumentan, lo que causa una disminución de la tasa de crecimiento y una alteración de la arquitectura de la planta. En presencia de gradientes de presión hidrostáticos, el flujo de agua se realiza mayoritariamente a través del apoplasto, ya que este paso representaría las menores resistencias hidráulicas. Sin embargo, para prevenir su deshidratación por estrés salino, la planta cierra los estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración (Rajaona et al. 2012) y en presencia de gradientes osmóticos, el flujo de agua es más bajo, ya que ocurre en condiciones de ausencia de transpiración, o durante fenómenos como la exudación radicular. En estos casos, para que exista un potencial osmótico y que éste de lugar a un movimiento importante de agua, es necesaria la presencia de membranas y, por tanto, que el agua fluya por la vía célula a célula (ruta simplástica y transcelular) (Zimmermann et al. 1969; Steudle 2000).

En 1969, Zimmermann et al. describieron que un flujo osmótico de agua a través de la raíz tendría que atravesar multitud de membranas y, si esto se produjera por simple difusión a través de la bicapa lipídica, no se encontrarían valores de flujo de agua, tan altos como los que se obtienen. Este hecho indica la participación de proteínas para el transporte de agua por esta vía. Por lo tanto, para el paso por la vía

transcelular y simplástica, que implica el paso a través de membranas, las células además de un pequeño componente de difusión espontánea a través de la bicapa lipídica, poseen proteínas o canales de agua que favorecen su circulación, son las denominadas acuaporinas (Azaizeh et al. 1992; Carvajal et al. 1996; Steudle 2000; Martínez-Ballesta et al. 2003; López-Berenguer et al. 2006; Tan et al. 2013).

Las acuaporinas son estructuras proteicas pertenecientes a la familia de proteínas de membrana MIP (Proteína Intrínseca de Membrana). Las acuaporinas vegetales se clasifican de forma tradicional en base a su secuencia aminoacídica y a su localización celular en distintas subfamilias que son las PIPs (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*), TIPs (*Tonoplast Intrinsic Proteins*), NIPs (*Nodulin26-like Intrinsic Proteins*), SIPs (*Small Basic Intrinsic Proteins*), GIPs (*GlpF-like Intrinsic Proteins*), HIPs (*Hybrid Intrinsic Proteins*) y XIPs (*X Intrinsic Proteins*). La subfamilia PIP es la más representada en las plantas y se divide en dos clases, PIP1 y PIP2, que difieren en su secuencia aminoacídica y en su permeabilidad hídrica.

Los estudios de microscopía electrónica de alta resolución de Jung et al. (1994) propusieron un modelo tridimensional llamado el “modelo de reloj de arena” (Figura 1.3), donde se describe la estructura de la acuaporina AQP1. Según este modelo, los bucles B y E, que en principio se encuentran en lados opuestos de la membrana, se repliegan hasta encontrarse y superponer los motivos conservados NPA dentro de la membrana para formar un estrecho canal por el que pasan las moléculas de agua. El flujo a través del poro es bidireccional (Meinild et al. 1998) y se ha sugerido que el eje de simetría en la proteína sería el responsable de mediar el flujo de agua en ambas direcciones (Cheng et al. 1997).

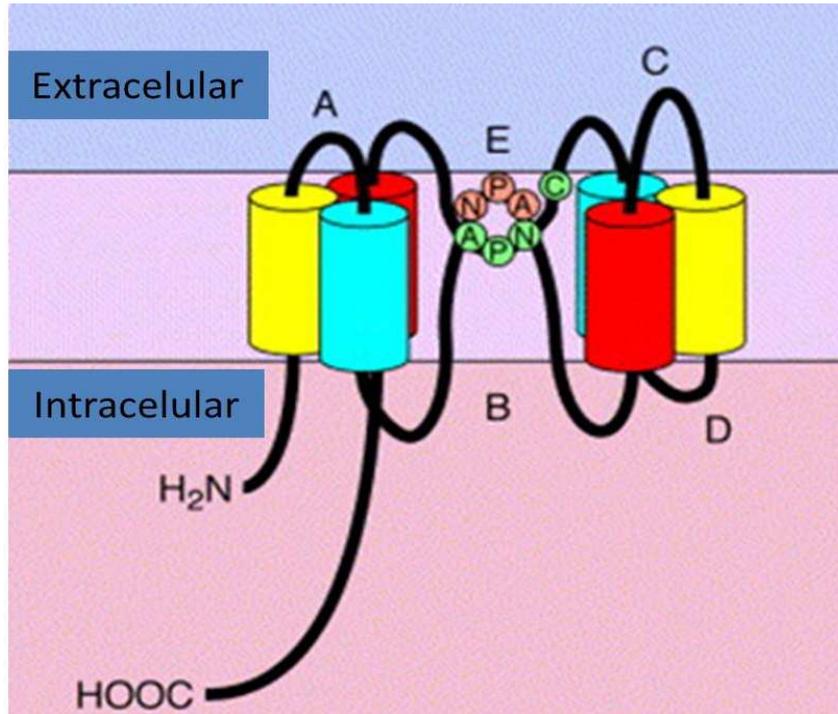


Figura 1.3. Modelo de reloj de arena. Las acuaporinas están formadas por dos mitades simétricas con tres dominios transmembrana helicoidales. Los bucles B y E que contienen los motivos NPA se repliegan en el interior de la membrana dejando un poro para el paso del agua (Modificado de King et al. 2000).

Bajo condiciones salinas, un balance hídrico óptimo de agua es importante para mantener la homeostasis de la planta y, las acuaporinas pueden ser uno de los mecanismos implicados en la respuesta a los cambios ambientales y de desarrollo (Baiges et al. 2002; Tyerman y Niemietz 2002; Luu y Maurel 2005; Muries et al. 2013). Estas proteínas proporcionan al organismo la posibilidad de regular el transporte del agua a través de las membranas. Schäffner (1998) propuso que la capacidad para aumentar o disminuir la permeabilidad al agua de una célula, podría justificar el enorme esfuerzo en la expresión de estas proteínas, así como su variabilidad.

La cantidad de acuaporinas presentes en una membrana, así como su estado de actividad/inactividad, variará en función del tejido donde se encuentre, la célula o las condiciones ambientales que le afecten. La planta regulará la funcionalidad y

expresión de acuaporinas, las cuales se afectan por diferentes factores ambientales como el estrés salino (Cabañero et al. 2004; López-Pérez et al. 2009, Serra et al. 2013), el estrés nutricional (Carvajal et al. 1996; Maurel et al. 2008), o el estrés hídrico (Martre et al. 2002; Liu et al. 2013) entre otros.

Las acuaporinas están involucradas en las variaciones en la conductancia hidráulica de regiones metabólicamente activas de la raíz (North et al. 2004; Groppa et al. 2012). A pesar de que la conductividad hidráulica de los tejidos podría estar regulada por la modificación del nivel de acuaporinas específicas, la regulación también puede ocurrir al modificar la actividad de estas proteínas (Chaumont et al. 2005). El mecanismo por el cual la salinidad reduce la conductancia hidráulica en las células puede estar relacionado con los cambios ya sea en la funcionalidad de las acuaporinas o en la cantidad de esta proteína presente en la membrana (Martínez-Ballesta et al. 2000; Muries et al. 2011), cuya abundancia depende por un lado de los niveles de expresión o del tráfico vesicular de esta proteína desde la membrana plasmática al retículo endoplasmático (Luu y Maurel 2013).

1.2.1.2. Salinidad y boro

Un problema importante relacionado con la salinidad, es que en suelos salinos, se ha observado una acumulación excesiva de boro en la solución del suelo, a causa de su mal drenaje (Grieve y Poss 2000). A pesar de que el boro es un micronutriente esencial para el crecimiento vegetal, se vuelve tóxico cuando su concentración en la solución del suelo excede un valor crítico (1 mM) (El-Motaium et al. 1994). La toxicidad de boro en plantas se expresa generalmente como una reducción significativa del crecimiento, vigor y rendimiento, junto con el daño tisular

y la pérdida de calidad del cultivo (Guidi et al. 2011). En algunas especies, sin embargo, las reducciones de rendimiento pueden ocurrir sin síntomas visibles de lesiones, como de parches cloróticos y/o necróticos en los márgenes de las puntas de las hojas maduras, o malformaciones en tallos y hojas jóvenes. Takano et al. (2006) observaron que, a bajas concentraciones de boro externo ($0.1 \mu\text{M}$), se expresa un mayor número de aquaporinas en raíces de *Arabidopsis*, y que algunas acuaporinas pueden transportar boro (Dordas et al. 2000).

El efecto del estrés combinado por salinidad y exceso de boro, ha sido estudiado en tomate (Ben-Gal y Shani 2002b; Guidi et al. 2011), pepino (Alpaslan y Gunes 2001), lechuga (Eraslan et al. 2007b), melón (Edelstein et al. 2005), zanahoria (Eraslan et al. 2007a), pimiento (Yermiyahu et al. 2008), espinaca (Eraslan et al. 2008) y maíz (Martínez-Ballesta et al. 2008b). El estrés combinado por salinidad y boro puede ser sinérgico, induciendo efectos negativos sobre el rendimiento (Grieve y Poss 2000; Alpaslan y Gunes 2001; Wimmer et al. 2003), o antagónico (Ferreira et al. 1997), atenuando el efecto perjudicial inducido por el NaCl y/o por la concentración de boro. De esta forma, Alpaslan y Gunes (2001) observaron que en plantas de pepino cultivadas con boro (10 mg kg^{-1}), la concentración de Cl^- disminuía con respecto a las plantas de pepino cultivadas con 0 mg kg^{-1} de boro, y resultados similares se encontraron en pimiento (Yermiyahu et al. 2008). Sin embargo, Grieve et al. (2010) no observaron apenas efecto sobre la concentración de Cl^- foliar en plantas de brócoli cultivadas con 24 mg L^{-1} de boro con respecto a las cultivadas con 0.5 mg L^{-1} de boro. Masood et al. (2012) encontraron que la salinidad y la toxicidad por boro ($200 \mu\text{M}$), tenían un efecto aditivo y negativo sobre la biomasa de la parte aérea de plantas de trigo, aunque previno el aumento inducido por salinidad de NO_3^- y PO_4^{3-} y, redujo la concentración de Cl^- simplástico.

1.2.1.3. Salinidad y CO₂

La calidad nutricional así como el rendimiento de los cultivos de crucíferas o el contenido en compuestos bioactivos en brócoli se afecta por las condiciones medioambientales (Charron et al. 2005a) y de crecimiento (Rosa et al. 1996; Wszelaki y Kleinhenz 2003; Padilla et al. 2007a), incluyendo la temperatura y el fotoperiodo (Charron y Sams 2004), la estación del año (Rosa y Rodrigues 2001) y la salinidad (Lopez-Berenguer et al. 2009).

Por otra parte, se sabe que la concentración atmosférica de CO₂ tiene implicaciones para la agricultura y el medio ambiente en su conjunto, y representa un factor ambiental que está experimentando grandes cambios, desde 280 ppm en la época preindustrial hasta llegar a 394 ppm aproximadamente en 2012 (<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>). Además, las simulaciones climáticas indican un aumento constante de hasta el doble de la concentración que existía en la década pasada (Gerber et al. 2004; Norby y Luo 2004).

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que los niveles elevados de CO₂ mejoran la fotosíntesis, dando lugar a un crecimiento vigoroso de las plantas y un mayor rendimiento (de Souza et al. 2008). El proceso de la fotosíntesis es objetivo principal de muchas formas de estrés ambiental, como la salinidad (García-Sánchez et al. 2002; Liska et al. 2004; Stepien y Klobus 2006). A concentraciones altas (500 mM) el NaCl puede inhibir directamente la fotosíntesis (Stepien y Johnson 2009). Además, un efecto importante del estrés salino es la alteración del equilibrio hídrico (Martínez-Ballesta et al. 2006). Para conservar el agua, las plantas cierran sus estomas, lo cual restringe la entrada de CO₂ a la planta, reduciendo la fotosíntesis. Por lo tanto, es importante saber cómo se afecta la fijación de CO₂ con la salinidad.

Por otra parte, los glucosinolatos podrían verse afectados por el enriquecimiento de CO₂ en la atmósfera, ya que éste aumenta el suministro de carbono de la planta, diluyendo así su contenido de nitrógeno (Cotrufo et al. 1998). Además, se ha observado que a niveles elevados de CO₂ (850 μmol mol⁻¹) (Phillips et al. 2006) la síntesis de aminoácidos tales como cisteína y metionina aumenta, debido al aumento de la fotosíntesis, que a su vez favorece un mayor contenido de glucosinolatos alifáticos derivados de estos aminoácidos (Grubb y Abel 2006).

1.3. Importancia del azufre en plantas superiores

1.3.1. Importancia del metabolismo del azufre para las plantas

Se sabe que el azufre (S) es el principal componente empleado en la síntesis de aminoácidos azufrados cisteína y metionina, determinantes en el valor nutricional de las plantas (Huxtable 1986) y elementos centrales en el metabolismo del azufre en todos los organismos (Scott y Eagleson 1988), además de la síntesis del tripeptido glutation y otros metabolitos secundarios esenciales, así como de la síntesis de compuestos bioactivos como glucosinolatos y compuestos fenólicos.

Los compuestos biológicos en donde se involucra el S son diversos en tipo y complejidad; van desde moléculas pequeñas o medianas (30-70 Daltons), muchas de ellas con olores y sabores característicos (como el sulfuro de alilo, responsable del olor de los ajos), hasta proteínas y otros polímeros (Benavides 1998). Además, aproximadamente un 40 % de las enzimas (entre ellas ferredoxinas, nitrogenasas, etc.) dependen para su actividad catalítica de la presencia de grupos sulfidrilo (-SH). Dichos grupos proporcionan sitios de unión para metales tóxicos o fisiológicamente

importantes. También se sabe que la estructura terciaria y cuaternaria de muchas proteínas es resultado de la presencia de puentes disulfuro (-S-S-) formados por la oxidación de grupos -SH de la cisteína (Benavides 1998).

En plantas superiores, el metabolismo del S comienza con la absorción por las raíces del SO_4^{2-} inorgánico, transformado en cisteína y varios metabolitos secundarios azufrados. La reducción asimilatoria del SO_4^{2-} es un proceso dependiente de la luz y se lleva a cabo en los cloroplastos (Anderson 1981; Rennenberg et al. 1982). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios moleculares para este proceso tan importante. Así, la investigación sobre este macronutriente en plantas, ha sido hasta el momento menor que la realizada por ejemplo para los nutrientes N o P (Güsewell et al. 2002; Kerkhoff et al. 2006).

En las plantas, se sabe desde hace muchos años, que existe una estrecha relación entre el estado nutricional del N y el del S (Rendig et al. 1976; Reuveny et al. 1980), de hecho, aproximadamente el 80 % del N y S incorporados en las plantas lo hacen en las proteínas, cuando ambos elementos se encuentran en proporciones adecuadas.

En la actualidad, y debido a la aparición en la agricultura de problemas relacionados con la deficiencia de S, su investigación se ha acelerado e intensificado de manera importante, y es cuando se está comprobando realmente su esencialidad en las plantas superiores (Hawkesford 2000; Boem et al. 2007; Lucheta y Lambais 2012; D'Hooghe et al. 2013).

1.3.2. Metabolismo del azufre

La vía de asimilación del SO_4^{2-} en las plantas se conoce desde hace relativamente poco tiempo (Suter et al. 2000) y ha sido sometida a varias revisiones exhaustivas (Leustek et al. 2000; Saito 2004; Rausch y Wachter 2005) (Figura 1.4). La absorción del SO_4^{2-} en las células vegetales está facilitada por transportadores de SO_4^{2-} (Buchner et al. 2004) (Figura 1.4 [1]). Debido a que es un compuesto muy estable e inerte, antes de la reducción del SO_4^{2-} , se tiene que activar a adenosina 5'-fosfosulfato (APS) por adenilación catalizada por la ATP sulfurilasa (ATPS) (Figura 1.4 [2]). La APS se reduce a SO_3^{2-} mediante la APS reductasa (APR) (Figura 1.4 [3]). El SO_3^{2-} se reduce a S^{2-} por ferredoxina dependiente de sulfito reductasa (Figura 1.4 [4]) y entonces, se incorpora al esqueleto del aminoácido de O-acetilserina (OAS), que se sintetiza por la acetilación de la serina por la serina acetiltransferasa (SAT) (Figura 1.4 [6]), para formar cisteína en una reacción catalizada por O-acetilserina (tiol) liasa (Leustek et al. 2000; Kopriva 2006) (Figura 1.4 [5]).

La asimilación del SO_4^{2-} se limita a los plastidios, sin embargo, algunas reacciones se producen también en otros compartimentos. La síntesis de cisteína, por ejemplo, se produce en los tres compartimentos capaces de sintetizar proteínas, es decir, plastidios, citosol y mitocondrias (Wirtz et al. 2004). La actividad ATPS se detecta tanto en plastidios como en el citosol (Rotte y Leustek 2000; Yi et al. 2010). Por otro lado, las enzimas que intervienen en los pasos reductores de la vía, APR y sulfito reductasa, se localizan exclusivamente en los plastidios (Kopriva et al. 2008). La ATPS total foliar y la actividad APS disminuye con la edad de la hoja (Rotte y Leustek 2000; Phartiyal et al. 2006). Sin embargo, la ATPS citosólica y plastidial están reguladas de manera diferente, así mientras que la actividad plastidial

disminuye con el tiempo, la citosólica es cada vez mayor con la edad de la hoja. Esto indica diferentes funciones de la ATPS en los dos compartimentos: una disposición de APS para la reducción de SO_4^{2-} para los procesos biosintéticos requeridos para el crecimiento en los plastidios, y la participación en la síntesis de compuestos secundarios en el citosol (Rotte y Leustek 2000).

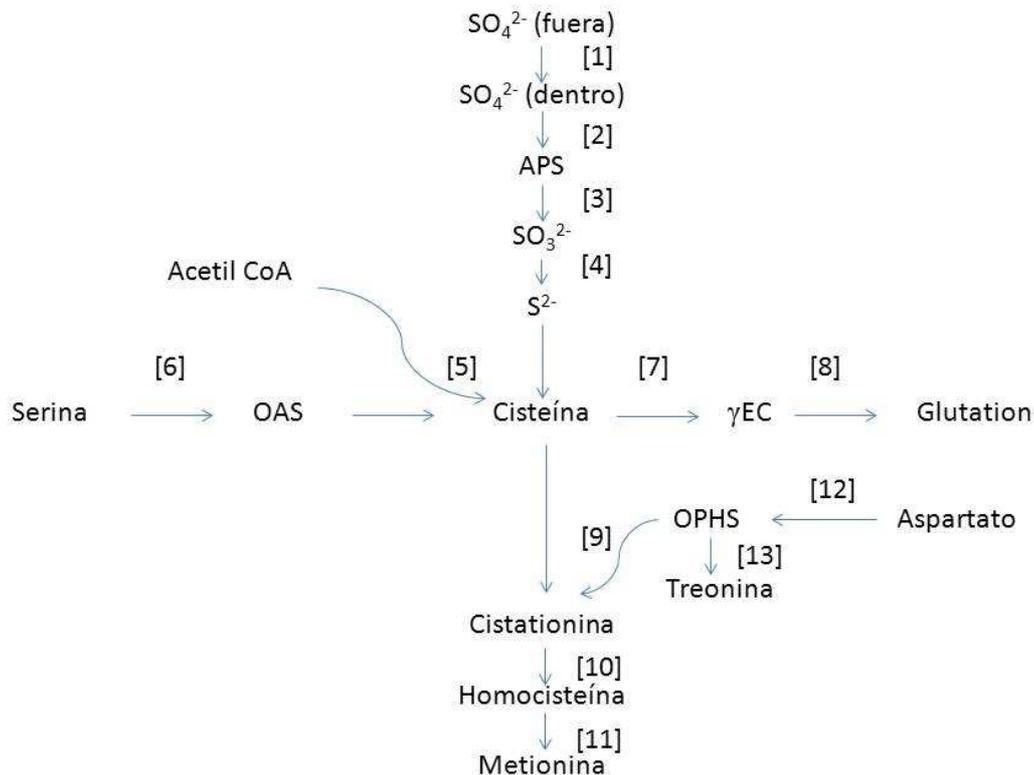


Figura 1.4. Vía de biosíntesis de cisteína, glutatión y metionina (Modificado de Hawkesford y de Kok 2006). Las enzimas claves implicadas son: [1] transportadores de azufre, [2] ATP sulfurilasa, [3] APS reductasa, [4] sulfito reductasa, [5] O-acetil-L-serina (tiol) liasa, [6] serina acetiltransferasa, [7] γ -glutamincisteína sintetasa, [8] glutatión sintetasa, [9] cistationina γ -sintetasa, [10] cistationina β -liasa, [11] metionina sintetasa, [12] aspartato kinasa, aspartato semialdehído dehidrogenasa, homoserina dehidrogenasa, homoserina kinasa, [13] treonina sintetasa. CoA, coenzima A; γ -EC, γ -glutamincisteína, OPHS, O-fosfohomoserina.

La cisteína es esencial tanto en la estructura como en las funciones catalíticas de las proteínas, debido fundamentalmente a que los grupos tioles oxidados de dos cisteínas pueden formar un enlace covalente disulfuro. Estos enlaces son los más

importantes en el establecimiento de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas (Benavides 1998). Además, otra función esencial de la cisteína es que resulta indispensable, junto al micronutriente hierro, en las reacciones de transferencia de electrones en la fotosíntesis y en la respiración. Además, la cisteína es el principal donador de S reducido necesario para la síntesis de compuestos orgánicos, muy importantes en el metabolismo celular, como por ejemplo vitaminas, hormonas, poliaminas, sulfolípidos, moléculas inductoras, y fitoalexinas (Jenkinson 1988).

Los compuestos orgánicos derivados de la cisteína más estudiados y de mayor relevancia biológica son:

- El glutatión (GSH)
- La metionina y sus derivados como la S-adenosil-metionina (SAM) y los glucosinolatos (alifáticos) (Fahey et al. 2001).

El glutatión (GSH) es un tripéptido sintetizado a partir de aminoácidos esenciales. Está formado por un grupo nitrogenado-glutamil, un residuo central de cisteína y un grupo terminal carbonado constituido por la glicina. En 1976, Rennenberg sugiere al GSH como la molécula de S-reducido implicada en la regulación de la absorción y asimilación de SO_4^{2-} . En la actualidad, se ha comprobado el papel del GSH como uno de los principales antioxidantes en las plantas y precursor del ácido ascórbico, además de su papel como regulador del metabolismo del S. Aunque el GSH se encuentra en todos los órganos vegetales, existen diferencias de concentración entre órganos e inclusive dentro de cada órgano, dependiendo del estado de desarrollo de la planta y las condiciones ambientales. Las

concentraciones de GSH también se alteran por factores nutricionales como la disponibilidad de S y N. En general, el GSH se encuentra en el citoplasma y en el núcleo a concentraciones muy similares (250 μM), mientras que la mayor parte del GSH se presenta en la mitocondria (490 μM) (Zechmann et al. 2008b). La síntesis del GSH en las plantas tiene lugar en el cloroplasto y se produce mediante una serie de reacciones dependientes del ATP como donador de energía, que se agrupan mediante el nombre de Ciclo γ -glutamil. Para la formación del GSH se realizan consecutivamente 2 reacciones bioquímicas catalizadas por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS) y la GSH sintetasa (GSH-S) (Figura 1.4). En la primera reacción se produce la unión entre el grupo carboxil del glutamato (aminoácido procedente del metabolismo nitrogenado) y la cisteína, dando lugar al compuesto γ -glutamilcisteína. En la segunda reacción la enzima GSH-S cataliza la formación del GSH a través de la unión del grupo carboxil de la cisteína, con el grupo amino de la glicina (Kopriva 2011). La enzima limitante y clave de este proceso es la γ -ECS mientras que la importancia de la enzima GSH-S en el proceso parece ser menor. Se ha comprobado que la sobreexpresión de la enzima γ -ECS resulta en un aumento de la absorción de SO_4^- y de la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de cisteína, como son la ATP-S y la SAT (Figura 1.3). Por el contrario, la sobreexpresión de la enzima GSH-S no produce estos efectos (Strohm et al. 1995).

Como se ha dicho anteriormente, el S es precursor de cisteína y metionina, aminoácidos implicados en la síntesis de compuestos azufrados (Marschner 1995, Scherer 2001). Además, la importancia del S en los mecanismos de tolerancia a la salinidad, es más que evidente, por la regulación de diferentes enzimas de asimilación de S, bajo estrés salino. López-Berenguer et al. (2007), demostraron que

las enzimas implicadas en la asimilación del azufre, aumentaban por la salinidad. Es necesario el estudio del metabolismo del S en la fisiología y las respuestas de las plantas, a la salinidad y el aumento continuado de la concentración de CO₂ atmosférica, incluyendo las respuestas de las formas orgánicas de S, en estas condiciones de elevado CO₂ atmosférico y salinidad, pues no se conoce actualmente.

1.3.3. Glucosinolatos

Los Glucosinolatos, también llamados "glucósidos de aceites de mostaza" o "tioglucósidos", son metabolitos secundarios aniónicos nitrógeno-sulfurados que se encuentran casi exclusivamente en la familia *Brassicaceae* (crucíferas) que incluye hortalizas de consumo como la col, la coliflor, el repollo, el brócoli y las mostazas, la rúcula, el berro, el rábano, etc. (Fahey et al. 2001; Verkerk et al. 2009). El esqueleto básico de los glucosinolatos (β -D-tioglucosido-*N*-hidroxisulfato) consiste en un grupo β -D-tioglucosa, una oxima sulfonada y una cadena lateral derivada de los aminoácidos metionina, fenilalanina, o triptófano con una cadena lateral variable (Finley 2005) (Figura 1.5). La estructura química de los glucosinolatos y su contenido pueden variar entre especies y entre variedades dentro de la misma especie (Fahey et al. 2001; Domínguez-Perles et al. 2010).

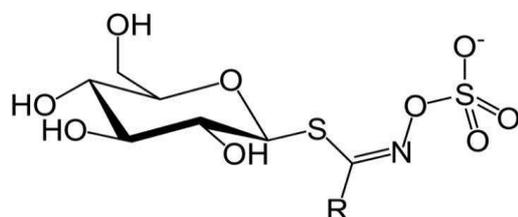


Figura 1.5. Esqueleto básico de los glucosinolatos. Cada glucosinolato tiene un grupo -R diferente.

En la actualidad se conocen casi 200 glucosinolatos en el reino vegetal, diferenciándose en los aminoácidos de su cadena lateral (Fahey et al. 2001, Clarke 2010).

De acuerdo a la cadena lateral, los glucosinolatos pueden clasificarse ampliamente en:

- Alifáticos
- Aromáticos
- Benzoicos
- Glucosinolatos glicosilados múltiples
- Glucosinolatos con azufre en su cadena lateral
- Heterocíclicos o indólicos (Halkier y Gershenzon 2006)

Los glucosinolatos alifáticos poseen un grupo alquilo de cadena lateral y son los glucosinolatos derivados de la metionina, a los cuales hacíamos referencia en el apartado anterior. Entre ellos, los que contienen azufre son los predominantes. Estos glucosinolatos alifáticos a su vez, pueden estar subdivididos en glucosinolatos metilsulfanilalquil, metilsulfinalalquil y metilsulfonilalquil, según el estado oxidativo del átomo de S. Sin embargo, los glucosinolatos aromáticos son los derivados de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-tirosina, y los glucosinolatos indólicos son los derivados del aminoácido L-triptófano (Fahey et al. 2001, Clarke 2010).

Los glucosinolatos presentan diversas e importantes propiedades fisiológicas. Por un lado, constituyen un mecanismo de defensa para la planta contra herbívoros y patógenos, ya que altas concentraciones de glucosinolatos producen estrés metabólico en herbívoros invertebrados oportunistas (o generalistas) y dañan su

crecimiento (Pracros et al. 1992; Zúkalová et al. 2010). Además, como se ha dicho anteriormente, los glucosinolatos son compuestos beneficiosos para la salud humana (Zareba y Serradell 2004; Finley 2005; Jeffery y Araya 2009). Sin embargo, estos metabolitos no son bioactivos en el animal que los consume hasta que han sido hidrolizados a isotiocianatos por la enzima mirosinasa (Fahey et al. 2001; Rouzaud et al. 2003) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Clasificación de los glucosinolatos más representativos en brócoli según su estructura y sus productos de hidrólisis.

ESTRUCTURA	NOMBRE TRIVIAL	ISOTIOCIANATO ASOCIADO
Alifáticos	Glucosiberina (GI) Glucorafanina (GR) Glucosruerucina (GE)	Iberina (IB) Sulforafano (SFN) Erucina (ER)
Aromáticos	Gluconasturtina (GN)	Fenil-iso-tiocianato (PEITC)
Indólicos	Glucobrasicina (GB) Neoglucobrasicina (NGB)	Indol-3-carbinol (I3C)

Los glucosinolatos provienen del metabolismo de los α -aminoácidos, a través de una serie de reacciones en las que el grupo carboxilo se pierde y el carbono α se transforma en el carbono central del glucosinolato (Mikkelsen et al. 2002). El S como constituyente de los aminoácidos metionina y cisteína está directamente implicado en la biosíntesis de los glucosinolatos (Grubb y Abel 2006).

La biosíntesis de glucosinolatos puede ser dividida en tres fases (Mithen et al. 2000; Huamaní-Parado 2009) (Figura 1.6):

- 1) Elongación de la cadena lateral de los aminoácidos
- 2) Síntesis del glucosinolato a partir del aminoácido modificado
- 3) Modificaciones de la cadena lateral de los glucosinolatos

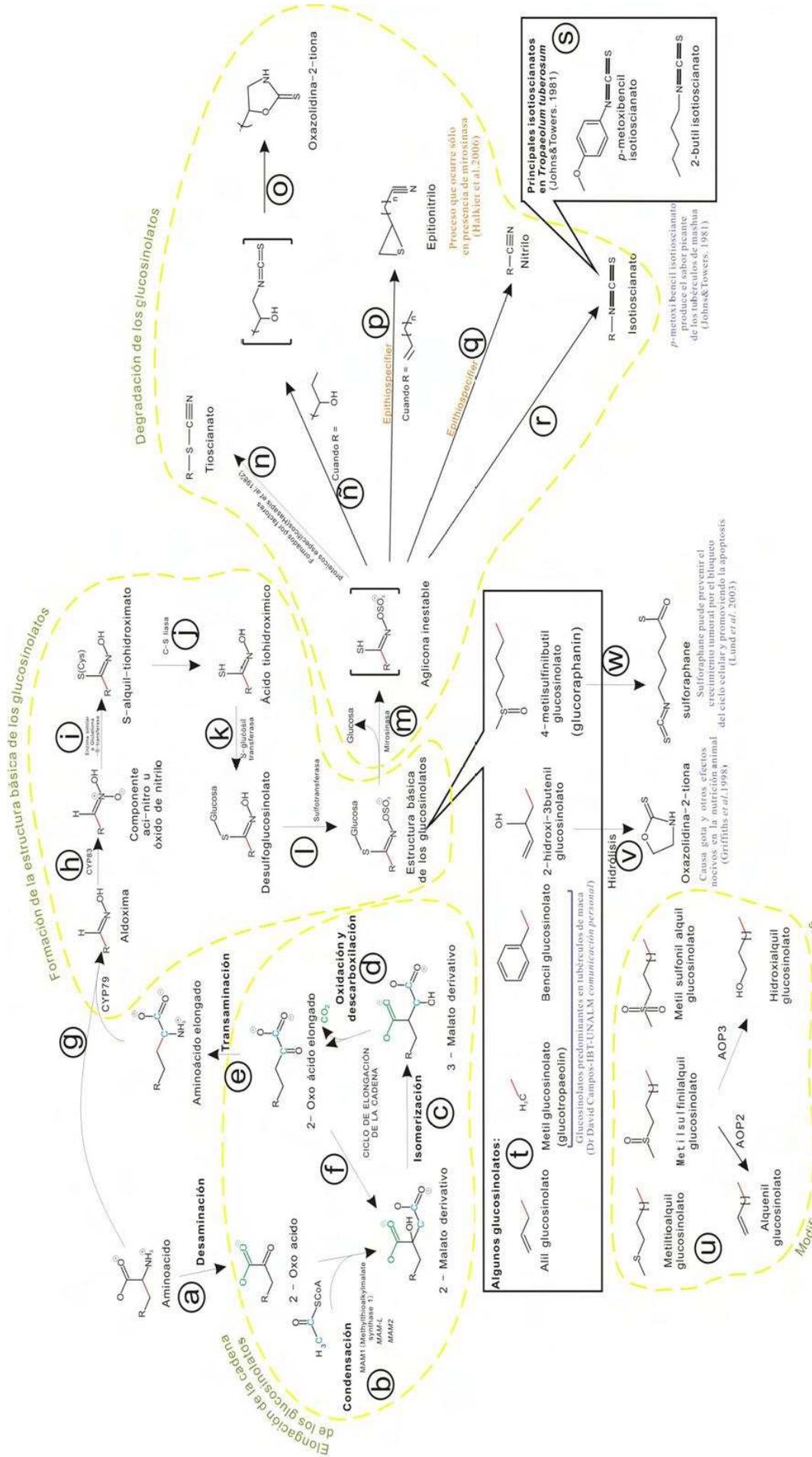


Figura 1.6. Vía metabólica de los glucosinolatos. Los pasos (a-w) se indican en el texto (la elongación de la cadena, la formación de la estructura básica, la modificación de la estructura y la degradación de los glucosinolatos). Esquema modificado de Huamani-Parado (2009, Ph.D.Thesis).

Elongación de la cadena lateral de los aminoácidos

En primer lugar, los aminoácidos alifáticos o aromáticos son desaminados para formar los correspondientes 2-oxo ácidos (Figura 1.6, a). Enseguida, esta molécula es condensada con un acetil-CoA mediante la actividad de la isopropil malato sintasa, para formar un derivado de 2 malato (Figura 1.6, b), que luego se isomeriza para formar el derivado 3-malato (Figura 1.6, c). A continuación, ocurre la oxidación y descarboxilación (Figura 1.6, d), donde se pierde el grupo carboxilo del aminoácido inicial, y se da lugar a una molécula 2-oxo ácido elongada, que puede entrar nuevamente al ciclo de elongación (Figura 1.6, f) o, mediante transaminación, formar un aminoácido elongado (Figura 1.6, e).

Síntesis de la estructura básica de los glucosinolatos a partir del aminoácido modificado

La biosíntesis de la estructura de glucosinolatos involucra intermediarios comunes en todos los glucosinolatos. Los intermediarios en la ruta, desde los aminoácidos hacia la estructura básica incluyen N-hidroxi aminoácidos, aldoxinas (Figura 1.6, g), aci-nitro o componentes óxido de nitrilo (Figura 1.6, h), S- alquil tiohidroximatos (Figura 1.6, i), ácido tiohidroxímico (Figura 1.6, j) y finalmente, los desulfoglucosinolatos (Figura 1.6, k). Las Citocromo P450, que pertenecen a la familia CYP79, catalizan la conversión de los aminoácidos a aldoximas (Wittstock y Halkier 2002; Grubb y Abel 2006). La enzima que metaboliza la aldoxina en la vía de los glucosinolatos es conocida como CYP83B1 (Bak et al. 2001; Hansen et al. 2001; Smolen y Bender 2002; Halkier y Gershenzon 2006).

Modificaciones de la cadena lateral de los glucosinolatos

Las formas parentales de glucosinolatos inicialmente formadas (Figura 1.6, l), están sujetas a un amplio rango de modificaciones posteriores en el grupo R (ver Figura 1.5). El grupo R de los glucosinolatos derivados de metionina y sus homólogos de cadena elongada, están especialmente sujetos a modificaciones posteriores; tales como la oxidación sucesiva del átomo de S en la cadena lateral del metiltioalquil, conduciendo sucesivamente, a las moléculas de metilsulfinilalquil y metilsulfonilalquil (Figura 1.6, u). Las cadenas laterales del metilsulfinilalquil pueden ser modificadas mediante roturas oxidativas para lograr cadenas alquenil o hidroxialquil. Poco se conoce acerca de las bases moleculares y bioquímicas de otras transformaciones secundarias, tales como la esterificación de los grupos hidroxilos libres por ácido benzoico, excepto que esas reacciones siguen la formación del esqueleto básico de los glucosinolatos (Graser et al. 2001; Halkier y Gershenzon 2006).

Degradación de los glucosinolatos

La degradación de los glucosinolatos (Figura 1.6) se activa con los daños en la integridad física de la planta y resulta en una diversidad de compuestos isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos. Comienza cuando la enzima tioglucósido glucohidrolasa (mirosinasa), enzima presente en todas las plantas que contienen glucosinolatos, rompe el enlace tioglucósido del glucosinolato, de donde se origina glucosa y una aglicona inestable (Bones y Rossiter 1996) (Figura 1.6, m) y transforma los glucosinolatos en una gran variedad de compuestos como tiocianatos

(Figura 1.6, n), oxazolidinonas (Figura 1.6, ñ-o), epitionitros (Figura 1.6, p), nitrilos (Figura 1.6, q) e isotiocianatos (Figura 1.6, r-s). Estos productos de degradación dependen de los glucosinolatos de partida, las condiciones de la reacción (pH e iones metálicos) y la presencia de compuestos reactivos añadidos. Los productos de degradación más comunes a pH fisiológico son los isotiocianatos, responsables de la pungencia de la mayoría de hortalizas del género *Brassica* (Bones y Rossiter 1996; Halkier y Gershenzon 2006). Los isotiocianatos también son agentes preventivos del cáncer debido a su capacidad para inducir enzimas de fase II de desintoxicación tales como las quinona reductasas y las glutatión-S-transferasas (Zhang et al. 1992; Tawfiq et al. 1995). El sulforafano (Figura 1.6, w), el producto de hidrólisis de 4-(metilsulfinil)butil glucosinolato (glucorafanina), es un mono-inductor muy potente del metabolismo de la fase II. Induce la apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral durante las fases de iniciación, promoción y progresión (Mi et al. 2007; Traka et al. 2010).

1.3.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, consideradas metabolitos secundarios de las plantas (Lule y Xia 2005). Harborne (1989) describieron los compuestos fenólicos como estructuras químicas formadas por al menos un anillo aromático y un anillo bencénico, con uno o más grupos hidroxilos incluyendo derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.

Existen estudios que demuestran que las plantas sintetizan compuestos fenólicos para protegerse de los herbívoros (Beckman 2000; Franceschi et al. 2005;

Pourcel et al. 2007), de las radiaciones UV u otras situaciones de estrés físico (Woodall y Stewart 1998; Zagoskina et al. 2003). Otro papel de los compuestos fenólicos es el de ser atractivos de animales polinizadores y/o diseminadores de semillas (Taiz y Zeiger 2006). También actúan como señales químicas entre plantas y microorganismos simbióticos (Nair et al. 1991), ejercen una función estructural, por el efecto de las ligninas en el soporte mecánico de las plantas (Manna et al. 1997; Boudet 2007) y contribuyen a las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal, como las frutas (Fang et al. 2007).

Los compuestos fenólicos de las plantas tienen como propiedades generales las de ser anticancerígenos y antioxidantes (Yao et al. 2004; Alia et al. 2006), ejercer efectos quelantes y modular la actividad de varios sistemas enzimáticos, y aunque pueden ser beneficiosos para el organismo (Gee y Johnson 2001; Balasundram et al. 2006), queda mucho por investigar sobre sus efectos en la salud de los consumidores.

Según Harborne (1989), los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica (Martínez-Valverde et al. 2000):

Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil-acéticos

En este grupo se encuentran los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol, que están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales; los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainillínico, *p*-hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos. Por el

contrario existe poca información en la literatura científica sobre los ácidos fenilacéticos en los vegetales (Wightman y Lighty 1982).

Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (caféico, ferúlico, *p*-cumárico y sinápico) se encuentran por regla general en forma de derivados glucosilados. Así, Belitz y Grosch (1988) establecieron que el ácido caféico se encuentra esterificado con el ácido quínico como ácido clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico. Además, por primera vez en 1999, Clifford estableció el brócoli y otras crucíferas como la fuente principal de ésteres y glicósidos del ácido sinápico.

Por otro lado, Bravo (1998) propuso que las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósidos, mientras que los cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio (Belitz y Grosch 1988).

Lignanos y neolignanos

Metabolitos de las plantas de bajo peso molecular. Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno (Chesson et al. 1997). El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno, la molécula resultante se denomina neolignano (ver índice de Merck 1983).

Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos, siendo los polifenoles los más distribuidos en las plantas. Son compuestos de bajo peso molecular, formados por dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirano (difencilpiranos C6-C3-C6). Esta estructura básica presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirano dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavan-3-oles, isoflavonoides, chalconas, dihidrochalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas y proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de todos estos grupos las flavonas (p.e. apigenina, luteolina y diosmetina), los flavonoles (p.e. quercitina, miricetina y kaempferol) y sus glicósidos, son los compuestos más abundantes en los vegetales (Prior et al. 2006).

En la composición del brócoli, se encuentran varios metabolitos secundarios de tipo flavonoide, siendo los flavonoles los mayoritarios. Los glicósidos más abundantes encontrados en brócoli son los sofrósidos de quercetina y kaempferol (Vallejo et al. 2004a).

Dentro de los flavonoides coloreados, las antocianinas o antocianos (del griego anthos=flor y kia-nos= azul) son el grupo de pigmentos vegetales más importante y son considerados también como componentes multifuncionales de los alimentos debido a su actividad antioxidante y a otras propiedades biológicas beneficiosas (Drabent et al. 1999; Sadilova et al. 2006). Están presentes en casi todas las plantas y en todas sus partes, sobre todo en flores y frutos. Su estructura corresponde a heterósidos formados por la combinación de una aglicona

(antocianidina) y de un azúcar (generalmente la glucosa). Además, su contribución a la pigmentación de los alimentos vegetales está claramente reconocida. Son responsables de los colores rojo, azul, violeta y púrpura de la mayoría de las plantas y de sus productos (Andersen 2001).

Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 Da. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales (1 a 2 por 100 Da), siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras macromoléculas. Los taninos pueden clasificarse en dos grupos: taninos hidrolizables y no hidrolizables o taninos condensados. Los taninos condensados tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa, y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente bien con el ácido gálico o bien con el ácido hexahidroxidifenico, formando los galotaninos y elagitaninos, respectivamente. Tras la hidrólisis con ácidos, bases o ciertas enzimas, los galotaninos dan glucosa y ácido gálico (Chung et al. 1998).

Los compuestos fenólicos se sintetizan a través de numerosas rutas y por eso constituyen un grupo tan heterogéneo desde el punto de vista metabólico. Las dos rutas metabólicas básicas implicadas son:

- La ruta del ácido siquímico (importante en plantas superiores)
- La ruta del ácido malónico (Taiz y Zeiger 2002)

La ruta del ácido siquímico convierte los carbohidratos sencillos, procedentes de la glicólisis y la ruta de las pentosas fosfato, en aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) (Herrmann y Weaver 1999). Esta ruta une el metabolismo de los carbohidratos con la biosíntesis de los compuestos aromáticos. En una secuencia de 7 pasos metabólicos, el fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato son convertidos en corismato, el precursor de muchos metabolitos aromáticos secundarios y de los aminoácidos aromáticos, del que darán lugar los distintos compuestos fenólicos o, como se ha dicho en el apartado anterior, incorporándose a la ruta de síntesis de glucosinolatos, podrán ser los precursores de los glucosinolatos aromáticos e indólicos (Fahey et al. 2001).

La ruta del siquímico solamente se encuentra en microorganismos y plantas, nunca en animales, ya que los animales no son capaces de sintetizar los 3 aminoácidos aromáticos.

2. JUSTIFICACIÓN

Y

OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) es una hortaliza que ha ganado relevancia científica y social en los últimos años, gracias a numerosos estudios científicos que lo reconocen como un vegetal rico en nutrientes y compuestos bioactivos beneficiosos para la salud, como son los minerales, la vitamina C, los glucosinolatos y los compuestos fenólicos, con numerosas evidencias acerca de su potencial en la prevención de muchas enfermedades degenerativas y diversos tipos de cáncer.

La Región de Murcia es el área de producción principal a nivel nacional. La tolerancia del brócoli al clima semiárido y a la escasez de agua de riego en las zonas de cultivo, ha provocado una sobreexplotación de los recursos hídricos subterráneos provocando un problema creciente de contaminación salina de los acuíferos. A su vez se ha producido un incremento de la búsqueda de recursos hídricos alternativos como son las aguas procedentes de desaladoras. El brócoli, que presenta mayor tolerancia a la salinidad que otros vegetales como la lechuga o el maíz, ve afectada su composición en nutrientes y compuestos bioactivos en función de las condiciones ambientales y las técnicas de producción. Se necesita más información sobre el efecto de los parámetros ambientales, en especial bajo condiciones desfavorables de estrés abiótico, sobre la acumulación de nutrientes y compuestos bioactivos en el brócoli como el S, ligado a la formación y degradación de compuestos beneficiosos

para la salud como son los glucosinolatos, así como a la respuesta de compuestos fenólicos y nutrientes.

Existe una interacción entre los nutrientes minerales y el estado hídrico de la planta, por lo que ambos aspectos son fundamentales para entender la respuesta de las plantas al estrés y su adaptación al medio. En este contexto, las acuaporinas juegan un papel importante en la respuesta al estrés salino y a otros estreses abióticos, regulando el transporte de agua a través de las membranas. Se hace necesario conocer las respuestas bioquímicas y fisiológicas del brócoli en dichas condiciones adversas.

Por lo tanto, el brócoli, es una hortaliza interesante y relevante para su estudio y consumo, y es necesario el conocimiento de los factores que afectan a sus compuestos bioactivos, frente a diferentes situaciones de estrés abiótico, que alterarán su equilibrio hídrico y nutricional. Los resultados que se obtendrán serán de gran aplicabilidad en las áreas de agricultura y alimentación.

2.2. Objetivos

Por todo lo expuesto anteriormente se plantearon los siguientes objetivos:

2.2.1. Objetivo principal

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es evaluar los factores ambientales y condiciones adversas que van a condicionar la respuesta de diferentes

variedades de brócoli a nivel fisiológico, así como sobre su calidad nutricional. Se estudiarán por tanto, las variaciones de los nutrientes y los compuestos bioactivos y las posibles alteraciones celulares a nivel de la membrana plasmática y expresión de acuaporinas en dichas condiciones, para ver su relación con otros parámetros fisiológicos.

Para la consecución de este objetivo general se llevarán a cabo diferentes estudios y trabajos experimentales, para comprobar la hipótesis de partida y para este fin, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

2.2.2. Objetivos parciales

- Estudiar el efecto de las condiciones ambientales, sobre las respuestas fisiológicas y la absorción de nutrientes, en nuevas variedades de brócoli violeta características de latitudes frías. Estudio de las variaciones de los compuestos bioactivos, con el fin de poder establecer los parámetros de calidad y el valor nutritivo de estos nuevos cultivares, en comparación con variedades de brócoli verde tradicional, de gran importancia económica en la Región de Murcia.
- Caracterizar el perfil de los compuestos bioactivos del brócoli por medio del análisis de la vitamina C, los glucosinolatos y los compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, flavonoles y antocianos).

- Caracterizar a nivel fisiológico y molecular, el brócoli cultivado con agua de baja calidad, mediante el estudio fisiológico del efecto combinado del estrés por exceso de boro y salinidad, sobre las relaciones hídricas, el transporte de agua y la absorción de nutrientes, mediante el estudio bioquímico del efecto del exceso de boro y la salinidad sobre la membrana plasmática, las acuaporinas y los compuestos bioactivos, con el fin de definir parámetros de cultivo como herramientas para mejorar la calidad nutricional del brócoli.
- Determinar el efecto de la interacción del CO₂ y la salinidad en plantas de brócoli, con el estudio bioquímico y fisiológico de la respuesta a la elevada concentración de CO₂ y salinidad, y cuantificar la magnitud de estos estreses sobre el metabolismo del azufre.
- Evaluar la producción de isotiocianatos de diferentes fuentes de glucosinolatos comparando entre cultivares de brócoli experimentales y distintas muestras comerciales, para investigar su potencial biodisponibilidad en el organismo.

3. MATERIAL

Y

MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

La especie hortícola objeto de estudio es el brócoli (*Brassica oleracea* L. [Grupo Italica]). Para los distintos experimentos realizados se seleccionaron variedades cultivadas disponibles comercialmente:

1. Naxos. Procedente de Sakata Seed Ibérica S.L. (Valencia, España) (Figura 3.1).



Figura 3.1. Inflorescencia característica de *Brassica oleracea* L., var. Itálica cv. Naxos.

2. Viola. Procedente de Thompson & Morgan (Reino Unido) (Figura 3.2).

Se emplearon 3 cultivares diferentes según su ciclo de crecimiento:

- Brócoli púrpura Rudolph de geminación extra temprana (EEP).
- Brócoli púrpura de germinación temprana (EP).
- Brócoli púrpura de germinación tardía (LP).

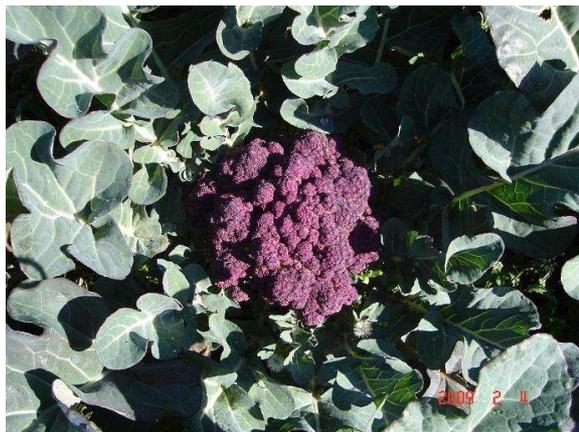


Figura 3.2. Inflorescencia característica de *Brassica oleracea* L., var. *Italica* cv. *Viola*.

Además de semillas y plantas de brócoli experimentales, se utilizaron diferentes muestras comerciales de ingredientes elaborados a partir de la planta de brócoli, con el fin de poder comparar su composición y biodisponibilidad, obtenidas de AQP&Ingredients S.L. (Murcia) y Draco Natural Products, Inc. (San Jose, California, USA). Además, se utilizaron muestras adicionales de origen comercial de polvo de maca (*Lepidium meyenii* Walp) como ‘Energy-Mac’ (Naturalsol SAC, Pucusana, Lima, Perú) y ‘Harina’ (El oro de los Andes, Alcorcón, Madrid, España) así como muestras de maca producida naturalmente (crecimiento local) (Lima, Perú), por sus perfiles de composición en glucosinolatos y producción industrial diferentes a las del brócoli.

3.2. Germinación y cultivo de las plantas

Las semillas de brócoli se prehidrataron en agua desionizada, durante 2 horas en solución de NaClO 0.5 % para descontaminarlas y a continuación, hasta 24 horas, para inducir su germinación. Se colocaron en bandejas con vermiculita en una cámara de germinación a 28 °C durante 3 días y en oscuridad (Figura 3.3).



Figura 3.3. Germinación de semillas de brócoli en vermiculita.

Las semillas ya germinadas, se transfirieron a una cámara de cultivo con condiciones controladas, con un ciclo de 16 horas de luz – 8 horas de oscuridad, temperatura ambiente de 25 – 18 °C y humedad relativa (HR) de 60 – 80 % respectivamente. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) fue de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suministrada por una combinación de tubos fluorescentes (Philips TLD 36W/83 Alemania y Silvana F36W/GRO, USA) y lámparas halógenas (Osram HQI.T 400W, Alemania). Después de 3-5 días, y con la aparición de las primeras hojas verdaderas, se transplantaron a un cultivo hidropónico (Figura 3.4). Para ello, se colocaron en contenedores opacos de 15 L con disolución nutritiva $\frac{1}{2}$ Hoagland: KNO_3 (6 mM), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (4 mM), KH_2PO_4 (1 mM), MgSO_4 (1 mM), H_3BO_3 (25 μM), MnSO_4 (2 μM), ZnSO_4 (2 μM), CuSO_4 (0.5 μM), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (0.5 μM), Fe-EDTA (20 μM) y aireación continua.



Figura 3.4. Plantas de brócoli en cultivo hidropónico.

A los 15 días en hidroponía, cuando las plántulas ya tenían 22-24 días de edad, se aplicaron los distintos tratamientos y generalmente, la recolección de los tejidos así como las medidas fisiológicas de las plantas, se realizaron 15 días después de la aplicación de dichos tratamientos. La disolución nutritiva se reemplazaba completamente una vez a la semana y 3 días antes de cada experimento. Los distintos tratamientos aplicados, así como las condiciones de cultivo y experimentales, se describirán posteriormente en cada capítulo de forma específica.

3.2.1. Condiciones experimentales en exterior

Después de 24 días en hidroponía (Días Después del Transplante (DAT) = 0), las plantas se pasaron a contenedores con un sustrato inerte (1/3 perlita 1/2 vermiculita) en condiciones de luz natural y se empleó la misma solución Hoagland para el riego (realizada 2 veces por semana). Diariamente (Tabla 3.1), se midió la temperatura y la Humedad Relativa (RH) en el cultivo usando un registrador de datos

que tomaba las medidas cada 30 minutos (Tinytag, Germini Dataloggers, AFORA, Murcia).

Tabla 3.1. Condiciones experimentales (día / noche) para el cultivo al aire libre de brócoli de Diciembre de 2009 a Marzo de 2010, en un entorno no controlado con clima Mediterráneo del SE español (Murcia).

Edad de la planta (DAT) ^a	0	1 a 12	13 a 43	44 a 71	72 a 95
Temperatura del aire (°C) ^b	17.3/-1.7	20.4/3.7	16.7/-0.3	17.9/1.7	19.8/0.9
Humedad Relativa (%) ^b	21.6/67.3	35.4/80.1	23.1/83.2	21.2/80.0	21.8/88.9
PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ^b	947	1162	1049	553	1482

^aDías Después del Transplante (DAT); 31 días de edad = 0 DAT.

^bValores medios del período de tiempo.

El rango de temperatura del aire fue 18-20 °C (máximo) y 2-10 °C (mínimo) mientras que la humedad relativa (HR) fue de 70-100 % (máximo) y 20-40 % (mínimo) y la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) estaba en torno a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante los primeros 43 DAT con una reducción hasta 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en 41-71 DAT seguido de un aumento de hasta 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al final del cultivo (Tabla 3.1).

3.2.2. Condiciones experimentales en invernadero

Después de 24 días en hidroponía (Días Después del Transplante (DAT) = 0), las plantas se pasaron a contenedores con un sustrato inerte (1/3 perlita 1/2 vermiculita) en condiciones de invernadero y se empleó la misma solución Hoagland para el riego (realizada 2 veces por semana). Diariamente se midió la temperatura y la Humedad Relativa (RH) en el cultivo usando un registrador de datos que tomaba

las medidas cada 30 minutos (Tinytag, Germini Dataloggers, AFORA, Murcia). La humedad registrada en el invernadero era de 50/80 % (día/noche) y la temperatura del aire presentó un rango máximo de 20-28 °C y mínimo de 14-18 °C. La Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) se redujo en un 58% con respecto a la PAR obtenida en condiciones de exterior (Ver punto anterior).

3.3. Determinaciones analíticas

3.3.1. Determinación de biomasa

Para las determinaciones de biomasa en la recolección, las plantas fueron limpiadas cuidadosamente, de cualquier resto de sustrato, ya fuera sustrato inerte o hidroponía. Cada planta se separó en raíz, tallo, hojas e inflorescencia (si lo hubiera) y se midió el peso fresco (PF g⁻¹ planta).

A continuación se midió el peso seco (PS) del material vegetal introduciendo las muestras en una estufa de aire forzado a 70 °C durante un mínimo de 3 días hasta alcanzar un peso constante.

3.3.2. Área foliar

Se estimó el área foliar de cada planta a lo largo del experimento, para ello se realizaron diariamente, medidas de área foliar en la tercera hoja verdadera debidamente etiquetada con anterioridad, dibujando el contorno foliar en una transparencia. A continuación se escanearon todos los contornos foliares

pertenecientes a cada planta y se determinó el área (cm²) con el software IMAGEJ (Li-Cor Model Li-3100 AreaMeter, Tecnoquim S.L., Murcia, España).

3.3.3. Pigmentos foliares

Para realizar las medidas de los pigmentos foliares (clorofilas y carotenoides), se recogieron muestras de hojas (10 mg de peso fresco) y se mantuvieron en tubos Eppendorf con 1 mL de metanol al 80 %, a 4 °C en oscuridad, durante 24 horas.

Después de esto, el sobrenadante se transfirió a un tubo de ensayo y el contenido en pigmentos (clorofila A, clorofila B y carotenoides) se midió con un espectrofotómetro (modelo Spectronic Helios Alpha UV-Vis, Thermo Scientific, Loughborough, Inglaterra) a una longitud de onda de 470 nm, 653 nm y 666 nm.

La concentración de clorofilas y carotenoides (µg cm⁻²) se determinó utilizando las ecuaciones de Wellburn (1994):

Clorofila A:

$$ClorA = (5.65 \times A_{666nm}) - (1.34 \times A_{653nm})$$

Clorofila B:

$$ClorB = (7.05 \times A_{653nm}) - (1.21 \times A_{666nm})$$

Carotenoides:

$$Car = \frac{(1000 \times A_{470nm}) - (1.86 \times ClorA) - (2.92 \times ClorB)}{221}$$

3.3.4. Nutrientes

3.3.4.1. Cationes y elementos totales

Se analizó la concentración de los macronutrientes (calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg), sodio (Na), fósforo (P) y azufre (S) y de los micronutrientes (boro (B), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn) a partir de muestras de material vegetal seco, finamente molido en molinillo de laboratorio (modelo A10 IKA, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania), que proporciona muestras de ensayo de 0.5 a 0.7 mm de tamaño de partícula. Las muestras (100 mg) se sometieron a una digestión ácida de HNO₃ concentrado y HClO₄ (2:1) en un horno de microondas (CEM Mars Xpress, Matthews, NC, EE.UU.), llegando a 200 °C en 20 minutos y manteniéndolas a esta temperatura durante 2 horas. Las concentraciones de los elementos se determinaron mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplada inductivamente (ICP), modelo 5500 (Perkin-Elmer, Boston, MA) a 589 nm. Los iones se detectaron con un detector de conductividad y se cuantificaron mediante la comparación de áreas de los picos con los de los estándares conocidos.

3.3.4.2. Contenido de aniones

Para la determinación de los aniones (Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻), se pesaron 50 mg de material vegetal seco molido, a los que se añadieron 10 mL de agua bidestilada. Se pusieron en agitación durante 30 minutos para que la mezcla quedara homogénea y posteriormente, se centrifugaron a 4 °C, a 3000 g y durante 20 minutos,

usando una centrífuga Universal Hettich 132R (Tuttlingen, Alemania). Se recogió el sobrenadante para las determinaciones y se filtró a través de filtros de membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.2- μm (Anotop 10 plus, Whatman, Maidstone, UK). Para determinar las concentraciones de aniones se utilizó un cromatógrafo iónico Dionex D-100 (Sunnyvale, CA) con una columna Ionpac AS12A (4 x 250 mm) (10-32) y una pre-columna AG 14 (4 x 50 mm). El flujo de la fase móvil fue de 1.5 mL min⁻¹ y la composición del eluyente fue de 2.7 mM Na₂CO₃ y 0.3 mM NaHCO₃. La concentración de Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ y SO₄²⁻ se determinó con el programa de cromatografía Chromeleon/Peaknet 6.40 por comparación de las áreas de los picos de patrones con concentraciones conocidas (Equilabo, Las Torres de Cotillas, Murcia, España).

3.3.4.3. Determinación de carbono y de nitrógeno totales

Para realizar el análisis de carbono (C) y nitrógeno (N) total, las muestras secas fueron procesadas con molinillo de análisis (modelo A10 IKA, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) hasta un tamaño de partícula de 0.5 a 0.7 mm.



Figura 3.5. Autoanalizador de elementos del CEBAS-CSIC.

Las muestras se separaron en submuestras (alrededor de 2-3 mg PS) de hojas, tallos, frutos y raíces para determinar C y N totales con un autocalizador de elementos Termo Finnigan-1,112 EA (Termo-Fisher, Milán, Italia) (Figura 3.5).

3.3.5. Parámetros de intercambio gaseoso

Tanto la asimilación neta de CO_2 (ACO_2) como la conductancia estomática (G_s) y la transpiración de la hoja (E), se midieron utilizando un sistema configurado de fotosíntesis portátil (modelo LCA-4; ADC Bioscientific Ltd. Hoddesdon, Reino Unido) con una cámara foliar PLC-4N (con una superficie para la hoja de 11.35 cm^2) para un sistema abierto (Figura 3.6). Se utilizaron las hojas jóvenes completamente expandidas.

Las mediciones se realizaron una vez al día y en un intervalo de tiempo de 2 horas desde las 11:00 horas hasta las 13:00 horas, en mitad del fotoperiodo, con el fin de recoger los valores más altos, y sólo se midió en los días claros para minimizar el impacto de la variabilidad en la intensidad de luz diurna, en las plantas cultivadas al aire libre y en invernadero.



Figura 3.6. Sistema portátil de medición de fotosíntesis.

Por otra parte, la eficiencia de uso del agua (*Water Use Efficiency*, WUE) se determinó como la relación entre la transpiración y la asimilación neta de CO₂ o tasa fotosintética (Xu y Zhou 2008).

3.3.6. Medidas de relaciones hídricas

3.3.6.1. Conductancia hidráulica de raíz (L₀)

La conductancia hidráulica de las raíces se midió mediante la cámara de Scholander (Jackson et al. 1996) (Figura 3.7).



Figura 3.7. Cámara de Scholander para la determinación de la L₀.

La cámara de Scholander se compone de un envase de acero que tiene en la tapa una entrada con un tapón de goma perforado para ubicar el órgano de estudio. En el extremo del cilindro se encuentra la entrada de la presión de aire comprimido regulado por un manómetro. El día previo a las mediciones, se separaron las plantas en contenedores individuales para evitar que las raíces se enredaran entre sí y se rompieran.

En el momento del análisis, se cortó la parte aérea de cada planta, y se colocó la raíz dentro de la cámara de presión con la misma disolución nutritiva en la que había estado creciendo, quedando el hipocotilo en el exterior de la cámara. El hipocotilo ha de quedar bien ajustado con el tapón de goma del sistema para evitar cualquier escape de la presión que se aplique. La cámara se cerró herméticamente y se aumentó gradualmente la presión (desde 0.1 a 0.5 MPa) a las raíces cortadas. El flujo del xilema generado equivale al flujo de transpiración de la planta completa. En las medidas con cámara de presión, se asume que existe un equilibrio entre la presión negativa del xilema y la presión que fuerza a la salida del agua de las células a los vasos (Mota-Cadenas 2011, Ph. D. Thesis).

El xilema se recogió en tubos Eppendorf y se pesaron en balanza de precisión (+/- 10 mg, ALC-210.4, Acculab, Sartorius Group, Goettingen, Germany). El flujo (J_v) se expresó en $\text{mg (g peso fresco de la raíz)}^{-1} \text{ hora}^{-1}$ y se representó frente a la presión (MPa), donde la pendiente representa el valor de la conductividad hidráulica de la raíz (L_0) ($\text{mg (g peso fresco de la raíz)}^{-1} \text{ hora}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$).

Las medidas de conductancia hidráulica se realizaron a mitad del fotoperiodo y dos semanas después de la aplicación de los tratamientos.

3.3.7. MSI. Índice de estabilidad de la membrana plasmática

El índice de estabilidad de la membrana plasmática se calculó a partir de muestras de 200 mg de raíz, que se dividieron en dos submuestras y se pusieron en tubos que contenían 10 mL de agua bidestilada.

Por un lado, una submuestra se calentó a 40 °C durante 30 minutos en un baño de agua, y la conductividad eléctrica de la solución se registró como C1. El

segundo grupo, se colocó en un baño de agua a 100 °C durante 10 minutos, y la conductividad eléctrica resultante fue conocida como C2.

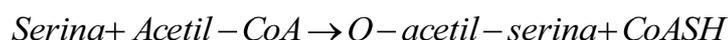
El índice de estabilidad de la membrana plasmática se calculó usando la siguiente ecuación (Sairam 1994):

$$MSI(\%) = \left(1 - \frac{C1}{C2} \right) \times 100$$

3.3.8. Determinación de actividades enzimáticas

3.3.8.1. Actividad Serina Acetiltransferasa (SAT)

El método de determinación de la SAT, se basó en la formación de cisteína por la enzima medida con el Reactivo de Ninhidrina. Se determinó de acuerdo con el método descrito por Nakamura et al. (1987). La enzima interviene en la siguiente reacción:



Las muestras de hojas jóvenes plenamente desarrolladas (0.25 g PF) se homogeneizaron con 2.5 mL de tampón fosfato potásico 0.2 M (pH 8) que contenía 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 0.5 mM. El homogenado se filtró a través de una malla de nylon (100 µm) y se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C. El extracto filtrado se utilizó para la determinación de SAT.

La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 300 µL: K₃PO₄ 2 mM, serina 2 mM, acetilCoA 250 µM, Na₂S 500 µM, 30 µg BSA (albúmina de suero

bovino) y una cantidad apropiada de extracto enzimático (50 µL). Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 25 °C. La reacción se detuvo al poner los tubos en hielo y adicionarle 400 µL de HCl 4 M.

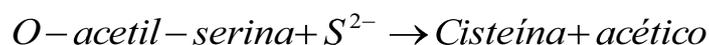
A continuación, se centrifugó la muestra a 15000 g durante 3 minutos y se tomó una alícuota de 200 µL a la que se le añadieron otros 200 µL de Reactivo de Ninhidrina (Gaitonde 1967). La mezcla se calentó a 100 °C durante 10 minutos y rápidamente se enfrió en hielo. Se añadieron 400 µL de etanol 99.5 % y pasados 15 minutos, se determinó la absorbancia a 560 nm.

La curva de calibración se realizó con el mismo procedimiento sustituyendo la cantidad de extracto enzimático por cisteína. Se empleó una solución madre de cisteína para obtener un rango de concentraciones de 10 a 660 nmol de cisteína. La solución madre se disolvió en el tampón de extracción (tampón fosfato potásico 0.2 M, pH 8). La actividad se expresó como mmoles de cisteína mg proteína⁻¹.

3.3.8.2. Actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa (OASTL)

Al igual que en la anterior actividad, el método de determinación de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa se basó en la formación de cisteína por la enzima medida con el Reactivo de Ninhidrina.

Se determinó de acuerdo con el método descrito por Nakamura et al. (1987) modificado por Stuiver y De Kok (2001). La enzima interviene en la siguiente reacción:



Las muestras de hojas jóvenes plenamente desarrolladas (1 g PF) se homogeneizaron con 10 mL de tampón fosfato potásico 0.2 M (pH 8) que contenía 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 0.5 mM. El homogenado se filtró a través de una malla de nylon (100 μ m) y se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C. El extracto filtrado se utilizó para la determinación de OASTL.

La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 480 μ L: Tris-HCl (pH 7.5) 0.2 M, DTE (ditioeitol) 0.01 M, O-acetil-L-serina-HCl 7.8 mM, Na₂S 2.7 mM y una cantidad apropiada de extracto enzimático (20 μ L). Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 25 °C. La reacción se detuvo al poner los tubos en hielo y adicionarles 400 μ L de HCl 4 M.

A continuación, se centrifugó la muestra a 15000 g durante 3 minutos y se tomó una alícuota de 200 μ L a la que se le añadieron otros 200 μ L de Reactivo de Ninhidrina (Gaitonde, 1967). La mezcla se calentó a 100 °C durante 30 minutos y rápidamente se enfrió en hielo. Se añadieron 400 μ L de etanol 99.5 % y pasados 15 minutos, se determinó la absorbancia a 560 nm.

La curva de calibración se realizó con el mismo procedimiento sustituyendo la cantidad de extracto enzimático por cisteína. Se empleó una solución madre de cisteína para obtener un rango de concentraciones de 10 a 660 nmol de cisteína. La solución madre se disolvió en el tampón de extracción (tampón fosfato potásico 0.2 M (pH 8)). La actividad se expresó como mmoles de cisteína mg proteína⁻¹.

3.3.8.3. Actividad ATP sulfurilasa

La actividad ATP sulfurilasa fue medida por la formación de pirofosfato dependiente de molibdato tal y como describe Lappartient y Touraine (1996), que se representa por la reacción en la que actúa la enzima:



Las muestras de hojas jóvenes plenamente desarrolladas (0.5 g PF) se homogeneizaron con 2.5 mL de tampón de maceración que consistió en Tris-HCl 20 mM (pH 8) que contenía Na₂EDTA 10 mM y DTT (ditioetriol) 2 mM, junto con 0.025 g mL⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona) insoluble. El homogenado se filtró a través de una malla de nylon (100 µm) y se centrifugó a 20000 g durante 10 minutos a 4 °C. El extracto filtrado se utilizó para la determinación de la actividad ATP sulfurilasa.

La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 300 µL: Tris-HCl 80 mM (pH 8), MgCl₂ 7 mM, Na₂MoO₄ 5 mM, ATP (adenosín trifosfato) 2 mM, 0.032 unidades mL⁻¹ de pirofosfatasa inorgánica libre de sulfato disueltos en Tris-HCl 80 mM (pH 8) y una cantidad apropiada de extracto enzimático (50 µL).

Además, a un tubo por muestra (standard) se le añadió 50 µL de extracto crudo junto con 250 µL de la mezcla de reacción excepto el Na₂MoO₄ 5 mM que se substituyó por tampón Tris-HCl 80 mM (pH 8). Todos los tubos se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo al poner los tubos en hielo y adicionarles 500 µL de acetato de sodio 0.5 M (pH 4) y 100 µL de solución de desarrollo (Na₂MoO₄, Na-L-ascórbico y H₂SO₄ concentrado).

Tras agitación durante 10 minutos, se determinó colorimétricamente el color azul a una longitud de onda de 660 nm frente a una curva patrón donde las diferentes concentraciones de Pi se prepararon con el tampón de maceración. Se empleó una solución madre de Pi para obtener un rango de concentraciones de 10 a 100 μM de Pi.

Finalmente, la actividad ATP sulfurilasa se calculó mediante la diferencia entre el valor de muestra con la mezcla de reacción completa y la mezcla de reacción sin Na_2MoO_4 5 mM. La actividad se expresó como mmoles de Pi mg proteína^{-1} .

3.3.8.4. Actividad γ -glutamylcisteina sintetasa (γ -EC sintetasa)

La actividad γ -glutamylcisteina sintetasa consistió en la medida del Pi liberado tras la hidrólisis del ATP por la enzima.

La extracción se basó en el método de Rügsegger y Brunold (1992) y la cuantificación estuvo basada en el método de Cobbett et al. (1998). La enzima interviene en la siguiente reacción:



Las muestras de hojas jóvenes plenamente desarrolladas (0.5 g PF) se homogeneizaron con 2.5 mL de tampón de maceración que consistió en Tris-HCl 0.1 M (pH 8) que contenía EDTA 5 mM. El homogenado se filtró a través de una malla de nylon (100 μm) y se centrifugó a 30000 g durante 10 minutos a 4 °C. El extracto filtrado se utilizó para la determinación de la actividad γ -EC sintetasa.

La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 450 μL : HEPES-NaOH 100 mM (pH 8), MgCl_2 40 mM, L-glutamina 30 mM, L-cisteína 0.8 mM, DTT 0.4 mM, ATP 5 mM, PEP (fosfoenolpiruvato) 5 mM y una cantidad apropiada de extracto enzimático (100 μL). Todos los tubos se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo al poner los tubos en hielo y adicionarles 500 μL de acetato de sodio 0.5 M (pH 4) y 100 μL de solución de desarrollo (Na_2MoO_4 , Na-L-ascórbico y H_2SO_4 concentrado).

Tras agitación durante 10 minutos, se determinó colorimétricamente el color azul a una longitud de onda de 660 nm frente a una curva patrón donde las diferentes concentraciones de Pi se prepararon con el tampón de maceración.

Se hizo también un control de cada muestra para ver el Pi del extracto crudo, en cuyo caso se paró la reacción inmediatamente tras la adición del extracto (sin incubar). Se empleó una solución madre de Pi para obtener un rango de concentraciones de 10 a 100 μM de Pi.

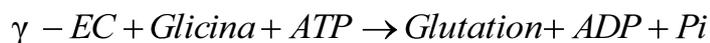
Finalmente, la actividad glutatión sintetasa correspondió a la diferencia entre el valor de muestra con la mezcla de reacción incubada y la mezcla de reacción sin incubar. La actividad se expresó como mmoles de Pi mg proteína^{-1} .

3.3.8.5. Actividad Glutathion Sintetasa (GluS)

La actividad glutathion sintetasa consistió en la medida del Pi liberado tras la hidrólisis del ATP por la enzima.

La extracción estuvo basada en el método de Rügsegger y Brunold (1992) y la cuantificación se basó en el método de Cobbett et al. (1998).

La enzima interviene en la siguiente reacción:



Las muestras de hojas jóvenes plenamente desarrolladas (0.5 g PF) se homogeneizaron con 2.5 mL de tampón de maceración que consistió en Tris-HCl 0.1 M (pH 7.5) que contenía MgCl₂ 10 mM y EDTA 1 mM. El homogenado se filtró a través de una malla de nylon (100 µm) y se centrifugó a 30000 g durante 20 minutos a 4 °C. El extracto filtrado se utilizó para la determinación de la actividad glutatión sintetasa.

La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 500 µL: Tris-HCl 90 mM (pH 8.4), MgCl₂ 20 mM, KCl 45 mM, glicina 2 mM, γ-glutamilcisteina 0.5 mM, DTT 4 mM, ATP 7 mM, PEP 5 mM y una cantidad apropiada de extracto enzimático (100 µL). Todos los tubos se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo al poner los tubos en hielo y adicionarles 500 µL de acetato de sodio 0.5 M (pH 4) y 100 µL de solución de desarrollo (Na₂MoO₄, sodio-L-ascórbico y H₂SO₄ concentrado).

Tras agitación durante 10 minutos, se determinó colorimétricamente el color azul a una longitud de onda de 660 nm frente a una curva patrón donde las diferentes concentraciones de Pi se prepararon con el tampón de maceración.

Se hizo también un control de cada muestra para ver el Pi del extracto crudo, en cuyo caso se paró la reacción inmediatamente tras la adición del extracto (sin incubar). Se empleó una solución madre de Pi para obtener un rango de concentraciones de 10 a 100 µM de Pi. Finalmente, la actividad glutatión sintetasa correspondió a la diferencia entre el valor de muestra con la mezcla de reacción

incubada y la mezcla de reacción sin incubar. La actividad se expresó como mmoles de Pi mg proteína⁻¹.

3.3.8.6. Actividad Mirosinasa

El método empleado fue el descrito por Charron y Sams (2004).

El análisis de la actividad mirosinasa se basó en la disminución de la absorbancia a 227 nm medida en un espectrofotómetro con luz UV (Shimadzu, Kyoto, Japón), resultado de la hidrólisis enzimática de sinigrina (Palmieri et al. 1982).

Se homogeneizaron 300 mg de material vegetal congelado en nitrógeno líquido con 1 mL de tampón citrato-fosfato 30 mM (pH 7) que contenía EDTA 1 mM. El homogenado se filtró por malla de nylon (100 µm) y se centrifugó a 30000 g durante 4 minutos a 4 °C. El extracto filtrado se utilizó para la determinación de la actividad mirosinasa.

La mezcla de reacción con un volumen final de 1.5 mL (25 ± 1 °C) fue preparada con 1.35 mL de buffer citrato-fosfato 30 mM (pH 7), EDTA 1 mM y 100 µL de sinigrina 37.5 mM, y una cantidad adecuada de extracto (50 µL). La mezcla se agitó en vórtex durante 5 segundos y transferida a microcuvetas de cuarzo (13 x 100 mm) específicas para el espectrofotómetro (V-630 UV-VIS Spectrophotometer, Jasco Analytical Instrument, Easton, Maryland, Estados Unidos).

Como referencia se usó una mezcla de reacción sin sinigrina, que fue sustituida por 100 µL de agua. A continuación, se esperó 1 minuto para la estabilización del espectrofotómetro y se midió la absorbancia durante 5 minutos. La actividad se midió en la fase lineal de la curva que representó la disminución de la

sinigrina en la mezcla de reacción. Se empleó la fórmula descrita anteriormente por Li y Kushad (2004):

$$Ucm^{-3} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon l} \times \frac{V_A}{V_E} \times 10^3$$

Teniendo en cuenta que:

- El coeficiente de extinción molar (ϵ) fue $6784 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Palmieri et al. 1982).
- La longitud de paso de luz en la cubeta (l) fue 1 cm.
- El volumen total del ensayo (V_A) fue 1.5 cm^3 .
- El tiempo de reacción (t) fue 5 minutos.
- El volumen de la solución de enzima (V_E) se dio en μL .
- Una unidad (U) de actividad mirosinasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de $1 \mu\text{mol}$ de sinigrina por minuto.

La concentración de proteínas del extracto crudo se determinó utilizando el kit de ensayo Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA, USA) el cual está basado en el método de Lowry (Lowry et al. 1951). La albúmina de suero bovino se usó para la realización de la curva estándar a fin de determinar la concentración de proteína expresada como mg de proteína por g de peso fresco y, se usó en la determinación de la actividad específica (U mg^{-1} de proteína). La actividad se expresó como mmoles de sinigrina mg proteína^{-1} .

3.3.9. Determinación del contenido de glutatión (GSH)

El GSH total se determinó de acuerdo con el método descrito por Ruíz y Blumwald (2002). Para la determinación de GSH total, el tejido foliar se extrajo con ácido m-fosfórico (pH 2,8) 6 %, que contenía EDTA 1 mM. El GSH total se midió en una mezcla de reacción que consistió en 400 μ l de reactivo A ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 110 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, EDTA 15 mM y 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) 0.3 mM), 320 μ l de reactivo B (EDTA 1 mM, imidazol 50 mM, y un equivalente de 1.5 unidades de actividad GR (levadura de panadero, Tipo III, Sigma)), y 400 μ l de una dilución 1:50 del extracto foliar en Na_2HPO_4 (pH 7,5) 5 %, preparado inmediatamente antes de iniciar el ensayo. La reacción se inició con la adición de 80 μ l of NADPH y se midieron los cambios de absorbancia a 412 nm.

3.3.10. Extracción y determinación de vitamina C

En un agitador vórtex se homogeneizó 50 mg de muestra liofilizada durante 30 segundos, con 5 mL de solución de extracción compuesta por MeOH/ H_2O (5:95), 21 g L^{-1} de citrato, 0.5 g L^{-1} de EDTA y 0.1 g L^{-1} de NaF. El homogenado se filtró con gasas y el pH se ajustó a 2.2-2.4 por adición de HCl 6N. El extracto se centrifugó (3600 g durante 15 minutos a 4 °C), se recogió el sobrenadante que posteriormente se filtró a través de cartuchos de Sep-Pack C_{18} (Waters, Milford, Mass., USA), previamente activados con 10 mL de metanol seguido del mismo volumen de agua y el mismo volumen de aire y la fracción acuosa se filtró por un filtro de 0.45 μ m de PVDF (Millex HV13, Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). El ácido ascórbico (AA) y dehidroascórbico (DHAA) se determinaron según Zapata y Dufour (1992).

Los análisis por HPLC de la vitamina C (AA + DHAA) se llevaron a cabo después de la derivatización del DHAA al fluoróforo 3-(1,2-dihidroxietil)furo(3,4-b)quinoxalina-1-ona (DFQ) con 1,2-ortofenilendiamina (OPDA) preparado diariamente. La solución de OPDA se añadió a la fracción soluble en agua eluída anteriormente (1:3, v:v) y se incubó en oscuridad durante 37 minutos a temperatura ambiente. Las muestras (20 μL) se analizaron con HPLC Merck-Hitachi (Tokio, Japón) equipado con un detector L-4000 UV y una bomba L-6000. Las separaciones de DFQ y AA se realizaron con columnas Kromasil 100 C-18 (25 \times 0.4 cm; con un tamaño de partícula de 5 μm ; Tecnokroma, Barcelona, España). La fase móvil estaba formada por metanol:agua (5:95, v:v) con 5 mM cetrimida y 50 mM dihidrogenofosfato potásico (pH 4.5). El flujo fue de 0.9 mL min^{-1} , la longitud de onda del detector se puso inicialmente a 348 nm y, después de la elución de DFQ, se cambió manualmente a 261 nm para la detección de AA.

3.3.11. Extracción y determinación de glucosinolatos y compuestos fenólicos

El método utilizado para la extracción de glucosinolatos y compuestos fenólicos se basó en el método descrito por Domínguez-Perlés et al. (2010) y el análisis se realizó por HPLC-DAD. La muestra liofilizada molida (50 mg) se extrajo con 1.5 mL de MeOH 70 % en un baño caliente a 70 °C durante 30 minutos agitando cada 5 minutos con un agitador vórtex. A continuación se centrifugaron las muestras con el fin de que el material insoluble precipitara, durante 15 minutos, a 10000 g y a 4 °C (Sigma 1-13, B. Braun Biotech International, Osterode, Alemania). El sobrenadante se recogió y el metanol se evaporó en un rotavapor (Laborota 4000-

efficient, Heidolph) a 30 °C hasta aproximadamente 1 mL. El material seco que se obtuvo se redisolvió en agua ultra pura Milli-Q con el mismo volumen inicial del sobrenadante y se filtró con un filtro de 0.2 μm (Anotop 10 plus, Whatman, Maidstone, Reino Unido). Las muestras se mantuvieron en hielo durante el procedimiento.

Cada muestra (20 μL) se analizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, figura 3.8) Waters (Waters Cromatografía S.A., Barcelona, España) compuesto por un sistema de reparto de eluyente W600E, un degasificador en línea, un automuestreador W717 plus y un detector de fotodiodeo W2996. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna Luna C18 (25 \times 0.46 cm, 5 μm de tamaño de partícula; Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido) con una precolumna C18-ODS (4 \times 30 mm, Phenomenex). La fase móvil consistió en una mezcla de agua/ácido trifluoroacético (99.9:0.1, v:v) (A) y una mezcla de acetonitrilo/ácido trifluoroacético (99.9:0.1, v:v) (B). El flujo fue de 1 mL min^{-1} en gradiente lineal comenzando con 1 % B hasta 17 % B a los 15 minutos y 25 % B a los 22 minutos, 35 % B a los 30 minutos, 50 % B a los 35 minutos y 99 % B a los 40 minutos.



Figura 3.8. Cromatógrafo Waters (Waters Cromatografía S.A., Barcelona, España).

Los glucosinolatos y los compuestos fenólicos se identificaron con el método HPLC-LC/MS (Martínez-Sánchez et al. 2006; Domínguez-Perlés et al. 2010) y se cuantificaron utilizando sinigrina (sinigrina monohidrato procedente de *Sinapis nigra*, Phytoflan Diehm y Neuberger, GmbH, Heidelberg, Alemania) como estándar externo de glucosinolatos alifáticos (Baenas et al. 2012) y glucobrasicina (Phytoflan Diehm y Neuberger, GmbH, Heidelberg, Alemania) como estándar externo de glucosinolatos indólicos.

Los derivados del ácido cafeoilquínico fueron cuantificados usando ácido clorogénico (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania), los flavonoles se cuantificaron usando quercetina-3-rutinosido (rutin trihydrate; Fluka) y los derivados del ácido sináptico fueron cuantificados usando ácido sinapínico (sinaptic acid-Fluka).

Los cromatogramas se registraron a 227 nm para los glucosinolatos y a 330 nm para los compuestos fenólicos y la concentración de glucosinolatos y compuestos fenólicos se expresó en $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ PF.

3.3.12. Extracción y determinación de antocianinas

Para analizar y cuantificar los antocianos presentes en la materia vegetal, se utilizaron muestras liofilizadas de 100 mg, extraídas en tubos con cubiertas de polipropileno usando 2 mL de MeOH:ácido fórmico:H₂O (25:1:24, v:v:v), durante 24 horas a 4 °C, seguidas de una centrifugación (15 minutos, 10000 g, 4 °C) y recuperación del sobrenadante, que se filtró con membrana inorgánica de 0.2 μm (Anotop 10 plus, Whatman, Maidstone, Reino Unido).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Luna C18 (250 mm × 46 mm, tamaño de partícula de 5 µm; Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido), y con precolumna C18-ODS (4 × 30 mm) (Security Guard, Phenomenex). La fase móvil consistió en ácido fórmico 1 % (A) y acetonitrilo (B) como solventes, comenzando con 5 % B y usando un gradiente para obtener 25 % B a 30 minutos, 50 % B a 35 minutos y 50 % B a 37 minutos, hasta 95 % B a 38 minutos. El flujo fue de 1 mL min⁻¹ y el volumen de inyección fue de 20 µL.

El sistema cromatográfico consistía en un HPLC equipado con bomba multicanal, detector de diodos y un espectrómetro de masas en serie Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), bomba quaternaria, inyector automático, desgasificador en línea y un detector de fotodiodos G1315B, controlado por el software ChemStation (Agilent, v. 08.03).

Los datos de los picos se acumularon en el rango de 240-600 nm, y los cromatogramas se registraron a 520 nm. El espectrómetro de masas con trampa de iones G2445A estaba equipado con un sistema de ionización por electrospray (ESI) y estaba controlado por el software LCMSD (Agilent, v. 4.1). Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador a una presión de 65 psi y el flujo se ajustó a 11 L min⁻¹. La temperatura y el voltaje del capilar se mantuvieron a 350 °C y 5 kV, respectivamente. El intervalo de masas registradas fue entre 200 m/z y 1600 m/z. Los experimentos de fragmentación inducidos por colisión se realizaron en la trampa de iones utilizando helio como gas de colisión, con ciclos rampa de voltaje de 0.3 hasta 2 V. Los datos de MSⁿ fueron adquiridos en el modo de ionización positiva. Los datos de fragmentación se recogieron de la exploración completa de los espectros de masas padres (MS) y MSⁿ (MS2 y MS3) para la fragmentación de los iones moleculares más abundantes.

Tras la identificación de los picos de las muestras analizadas mediante HPLC-DAD-ESI-MSⁿ (Moreno et al. 2010), la solución acuosa fue entonces cuantificada por HPLC-DAD usando cianidina-3-O- β -glucopiranosido como estándar externo (Polyphenols, Norway). La concentración de antocianinas se expresó como mg 100 g⁻¹ PF.

3.3.13. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Para estudiar la degradación de los glucosinolatos a isotiocianatos, así como estudiar su comportamiento y estabilidad en condiciones gastrointestinales teóricas se llevó a cabo una digestión con pepsina y HCl durante 2 horas y una digestión pancreática con sales biliares durante 2.5 horas, ambas a 37°C (Gil-Izquierdo et al. 2002).

La digestión con pepsina y HCl se llevó a cabo mediante la adición a 60 mL de extracto, de 15750 unidades de pepsina (EC 3.423.1; Sigma, Steinheim, Alemania).

El pH se ajustó a 2, y las muestras se incubaron a 37°C en un baño con agitación constante (Selecta, Barcelona, Spain).

La pepsina digerida (20 mL) se transfirió a tubos de polietileno que contienen tubos de diálisis de celulosa (con un peso molecular de corte de 12000 Da; Sigma) con 25 mL de agua y una cantidad de NaHCO₃ (Sigma) equivalente a la acidez valorable (equivalentes de NaHCO₃ requeridos para valorar la mezcla combinada de pepsina-pancreatina-sales biliares a pH 7.5) (Gil-Izquierdo et al. 2002).

Posteriormente, cuando el pH fue 5.0, se añadió 5 mL de pancreatina-sales biliares (0.2:1g) y se mantuvo durante 2 horas para permitir la acción enzimática y

conseguir un equilibrio entre la fracción dializada (permeado) y no dializada (retenido).

Los glucosinolatos presentes en ambas fracciones y los glucosinolatos presentes en la fracción inicial se analizaron mediante HPLC-DAD (Ver apartado 3.3.9) y los isotiocianatos se analizaron mediante UPLC-MS/MS, como se explica a continuación.

3.3.14. Análisis de isotiocianatos (ITCs)

Después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, las muestras de ambas fracciones dializada (permeado) y no dializada (retenido), y la fracción sin digerir se analizaron mediante UPLC-MS/MS (Agilent technologies, Waldbronn, Alemania).

La separación de los isotiocianatos se llevó a cabo mediante un sistema UPLC acoplado a un espectrómetro de masas 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 μ m) (Agilent Technologies, Waldrom, Alemania). La temperatura de la columna se mantuvo a 10 °C. La reacción múltiple monitorizada (MRM) se realizó usando un modo ESI positivo y el tiempo de permanencia fue de 25 ms para todas las transiciones MRM. El análisis MS se aplicó en modo MRM, asignando la transición MRM preferencial de los analitos correspondientes.

Las fases móviles empleadas fueron: solvente A (H₂O/acetato de amonio 13 mM (pH4) (con ácido acético); 99.99:0.01, v:v) y solvente B (ACN/ácido acético; 99.99:0.1, v:v). El flujo fue de 0.3 mL min⁻¹ utilizando el esquema de gradiente

linear (t; % B): (0.00; 60), (7.00; 60), (7.01; 73), (10.00; 73), (10.01; 100), (13.50; 100), y (13.51; 60).

Las condiciones ESI óptimas para la detección máxima de los analitos fueron: flujo de gas: 8 L min⁻¹, nebulizador: 30 psi, voltaje capilar: 2750 V, tensión de la boquilla: 1500 V, temperatura de los gases: 325 °C, temperatura del gas de vaina: 350 °C, y corriente en chorro del flujo de gas: 12 L min⁻¹. El tiempo de adquisición fue de 13.5 minutos para cada muestra con 1.5 minutos para el equilibrado de la columna. Los parámetros MS del fragmentador (voltaje iónico de salida del capilar óptico) y la energía de colisión se optimizaron para cada compuesto, a fin de generar los iones producidos más abundantes para el modo MRM. Se desarrollaron las transiciones de la reacción monitorizada seleccionada (SRM) MS/MS para cada uno de los analitos usando la disociación inducida por colisión (CID). La adquisición de los datos se realizó utilizando el software MassHunter versión B.04.00 (Agilent, Waldrom, Alemania). La concentración de isotiocianatos se expresó como mg 100 g⁻¹ PS.

3.3.15. Análisis de aminoácidos por HPLC-MS

Los aminoácidos se extrajeron de los tejidos vegetales mediante una mezcla de metanol:cloroformo:agua (MCW) (5:12:3, v:v:v). En primer lugar, se pesó el tejido vegetal (0.2 a 1.0 g PF) y se molió utilizando nitrógeno líquido con mortero, hasta conseguir un polvo fino. A continuación se extrajeron los aminoácidos (Cisteína, ácido glutámico, metionina, triptófano y serina) mediante homogenización con 4 alícuotas de 2.5 mL de MCW. Posteriormente, al total de 10 mL de MCW se le añadieron 3 mL de agua y 2 mL de cloroformo, se mezcló y se permitió que las fases

se separaran dejándolo en reposo a 4 °C durante al menos 1 hora, recogiendo entonces la fase superior acuosa (con los aminoácidos), y concentrándola hasta sequedad mediante burbujeo con gas N₂. A continuación, se le añadió 1 mL de agua. El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema de HPLC/MS Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) equipado con bomba multisolventes y automuestreador termostaticado, conectados a una trampa de iones Agilent XCT Plus del espectrómetro de masas (Agilent Technologies) usando una interfaz de electrospray (ESI). Los estándares de concentraciones conocidas de cada aminoácido (0.1, 0.5, 1, 10, 25 y 50 µM), así como las muestras se prepararon utilizando la fase móvil A, que consistió en agua/acetonitrilo/ácido fórmico (89.9:10:0.1, v:v:v), y fueron filtradas mediante filtros de 0.22 µm de PVDF (Millex HV13, Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). Entonces, se inyectó 5 µL de cada estándar o muestra en una columna Zorbax SB-C18 HPLC (5 µm, 150 x 0.5 mm, Agilent Technologies), termostaticada a 40 °C, y se eluyó a un flujo de 5 µL min⁻¹. Además, se usó una fase móvil B, que consistió en agua/acetonitrilo/ácido fórmico (10:89.9:0.1, v:v:v), para la separación cromatográfica. La elución consistió en 5 minutos de 0 % B, un gradiente lineal de 0 a 10 % B en 10 minutos, y 10 % B durante 5 minutos. La columna se equilibró con la composición de partida de la fase móvil durante 20 minutos antes de cada serie de análisis. El cromatograma UV se registró a 210 nm con el módulo DAD (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo positivo con un voltaje del capilar de pulverización de 3500 V, y una velocidad de barrido de 26000 (m z⁻¹) segundo⁻¹ a 50-250 m/z. Además, se ajustó la presión del gas nebulizador (He) a 15 psi, mientras que el gas de secado se fijó a un flujo de 5 L min⁻¹ y a una temperatura de 350 °C. Se extrajeron los cromatogramas de cada

aminoácido tanto de los estándares como los de las muestras, y los picos se cuantificaron usando el programa de análisis de datos para LC/MSD Trap versión 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania). Los datos de las áreas de los picos de los estándares, se utilizaron para el cálculo de la curva de calibración, de la cual se obtuvieron las concentraciones de cada aminoácido en las muestras. La concentración de los aminoácidos se expresó en μM .

3.3.16. Técnicas de proteómica

3.3.16.1. Extracción de proteínas de membrana plasmática

Las membranas plasmáticas de células de raíz se aislaron mediante el sistema de doble fase de polímeros previamente descrito por Larsson et al. (1987) y posteriormente modificado por Gerbeau et al. (2002).

El protocolo descrito a continuación se realizó a 4 °C.

Se tomaron 20 g de raíz, previamente lavada con agua destilada y se cortaron en trozos pequeños. Se añadieron 40 mL de tampón de extracción (sacarosa 500 mM; glicerol 10 %; Na_2EDTA 20 mM; EGTA (ethylene glycol-bis(fl- aminoethylether)-N,N, N',N'-tetraacetic acid) 20 mM; NaF 50 mM; β -glicerofosfato 5 mM; 1,10-fenantrolina 1 mM; Na_3VO_4 1 mM; PVP 0.6 %; ácido ascórbico 5 mM; DTT 5 mM; leupeptina 1 mM; PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 1 mM; Tris-MES (Tris-2-(Nmorpholino) ethanesulfonic acid) 50 mM; pH 8.0) y se le aplicó el vacío a la mezcla durante 10 minutos con el fin de romper las paredes celulares.

A continuación, se homogeneizó el tejido mediante el uso de mano y mortero y se filtró el extracto a través de una membrana de nylon de tamaño de poro de 240

μm . El filtrado se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos, recuperando el sobrenadante que contiene las proteínas totales. Éste se centrifugó a 55000 g durante 35 minutos obteniendo un precipitado microsomal que se resuspendió en 2 mL de tampón de resuspensión microsomal (sacarosa 0.33 M; DTT 2 mM; NaF 10 mM; tampón K-fosfato 5 mM; pH 7.8).

La técnica de doble fase de polímeros (PEG-3350; dextrano T500 5.8 % (v:v) en presencia de KCl 5 mM; sacarosa 330 mM; NaF 2.5 mM; K-fosfato 5 mM; pH 7.8) se basa en la utilización de dos polímeros, el polietilenglicol 3350 (PEG, Sigma) y el dextrano T500 (GE Healthcare), los cuales se utilizan para la purificación de membrana plasmática a partir de la fracción microsomal. Así, esta fracción se añadió a un sistema de fase de 6g de composición mencionada previamente.

A continuación, el sistema de fases se centrifugó a 4000 g durante 5 minutos obteniendo dos fases (sup1, inf1). La fase superior que contiene PEG está enriquecida en vesículas de membrana plasmática mientras que en la fase inferior quedan el resto de endomembranas.

Cada una de las fases obtenidas se pasó a una nueva fase complementaria obtenida mediante la centrifugación en paralelo de una mezcla que contenía 2g de tampón de resuspensión microsomal en un sistema de 6g. Se llevaron a cabo varios procesos de homogeneización/centrifugación tal y como se indica en la figura 3.9.

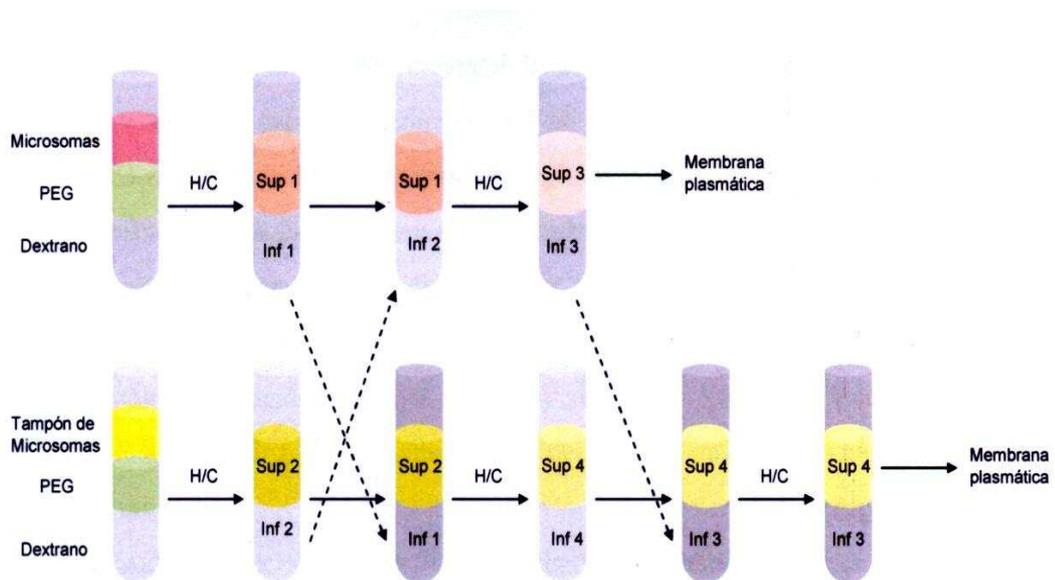


Figura 3.9. Esquema representativo de la purificación de membrana plasmática por el sistema de doble fase de polímeros. Los microsomas se mezclan con el sistema de doble fase compuesto de PEG 3350 y dextrano T-500. Tras homogeneizar y centrifugar, las fases superior e inferior se enriquecen en membrana plasmática y endomembranas, respectivamente. Cada fase (sup 2 e inf 1) se enriquece de nuevo usando fases frescas complementarias (sup 2 e inf 2). Se recuperan las fases sup 3 y 4.

Las fases superiores sup3 y sup4 enriquecidas en membrana plasmática se juntaron y diluyeron en 20 mL de tampón de lavado (sacarosa 300 mM, KCl 9 mM, EDTA 0.2 M; EGTA 0.2 M; NaF 0.5 M y Tris-borato 10 mM; pH 8.3) con el fin de eliminar PEG, y se centrifugaron a 100000 g durante 35 minutos.

Finalmente, el precipitado obtenido se resuspendió en el tampón de lavado utilizado anteriormente, complementado con DTT 5 mM, leupeptina 4.2 μ M y PMSF 1 mM. Las vesículas se congelaron con N₂ líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas se realizó con el kit comercial RC DC Protein Assay de BioRad basado en el método de Lowry (Lowry et al. 1951), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.16.2. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es uno de los sistemas más comúnmente utilizados para separar proteínas en función de su peso molecular (Laemmli 1970). Previamente a la electroforesis se añade a la muestra de proteínas, tampón de carga que contiene una cantidad de SDS suficiente para desnaturalizarlas y conferirles carga negativa. De esta manera, se mantiene constante su relación carga/masa. Cuando estas muestras se someten a un campo eléctrico establecido sobre un gel que contiene una malla de polímero acrilamida-bisacrilamida, las proteínas migran en función de su tamaño. En este tipo de electroforesis se preparan dos geles de diferente pH y concentración de acrilamida: el gel concentrador y el gel separador. El porcentaje de acrilamida del gel separador varía en función del peso molecular de las proteínas que nos interese separar. Para el caso de las acuaporinas, que se encuentran alrededor de los 25-30 kDa, un gel con un 12 % de poliacrilamida permite que se separen bien. En paralelo a las muestras, se corren marcadores de peso molecular preteñidos, lo que nos permite visualizar la separación de las proteínas y calcular aproximadamente su tamaño molecular. Para los experimentos realizados en esta tesis, se ha utilizado el sistema de electroforesis Mini-Protean (BioRad), que permite trabajar con volúmenes de muestra relativamente pequeños y manipular fácilmente los geles.

El procedimiento comienza con la polimeración de los geles. Para ello, las placas de cristal del sistema de electroforesis se montaron según las instrucciones del fabricante, para geles pequeños. A continuación se preparó el gel separador 12 % o resolving gel (4 mL acrilamida/bisacrilamida 30 %, BioRad; 2.5 mL Tris-HCl pH 8.8; 100 μ L SDS (*dodecilsulfato sódico*) 10 %; 3.35 mL H₂O Tipo Milli-Q; 50 μ L

APS (*adenosina-5'-fosfosulfato*) 10 %; 10 μ L TEMED (*tetrametiletilendiamina*)). Antes de añadir el APS y el TEMED se desgasificó la mezcla puesto que el O₂ inhibe la polimerización de la acrilamida. Rápidamente se vertió la disolución entre las placas evitando la formación de burbujas, y se depositó una capa de isobutanol para nivelar el gel, eliminar las burbujas y evitar que el oxígeno inhibiera la polimerización. Una vez polimerizado el gel (aproximadamente 35-40 minutos), se añadió el gel concentrador 4 % o stacking gel (600 μ L acrilamida/bisacrilamida 30 %; 1.26 mL Tris-HCl pH 6.8; 50 μ L SDS 10 %; 3 mL H₂O Tipo Milli-Q; 50 μ L APS 10 %; 5 μ L TEMED). Inmediatamente se colocó el peine en el gel y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Una vez preparadas las muestras y polimerizado el gel, comenzó el proceso de electroforesis propiamente dicho. Para ello, se montaron los geles en el sistema de los electrodos y se sumergió en la cubeta con tampón de recorrido o tampón de electroforesis 1 X o running buffer (15.15 g Tris-Base; 72 g glicina; 5 g SDS; H₂O Milli-Q hasta 500 mL). A continuación, se cargaron las muestras (10 μ g de proteína) para su posterior análisis por Western-Blot así como el marcador de peso molecular (4 μ L) (Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range, BioRad, 161.0318). Se fijó el amperaje a 20 mA/gel con un voltaje máximo de 200 V y se realizó la electroforesis durante 1 hora aproximadamente.

3.3.16.3. Western-Blotting

Las técnicas de immunoblotting permiten la identificación de una proteína combinando la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Para realizar este reconocimiento, las proteínas

se transfieren de modo inespecífico desde el gel a una membrana adsorbente de manera que quedan unidas a su superficie. Una vez transferidas, esta membrana se incubaba con el anticuerpo primario y su presencia se revela con un segundo anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa.

Así, con el fin de determinar la abundancia de acuaporinas en la membrana plasmática, tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting, BioRad) y se realizó la transferencia en semiseco (TransBlot Semi Dry Transfer Cell, BioRad). Las proteínas cargadas negativamente al pH empleado, y como consecuencia de la adición de SDS a la solución de transferencia, migran electroforéticamente del gel hacia el polo positivo (ánodo) quedando retenidas en la membrana por unión no covalente. A continuación se explica el método de transferencia en semiseco detalladamente.

Tras la electroforesis se eliminó el gel concentrador y se sumergió el gel separador en el tampón de transferencia o Towbin buffer (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20 %; SDS 0.05 %; Towbin et al. 1979) durante 15 minutos. Mientras, la membrana de PVDF se sumergió en metanol durante 2 minutos y a continuación se introdujo en el tampón de transferencia durante 10 minutos.

Posteriormente, se humedecieron 2 papeles de filtro extragruoso (Extra thick Blot Paper, Mini Blot Size, BioRad) en tampón de transferencia, se colocó uno de ellos sobre la placa del sistema de transferencia que actuaría como ánodo (electrodo positivo), y se pasó el rodillo para eliminar posibles burbujas, pues interfieren en la transferencia de las proteínas. Se colocó encima la membrana de PVDF.

A continuación se puso el gel eliminando las burbujas, y por último se colocó el segundo papel de filtro y se pasó de nuevo el rodillo. Finalmente, se depositó el

cátodo sobre el sándwich de manera que quedara la placa bien encajada y se cubrió con la tapa de seguridad. Se conectó a la fuente de electroforesis y se seleccionó un voltaje constante de 15 V durante 20 minutos.

3.3.16.4. Immunodetección

Transcurrida la transferencia, se preincubó la membrana con la solución de bloqueo o blocking buffer (leche desnatada en polvo al 2 % (p:v) en TBS) para bloquear los puntos de unión de la membrana aún sin ocupar, evitando de este modo la adsorción inespecífica de anticuerpos a la membrana. El TBS o Tris-buffered Saline consistió en 2.42 g de Tris-HCl pH 7.5 (20 mM), 29.24 g de NaCl (0.5 M) en un volumen final de 1 L de agua Milli-Q. El bloqueo se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Seguidamente se incubó la membrana con el anticuerpo primario, toda la noche a 4 °C de manera que éste se uniera a su antígeno si estaba presente en la membrana.

Hay que tener en cuenta la dilución del anticuerpo primario, que se prepara en la solución de bloqueo con Tween al 0.05 %.

1. PIP1;1 de *Arabidopsis thaliana* (Kammetloher et al. 1994)

5'-MEGKEEDVRVGANKFPERQPIGTSAQSDYKDKEPPPAPFFEP-3'

Péptido de 42 residuos del extremo N-terminal, amablemente cedido por el Profesor Dr. Schäffner (dilución 1:3000).

2. PIP2 de *Brassica oleracea* var. *italica* (Casado-Vela et al. 2010)

5'-SLGSFRSAANV-3'

Péptido de 11 residuos en el extremo C-terminal (dilución 1:500).

Para eliminar el exceso de anticuerpo y evitar las uniones inespecíficas se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno, con la solución de lavado o TBS-Tween (leche desnatada en polvo al 2 % en TBS y Tween 20 al 0.05 %) y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Goat antirabbit IgG coupled to horseradish peroxidase HRP) (dilución 1:20000 en solución de bloqueo). Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 7 minutos cada uno. El revelado se llevó a cabo añadiendo sobre la membrana 1.5 mL de reactivo quimioluminiscente (West Pico, Super Signal substrate, Pierce), que permite la detección de anticuerpos conjugados con HRP debido a que la peroxidasa cataliza una reacción química que produce luz, durante 5 minutos en oscuridad y las proteínas se detectaron tras una exposición a una película para autorradiografía en un cuarto oscuro. Se emplearon para ello, soluciones de revelado (32 mL en 1 L) y de fijación (1:8, v:v) (Kodak).

Para cuantificar la señal, la intensidad de cada banda se normalizó con la señal de la correspondiente banda del azul brillante de Coomassie. Para ello, 50 µg de la preparación enriquecida con membrana plasmática, se disolvió en un gel con 12 % SDS-PAGE usando un sistema de electroforesis Mini-PROTEAN (BioRad) a 100 V/h. El gel se tiñó con Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad) durante 1 hora.

3.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para determinar los efectos del tratamiento o condición de estudio, y el genotipo sobre los diferentes parámetros determinados. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey y mediante el análisis de varianza (ANOVA). Además, en algunos

experimentos, los datos fueron analizados por el Test de Student ($p < 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el paquete de software estadístico SPSS Inc. (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) y se fijó el nivel de significación a un valor de probabilidad $p < 0.05$.

CAPÍTULO I

FISIOLOGÍA Y ANTIOXIDANTES NATURALES EN DIFERENTES VARIEDADES DE BRÓCULI PÚRPURA

4.1. INTRODUCCIÓN

Este capítulo tenía 2 objetivos. Primero, examinar el crecimiento, desarrollo y estado nutricional de tres subcultivares de brócoli púrpura (típicos de climas fríos anglosajones) durante la estación de invierno en Murcia, dada la importancia socio-económica que tiene el cultivo de brócoli en la Región. Segundo, estudiar el efecto del genotipo y los órganos seleccionados (parte aérea, pella, etc.) sobre el contenido en compuestos bioactivos como ácidos hidroxicinámicos, flavonoides (principalmente antocianinas) y glucosinolatos, con el fin de identificar el cultivar más idóneo para estas condiciones de clima Mediterráneo semiárido del SE Español y, promover su producción para ofrecer nuevos alimentos saludables.

4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se realizó con un cultivar comercial de brócoli (*Brassica oleracea* L. [Grupo Italica]), con inflorescencias púrpuras, cv. Viola (Figura 4.1), ya que se trata de un cultivar poco conocido en España y en concreto, no se produce comercialmente en Murcia (SE España) donde se genera el mayor porcentaje de producción y exportación a la Unión Europea y a Europa del Este (el 65 % del total de la producción española, según la Memoria 2012 de Proexport). Se utilizaron 3 subcultivares de acuerdo a su ciclo de producción: Extra-Temprano (Extra Early Purple Sprouting Broccoli Rudolph, EEP), Temprano (Early Purple Sprouting, EP) y Tardío (Late Purple, LP) (Thompson & Morgan, Inglaterra).



Figura 4.1. Detalle de inflorescencia del cultivar Viola (subcultivares EEP y EP).

La germinación y el desarrollo de las plántulas de brócoli se realizaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas tal y como se describió en el apartado de Material y Métodos general (Sección 3). A continuación, el experimento se llevó a cabo durante el período de Otoño-Invierno (Noviembre de 2009 hasta Marzo de 2010) en una finca experimental (latitud 38°06'N; 1°02'O) en clima Mediterráneo Semiárido, con condiciones climáticas típicas de la estación de invierno en Murcia, tal y como se detalló en el apartado de Material y Métodos (Sección 3).

En este experimento, se emplearon un total de 10 plantas de brócoli por subcultivar espaciadas entre sí resultando en una densidad de 2 plantas m⁻². Las plantas fueron recolectadas el día 95 DAT (aproximadamente cuando las plantas tenían 120 días de edad) (Ver apartado 3.2.1. de la sección de Material y Métodos). La recolección y distintas medidas de las plantas se realizaron a mitad del periodo de luz y se determinaron distintos parámetros bioquímicos como contenido de glucosinolatos, compuestos fenólicos (particularmente antocianinas) y vitamina C.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Vitamina C

Los tejidos analizados de distintos subcultivares de brócoli púrpura mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en su contenido de vitamina C total (AA + DHAA) en hojas y en inflorescencias (Figura 4.2).

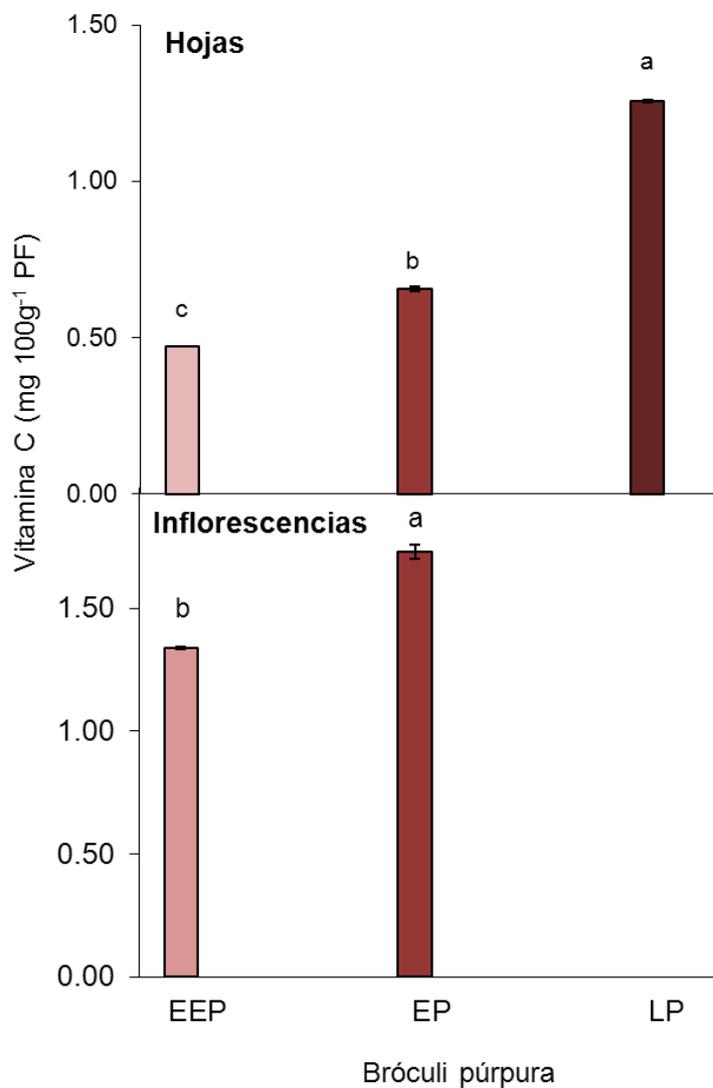


Figura 4.2. Vitamina C (mg 100g⁻¹ PF) en hojas e inflorescencias de distintos subcultivares de brócoli púrpura. Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, $P < 0.05$, $n = 10$ para cada subcultivar).

En hojas, la concentración de vitamina C fue significativamente mayor en el subcultivar LP, seguido por el subcultivar EP (con una reducción del 48 % con respecto a LP) y por último del EEP (con una reducción del 15 % con respecto a EP).

En inflorescencias, el contenido en vitamina C fue menor en EEP y mayor en EP, y destacamos que el subcultivar LP no llegó a producir inflorescencia.

4.3.2. Compuestos Fenólicos

Los subcultivares de brócoli púrpura estudiados mostraron similitudes en sus perfiles de ácidos fenólicos y flavonoides, con una ligera influencia del factor genético (Tabla 4.1). Sólo se encontraron diferencias a nivel cuantitativo en las hojas.

En general, los principales compuestos fenólicos observados fueron glucósidos de flavonoides (flavonoles, derivados de kaempferol y quercetina) y antocianos. Los ácidos fenólicos fueron derivados del ácido clorogénico o del ácido sinápico.

Tabla 4.1. Contenido de compuestos fenólicos (mg 100g⁻¹ PF) en hojas e inflorescencias de subcultivares de brócoli púrpura.

Órgano	Sub-cv.	Ácidos hidroxicinámicos	
		Derivados del ácido sinápico y del ácido ferúlico	Derivados del ácido clorogénico
Hoja	EEP	142.73±1.68b ^a	50.08±0.49c
	EP	155.50±8.74a	187.27±7.89b
	LP	140.12±4.58b	335.71±18.41a
Inflorescencia	EEP	487.41±30.93a	443.31±159.05a
	EP	507.03±40.60a	203.10±56.92a
Flavonoides			
		Flavonoles	Antocianinas aciladas
Hoja	EEP	3742.72±37.06a	8.50±0.14c
	EP	3741.33±93.63a	9.99±0.35b
	LP	3294.02±427.24a	12.24±0.21a
Inflorescencia	EEP	4374.76±247.93a	139.51±2.42a
	EP	4277.95±371.64a	63.93±0.34b
Compuestos Fenólicos totales			
Hoja	EEP	3944.03±39.37a	
	EP	4094.08±110.60a	
	LP	3782.08±450.44a	
Inflorescencia	EEP	5444.99±440.33a	
	EP	5052.01±469.50a	

^aValores con letra diferente son estadísticamente diferentes entre órganos estudiados (Test de Tukey, P< 0.05, n=10 para cada subcultivar).

Los ácidos hidroxicinámicos fueron mucho menores en hojas que en inflorescencias en todos los casos. Con respecto a los derivados del ácido sinápico, el subcultivar EP presentó los valores más altos (con un 8 % más que EEP y un 10 % más que LP). Así mismo, el subcultivar LP presentó los valores más altos de derivados del ácido clorogénico, seguido por el subcultivar EP (con un 44 % menos)

y por último del EEP (con un 85 % menos). Por otro lado, los flavonoles en hoja no mostraron diferencias significativas entre subcultivares, y las inflorescencias presentaron una concentración mayor de flavonoles, en comparación con las hojas. Además, la concentración de flavonoles de las inflorescencias no mostró diferencias significativas entre cultivares.

Las antocianinas aciladas y glucosiladas son compuestos característicos de las crucíferas y del brócoli en particular, como en esta variedad púrpura. Los tiempos de retención (*Tr*) y los iones moleculares comunes (*m/z*) de las antocianinas y sus grupos acilados típicos se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Identificación por HPLC-DAD-ESI-MSn de las principales antocianinas en subcultivares de brócoli púrpura

N° de pico	<i>Tr</i> (min)	[M] ⁺ (<i>m/z</i>)	[MS2/MS3] ⁺ (<i>m/z</i>)	Antocianina
1	11.4	773	611/449/287	Cianidin 3- <i>O</i> -diglucósido-5- <i>O</i> -glucósido
2	15.9	979	817/449/287	Cianidin 3- <i>O</i> -(sinapoil)diglucósido-5- <i>O</i> -glucósido
3	16.4	859	535/287	Cianidin 3- <i>O</i> -diglucósido-5- <i>O</i> -(malonil)glucósido
4	25.4	949	787/449/287	Cianidin 3- <i>O</i> -(feruloil)diglucósido-5- <i>O</i> -glucósido
5	25.9	979	817/449/287	Cianidin 3- <i>O</i> -(sinapoil)diglucósido-5- <i>O</i> -glucósido
6	28.0	1155	993/449/287	Cianidin 3- <i>O</i> -(sinapoil)(feruloil)diglucósido-5- <i>O</i> -glucósido
7	28.2	1185	1023/449/287	Cianidin 3- <i>O</i> -(sinapoil)(sinapoil)diglucósido-5- <i>O</i> -glucósido
8	28.5	1035	787/535/287	Cianidin 3- <i>O</i> -(feruloil)diglucósido-5- <i>O</i> -(malonil)glucósido
9	28.5	1125	963/449/287	Cianidin 3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroil)(sinapoil)diglucósido-5- <i>O</i> -glc
10	30.5	1241	993/535/449	Cianidin 3- <i>O</i> -(sinapoil)(feruloil)diglucósido-5- <i>O</i> -(malonil)glc
11	31.6	1211	963/535/449	Cianidin 3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroil)(sinapoil)dic-5- <i>O</i> -(malonil)glc

Las antocianinas de las crucíferas suelen ser aciladas y glucosiladas, como las encontradas en estas variedades, si bien, todas eran derivadas de la cianidin-3-*O*-

diglucósido-5-*O*-glucósido (glc) con uno o varios grupos acilados unidos en las posiciones 3 y 5.

La (*m/z*) característica de 287 en [MS3]⁺, se corresponde con la aglicona de la cianidina. La antocianina más abundante en las hojas del subcultivar EEP fue la Cianidina 3-*O*-(*p*-coumaroil)(sinapoil)diglucósido-5-*O*-(malonil)glucósido (pico 11), mientras que la Cianidina 3-*O*-(sinapoil)(feruloil)diglucósido-5-*O*-(malonil)glucósido (pico 10) fue la más abundante en las inflorescencias. Sin embargo, las antocianinas más abundantes en hojas del subcultivar LP fueron la Cianidina 3-*O*-(feruloil) diglucósido-5-*O*-glucósido (pico 4) y la Cianidina 3-*O*-(sinapoil)diglucósido-5-*O*-glucósido (pico 5) (Figura 4.3).

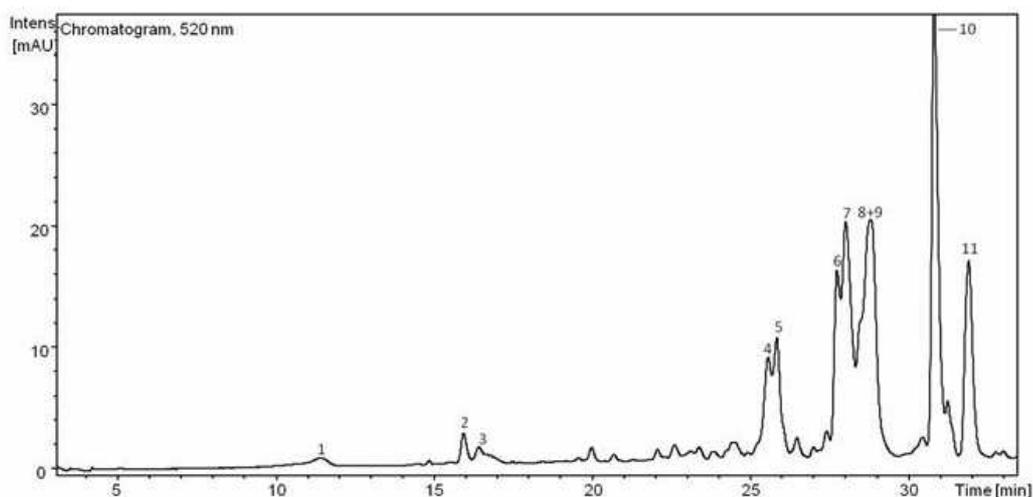


Figura 4.3. Perfil tipo de la separación cromatográfica de cultivares de brócoli púrpura ‘Viola’ (a 520 nm). Las asignaciones de los picos se muestran en la tabla 4.3.

En la figura 4.3, se muestra un perfil típico de antocianinas de la inflorescencia del subcultivar EEP, que exhibe la mayoría de los picos comunes detectados y cuantificados en las muestras vegetales.

En las hojas, el subcultivar LP tuvo significativamente la mayor concentración de antocianinas, seguido por EP (que presentó una reducción del 18 % con respecto a LP) y, finalmente, EEP (que presentó una reducción del 12 % con respecto a EP). En cuanto a las inflorescencias disponibles, las antocianinas totales fueron significativamente más abundantes en EEP que en EP, que presentó una reducción del 54 % con respecto a EEP (Tabla 4.2). Para las inflorescencias del subcultivar EEP y en prácticamente todas las muestras, el pico principal, presentó una concentración de 22.45 mg 100 g⁻¹ PF (datos no mostrados), que se correspondía con la Cianidina 3-*O*-(sinapoyl)(feruloyl)diglucósido-5-*O*-(malonil)glucósido (Figura 4.3, pico 10). Hay que tener en cuenta que la abundancia y la calidad de los picos detectados difirieron entre muestras, órganos y subcultivares, con muchas diferencias a nivel cuantitativo. A nivel cualitativo, las inflorescencias siempre mostraron más picos de antocianinas, alrededor de 15 por muestra. La influencia del cultivar en la cantidad y el tipo de antocianinas se mostró y corroboró por el análisis de varianza (Tabla 4.1).

En general, la cantidad de compuestos fenólicos totales en hojas se mantuvo constante entre subcultivares. A nivel de inflorescencias, la concentración de compuestos fenólicos en los subcultivares EEP y EP fue similar y además, tuvo un mayor rango de concentración que en las hojas.

4.3.3. Glucosinolatos individuales

El análisis de los glucosinolatos en las muestras de brócoli púrpura se realizó por determinación de los glucosinolatos intactos (Domínguez-Perlés et al. 2010). En las hojas de los distintos subcultivares de brócoli púrpura se encontraron diferencias

significativas en la concentración (Tabla 4.3). Entre los glucosinolatos alifáticos, la glucorafanina (GR) y la glucoalisina (GAL) no se detectaron en hoja mientras que sí se detectaron la glucoiberina (GI) y la glucoerucina (GE). Un análisis detallado de las diferencias entre subcultivares mostró que EEP y LP presentaron significativamente mayor concentración de GI que el subcultivar EP, el cuál presentó un 30 % aproximadamente menos con respecto a EEP y LP. Sin embargo, la concentración de GE fue más alta en EEP que en EP (que presentó una concentración del 81 % menos con respecto a EEP) y LP (que presentó una concentración del 97 % menos con respecto a EEP).

Tabla 4.3. Glucosinolatos individuales (mg 100g⁻¹ PF) en hojas e inflorescencias de subcultivares de brócoli púrpura.

Órgano	Sub-cv.	Glucosinolatos alifáticos			
		GI	GR	GAL	GE
Hoja	EEP	55.70±8.01a ^a	n.d. ^b	n.d.	14.52±0.04a
	EP	39.04±2.63b	n.d.	n.d.	2.80±1.98b
	LP	49.77±5.98a	n.d.	n.d.	0.49±0.03c
Inflorescencia	EEP	194.31±2.52a	15.43±5.34a	34.54±11.05b	12.26±5.39b
	EP	158.26±20.10b	2.81±0.09b	95.80±4.06a	32.44±10.54a
Glucosinolatos indólicos					
		GBS	MGB	HGB	NGB
Hoja	EEP	0.95±0.37c	86.65±0.19a	13.81±0.42a	11.79±2.08a
	EP	13.65±0.83b	38.35±0.01b	1.22±0.02c	11.26±2.43a
	LP	37.29±11.95a	43.32±5.32b	10.93±0.06b	4.81±0.58b
Inflorescencia	EEP	78.25±0.04a	90.81±6.91a	5.18±0.05b	43.18±21.49a
	EP	90.54±21.77a	16.15±1.87b	21.06±0.84a	70.47±28.29a

GI: Glucoiberina, GR: Glucorafanina, GAL: Glucoalisina, GE: Glucoerucina, GBS: Glucobrasicina, MGB: 4-MeO-Glucobrasicina, HGB: 4-OH-Glucobrasicina, NGB: Neoglucobrasicina.

^aValores con letra diferente son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, P< 0.05, n= 10 para cada subcultivar).

^bn.d. = no detectado

Para los glucosinolatos indólicos (glucobrasicina (GBS), 4-MeO-Glucobrasicina (MGB), 4-OH-Glucobrasicina (HGB), Neoglucobrasicina (NGB)) se encontraron diferencias muy significativas de concentración entre los diferentes subcultivares.

La concentración de GBS fue mayor en LP seguido de EP y finalmente de EEP. EEP mostró mayores concentraciones de MGB que EP y LP, que no presentaron diferencias significativas entre sí. La concentración de HGB fue mayor en el subcultivar EEP seguido de LP y EP y finalmente, la NGB fue mayor en los subcultivares EEP y EP, que en LP. En contraste con las hojas, en las inflorescencias se detectaron las mayores concentraciones de glucosinolatos alifáticos, que mostraron la GI como principal glucosinolato (alrededor de 12 y 55 veces más que GR para los subcultivares EEP y EP, respectivamente). La concentración de glucosinolatos alifáticos fue mayor en el subcultivar EP, excepto para GI y GR cuyos niveles fueron mayores para el subcultivar EEP. Con respecto a los glucosinolatos indólicos, no hubo diferencias significativas en la concentración de GBS y NGB entre subcultivares, mientras que MHB y HGB fueron más abundantes en los subcultivares EEP y EP, respectivamente.

4.4. DISCUSIÓN

El análisis de los compuestos bioactivos de brócoli púrpura desarrollado bajo las condiciones ambientales impuestas puso de manifiesto para la vitamina C, resultados acordes con los descritos anteriormente por del Mondragón-Portocarrero et al. (2006) en nabo (*Brassica rapa*), y por Francisco et al. (2010), donde la cantidad de vitamina C se redujo en gran medida por el procesamiento previo al análisis, tal y

como ocurrió en nuestro caso. La pérdida de vitamina C, se produjo principalmente por degradación química, que implica la oxidación del ácido ascórbico (AA) a ácido dehidroascórbico (DHAA), seguida de una hidrólisis a ácido 2,3-diquetogulónico y la posterior polimerización para formar otros productos nutricionalmente inactivos (Roy et al. 2009). Además, nuestros resultados indicaron que en cultivares de brócoli púrpura, la vitamina C se encontraba afectada por el genotipo, mostrando diferentes niveles de este antioxidante en los subcultivares (Pérez-Balibrea et al. 2011) (Figura 4.2). Se sabe que los factores climáticos, principalmente la temperatura, tienen una fuerte influencia sobre la vitamina C, pues los vegetales mostraron mayor contenido en vitamina C cuando crecieron con temperaturas bajas (10 °C) que cuando crecieron con temperaturas más elevadas (25 °C) (Bumgarner et al. 2012). Por lo tanto, la cantidad de vitamina C podría ser menor bajo estas condiciones experimentales de temperaturas altas, que explican la influencia de la combinación de factores genéticos y ambientales, sobre este nutriente (Podsdek 2007; Moreno et al. 2008).

Los compuestos fenólicos son antioxidantes importantes que se han descrito como beneficiosos para la salud (Peng et al. 2011). Hay que destacar que no fue posible obtener inflorescencias en el subcultivar LP. Además, los resultados indicaron que las inflorescencias tanto del subcultivar EEP como las del subcultivar EP, fueron igualmente ricas en estos compuestos bioactivos. Con respecto al uso de las hojas del brócoli como subproductos ricos en compuestos fenólicos, cualquier variedad empleada sería adecuada para tal fin. Borkowski et al. (2005) mostraron que el contenido de compuestos fenólicos estaba relacionado positivamente con la radiación solar y el crecimiento. De acuerdo con esto, se observó que las plantas del subcultivar EP tenían un contenido significativamente mayor de compuestos fenólicos, una mayor tasa fotosintética y una mayor biomasa (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta que las diferencias entre los compuestos fenólicos estudiados en los distintos subcultivares, podrían ser el resultado de múltiples factores, incluyendo la metodología, las características de la muestra y las condiciones de crecimiento (Vallejo et al. 2003c; Moreno et al. 2006; Pérez-Balibrea et al. 2008), nuestros resultados mostraron que el brócoli púrpura cultivado en el SE de España, podría ser una excelente fuente de compuestos fenólicos.

Se utilizaron técnicas de HPLC-DAD-ESI-MSⁿ como herramienta de diagnóstico y control de la concentración de las antocianinas del brócoli (Giusti y Wrolstad 2003; Moreno et al. 2010), de gran interés en estos subcultivares de brócoli púrpura tan poco conocidos (Tabla 4.2). Además, las antocianinas aciladas se consideran mejores candidatas que las antocianinas no aciladas para la elaboración de colorantes alimentarios, debido a su mayor estabilidad (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos 2004). En los últimos años, el interés por las antocianinas aciladas se ha intensificado debido a sus beneficios para la salud (Pallauf et al. 2008) y los cultivares de brócoli púrpura muestran valores mayores de antocianinas que los cultivares verdes. Los factores ambientales como la luz visible y la radiación UV, las bajas temperaturas, la sequía y el estrés hídrico, son inductores de la acumulación de antocianinas en las plantas (Chalker-Scott 1999). Se ha demostrado además, la fotoinducción de las antocianinas en numerosas ocasiones, así como el efecto de la temperatura (Gould 2004; Hughes et al. 2004). En este estudio, los perfiles de antocianinas mostraron diferencias cualitativas y cuantitativas entre los subcultivares de brócoli púrpura (por ejemplo en las inflorescencias del subcultivar EEP). Además, de entre los picos identificados, los significativamente mayores fueron los correspondientes a los isómeros de cianidina 3-*O*-(*p*-coumaroil)(sinapoil)diglucosido-5-*O*-glucosido.

Las diferencias en el contenido de glucosinolatos, se originan tanto por factores ambientales como por factores genéticos. Así, se explicarían los niveles más altos de glucosinolatos en plantas crecidas con nuestras condiciones experimentales en comparación con otros cultivares de brócoli verde como Marathon (Moreno et al. 2008; Lopez-Berenguer et al. 2009), o brócoli púrpura (Schönhof et al. 2004; Verkerk et al. 2010). De hecho, Lewis et al. (1991) revelaron un contenido total de glucosinolatos de 117.5 mg en 100 g de peso fresco en la inflorescencia de brócoli púrpura y 34.6 mg en 100 g de peso fresco en romanesco. En nuestro caso, la cantidad de glucosinolatos totales en los subcultivares EEP y EP fue mayor, en torno a 480 mg en 100 g de peso fresco. También, Verkerk et al. (2010) determinaron un contenido de glucoiberina de 167.51 mg en 100 g de peso fresco en el brócoli púrpura “Bordeaux”, mientras que en la inflorescencia del subcultivar EEP, se encontró un contenido de 194.31 mg en 100 g de peso fresco.

En cuanto a los glucosinolatos individuales, el cv. Viola mostró 8 veces más GI que otros cultivares verdes como Marathon o Nubia (Domínguez-Perlés et al. 2010). De manera similar, Schönhof et al. (2004) observaron una proporción de GI, significativamente mayor en brócoli púrpura, que en brócolis verdes. Además, la concentración del glucosinolato indólico GB en hoja, fue mayor en el subcultivar LP que en otros cultivares de brócoli verde y púrpura; también, la concentración de NGB fue mayor en todos los subcultivares púrpuras que la observada en cultivares verdes (Domínguez-Perlés et al. 2010). En nuestros experimentos, la concentración de glucosinolatos encontrada en los subproductos, estuvo en el rango de la de las muestras de brócoli púrpura previamente descritas como “Bordeaux” (Verkerk et al. 2010) y Viola (Domínguez-Perlés et al. 2010). Las hojas mostraron variaciones significativas entre subcultivares y podrían ser prometedoras en cuanto a la

utilización de subproductos derivados de brócoli, ya que actualmente están infrautilizadas o desperdiciadas, y son una fuente económica y natural de glucosinolatos (Domínguez-Perlés et al. 2010). El hecho de que la GI, GB y MGB, fueran mucho mayores en este cultivar, en comparación con los cultivares verdes y con otros cultivares púrpuras, mostró la influencia concomitante del cultivar, el medioambiente, el papel fisiológico en cada órgano, afectando a la concentración de glucosinolatos individuales, todo ello reforzado por hallazgos anteriores (Ciska et al. 2000; Vallejo et al. 2003).

Finalmente, como se ha mencionado anteriormente, el subcultivar LP no tuvo inflorescencias comerciales. Estudios previos mostraron que uno de los determinantes de la producción de brócoli, es la temperatura, la cual influye en el crecimiento y desarrollo (Grevsen 1998). Además, un crecimiento adecuado de las inflorescencias de alta calidad, se logra entre 14 y 16 °C (Wurr et al. 1996). Por lo tanto, puesto que los 3 subcultivares de brócoli, mostraron el mismo ciclo de vida, se demostró que el rango de temperaturas usado para este experimento, no fue un estrés para estos subcultivares, y los resultados indicaron que para el subcultivar LP, las condiciones usadas en este experimento no fueron las adecuadas. Se han desarrollado modelos específicos para predecir el momento de diferenciación floral (Wurr et al. 1995) y para estimar la fecha de cosecha (Wurr y Fellows 1991). Sin embargo, hay pocas referencias concernientes a las condiciones requeridas para la fructificación, especialmente en estos “nuevos” cultivares de brócoli. Es importante enfatizar que este es el primer trabajo sobre la producción de brócoli púrpura con inflorescencias comerciales de calidad, en estas latitudes (Murcia, SE, España). Hasta la fecha, no hay datos de producción de inflorescencias comerciales de brócoli púrpura (ver, proexport.com), y en este caso, se debe destacar que aparecieron sólo en plantas de

los subcultivares EEP y EP crecidas en campo abierto, lo cual es lo más adecuado para el brócoli.

4.5. CONCLUSIONES

Los glucosinolatos, los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, antocianinas) y los nutrientes (vitamina C) en los brócolis púrpuras estudiados, variaron según el subcultivar (carga genética) y el órgano (papel fisiológico). Además, la identificación de los componentes promotores de la salud, incrementa la demanda de estos productos para su consumo y la industria alimentaria, como pigmentos naturales con valor añadido y antioxidantes, y podría abrir nuevas oportunidades para su uso en otras aplicaciones industriales. Por lo tanto, nuestros datos sobre el desarrollo y la calidad nutricional del brócoli púrpura, mostraron una composición nutricional de gran interés del cultivar de nueva introducción, en comparación con brócolis verdes tradicionales o incluso sobre otros brócolis púrpuras, crecidos bajo diferentes condiciones climáticas. Además, se ha demostrado la adecuación de los subcultivares EEP y EP al clima Mediterráneo para propósitos de producción, aunque una investigación adicional sobre sucesivas generaciones o producciones de brócoli púrpura es necesaria.

CAPÍTULO II

FACTORES MEDIOAMBIENTALES COMO MODULADORES DE LA FISIOLOGÍA DE NUEVAS VARIETADES DE BRÓCULI

5.1. INTRODUCCIÓN

Los objetivos de este estudio, complementarios a los objetivos planteados en el Capítulo 1, fueron determinar la influencia de las condiciones de crecimiento (al aire libre y en invernadero) sobre el desarrollo de la planta, los parámetros de intercambio gaseoso, los pigmentos fotosintéticos, la composición de nutrientes y el contenido de glucosinolatos, en tres nuevos subcultivares de brócoli púrpura ('Viola'), cultivados en la temporada de invierno de Murcia (SE España). Por lo tanto, se estudiaron las respuestas fisiológicas, así como los parámetros de calidad de estos nuevos cultivares, con el fin de seleccionar nuevos cultivares de brócoli púrpura y determinar su adaptación a la región de cultivo, identificar el cultivar más idóneo bajo estas condiciones de clima Mediterráneo y, promover su producción en estas condiciones y latitudes para productos alimentarios y consumo.

5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se realizó con un cultivar comercial de brócoli (*Brassica oleracea* L. [Grupo Italica]), con inflorescencias púrpuras, cv. Viola, ya que se trata de un cultivar poco conocido en España y en concreto, no se produce comercialmente en Murcia (SE España). Se seleccionaron 3 tipos o subcultivares de brócoli púrpura de acuerdo a su ciclo de producción: Extra-Temprano (Extra Early Purple Sprouting Broccoli Rudolph, EEP), Temprano (Early Purple Sprouting, EP) y Tardío (Late Purple, LP).

Estos subcultivares son naturales de climas anglosajones más fríos, por lo que el experimento se llevó a cabo durante el período de Otoño-Invierno (Noviembre 2009-Marzo 2010), en un invernadero con cubiertas de polietileno y marco de aluminio, ventanas mecánicas en el techo, ventilación pasiva e irrigación localizada, del CEBAS-CSIC (Finca

Experimental “La Matanza”, Latitud 38°06`N; 1°02`O, Santomera, Murcia) y un cultivo al aire libre, en las condiciones edafoclimáticas de esta zona del clima Mediterráneo.

La germinación y el desarrollo de las plántulas de brócoli se realizaron en cámara de cultivo con condiciones controladas, según lo descrito en Material y Métodos (Sección 3).

A continuación, después de 24 días en hidroponía con solución Hoagland y aireación constante, las plantas, que tenían 31 días de edad, fueron transplantadas a contenedores con un sustrato inerte de perlita y vermiculita (una planta por contenedor) y, se empleó la misma solución Hoagland para el riego (realizado 2 veces por semana). Se usó el 50 % de las plántulas en cultivo al aire libre y el 50 % en invernadero (Figura 5.1).

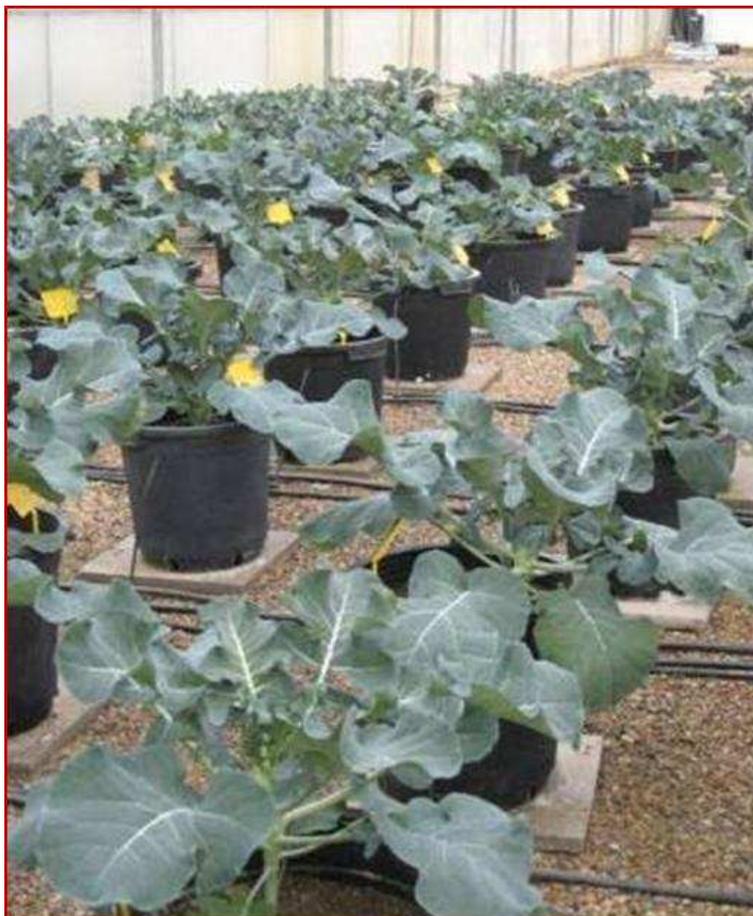


Figura 5.1. Detalle de plantas de brócoli cultivadas en invernadero.

Las condiciones de ambos cultivos se encuentran detalladas en el apartado de Material y Métodos.

Las plantas se recolectaron el día 95 DAT (aproximadamente 120 días de edad) (Ver apartado 3.2.1. de la sección de Material y Métodos). La recolección y distintas medidas de las plantas se realizaron a mitad del periodo de luz y se determinaron parámetros foliares de intercambio gaseoso, biomasa, nutrientes minerales, pigmentos foliares y contenido de glucosinolatos y compuestos fenólicos.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Parámetros foliares de intercambio gaseoso

Durante los experimentos se midieron distintos parámetros de intercambio gaseoso. En primer lugar, se observó que la tasa fotosintética (Figura 5.2.A) fluctuó a lo largo de los días del experimento, siendo mayor en las plantas crecidas al aire libre. Se pudo comprobar que el subcultivar EP fue el que tuvo mayor tasa fotosintética ($P < 0.05$), alrededor de $11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($P < 0.05$), en comparación con EEP y LP. Las plantas desarrolladas en invernadero, presentaron los valores de tasa fotosintética más bajos y, en general, los cultivares ordenados de mayor a menor según su tasa fotosintética fueron: $\text{EEP} > \text{LP} \approx \text{EP}$.

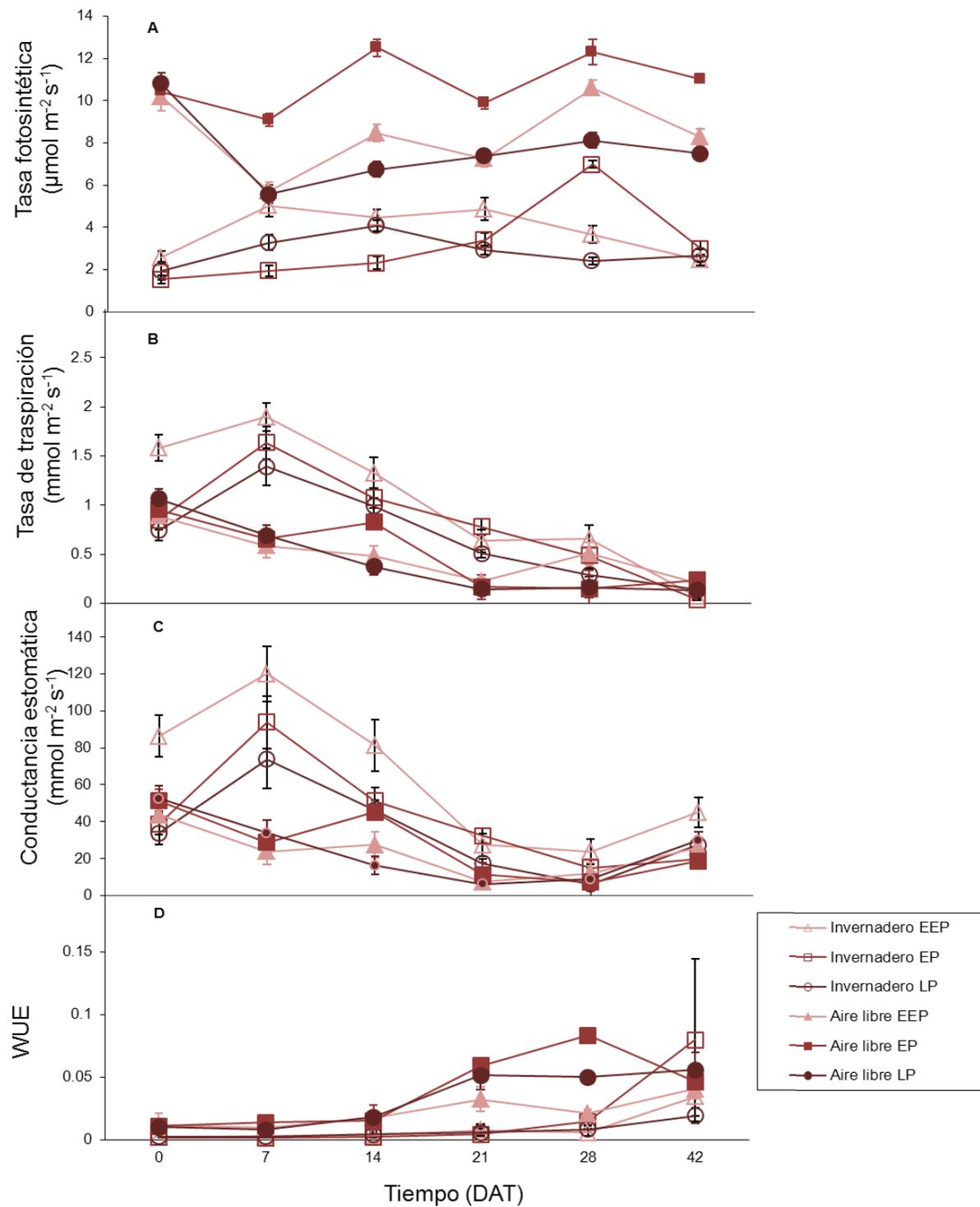


Figura 5.2. Tasa fotosintética (A), transpiración (B), conductancia estomática (C) y WUE (D) de cada subcultivar. DAT 0=31 días de edad (Test de Tukey, $P < 0.05$, $n = 10$ para cada subcultivar).

Con respecto a la tasa de transpiración (T) (Figura 5.2.B) y la conductancia estomática (G_s) (Figura 5.2.C), se observó una disminución a lo largo del experimento, con valores mayores para las plantas de invernadero, que para las que crecieron en al aire libre, y con valores más altos para las plantas del subcultivar EEP, seguidos de EP y LP. Además, al final del ciclo de cultivo, no hubo diferencias significativas entre las condiciones de estudio.

Por último, el estudio de la eficiencia en el uso del agua (WUE) (Figura 5.2.D) mostró que con el paso del tiempo, aumentó de forma general en los tres subcultivares, siendo el subcultivar EP el que obtuvo los valores más altos al final del ciclo.

5.3.2. Biomasa

Los resultados de biomasa estuvieron de acuerdo con la tasa fotosintética obtenida, que fue mayor en las plantas desarrolladas al aire libre que en las desarrolladas en invernadero para los tres subcultivares (Tabla 5.1). Además, los valores más altos observados fueron los valores del subcultivar EP desarrollado al aire libre, con un 54 % más de biomasa que las plantas de invernadero y un 24 % más que el subcultivar LP desarrollado al aire libre, el cual presentó los valores más bajos de entre los subcultivares al aire libre.

Tabla 5.1. Parámetros de biomasa (Peso fresco y Peso seco, g⁻¹ planta) de la parte aérea de los subcultivares de brócoli púrpura estudiados, desarrollados al aire libre o en invernadero.

		PF (g ⁻¹ planta)	PS (g ⁻¹ planta)	Área foliar (cm ²)
Invernadero	EEP	240.59±24.62c ^a	46.84±4.42c	225.44±4.99b
	EP	273.65±11.80c	63.51±9.93b	223.10±7.91b
	LP	238.39±20.85c	52.29±2.77c	226.52±9.84b
Aire libre	EEP	499.32±7.26a	81.33±2.93b	262.63±17.72a
	EP	516.97±15.22a	92.42±3.63a	278.66±30.36a
	LP	391.69±20.18b	75.75±4.23b	276.13±18.81a

^aValores con letra diferente en la misma columna, son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, P< 0.05, n= 10 para cada subcultivar).

Por otro lado, los resultados de rendimiento de biomasa en peso seco y área foliar observados, se relacionan con los valores de peso fresco, siendo las plantas cultivadas al aire libre, las que presentaron mayor peso seco para los tres subcultivares. Además, el área foliar de las plantas cultivadas al aire libre fue un 19 % más alta que el área foliar observada en las plantas de invernadero.

5.3.3. Elementos minerales

Los minerales C, N, P, Ca, K, Na, Mg y S (Tabla 5.2), son elementos minerales esenciales, que se requieren en concentraciones superiores a 50 mg/día en seres humanos adultos (ver aportes de minerales recomendados por la Junta de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina en Washington D.C., 1997-2001).

Tabla 5.2. Concentración de macronutrientes (mg g⁻¹PS) en distintos tejidos vegetales, de acuerdo a las condiciones de cultivos: Invernadero o Aire libre.

	C (% PS)	N (% PS)	P	K	Ca	Mg	Na	S
FFP								
Invernadero								
Hojas	43.4±0.3 ^a	4.5±0.1 ^a	1.7±0.1 ^a	7.9±0.8 ^h	3.1±0.4 ^a	1.7±0.1 ^a	1.3±0.2 ^a	1.6±0.2 ^a
Tallos	39.9±0.9 ^b	3.3±0.4 ^a	0.9±0.1 ^b	13.5±1.2 ^a	1.2±0.1 ^b	0.9±0.1 ^c	1.2±0.1 ^a	1.2±0.3 ^a
Aire libre								
Hojas	45.2±0.3 ^a	3.1±0.2 ^b	0.9±0.1 ^b	7.1±0.4 ^b	3.0±0.5 ^a	1.2±0.1 ^b	0.5±0.1 ^b	0.6±0.2 ^b
Tallos	42.3±0.4 ^a	1.8±0.2 ^b	1.2±0 ^a	7.7±2.3 ^b	1.0±0.2 ^b	0.9±0.1 ^c	0.5±0.1 ^b	0.8±0.2 ^b
FP								
Invernadero								
Hojas	42.6±0.1 ^b	4.9±0.4 ^a	1.2±0.1 ^a	8.9±2.7 ^b	3.6±0.2 ^a	2.2±0.1 ^a	1.5±0.2 ^a	1.6±0.1 ^a
Tallos	39.8±0.8 ^b	3.6±0.4 ^a	1.2±0.1 ^a	13.1±2.3 ^a	1.3±0.1 ^b	1.1±0.1 ^c	1.1±0.2 ^a	1.4±0.4 ^a
Aire libre								
Hojas	45.0±0.4 ^a	3.7±0.2 ^b	1.0±0 ^b	8.0±2.9 ^h	3.4±0.3 ^a	1.5±0.1 ^h	0.9±0.3 ^h	0.7±0.1 ^h
Tallos	42.6±0.2 ^a	1.6±0.2 ^b	1.0±0 ^b	6.7±2.0 ^b	1.0±0.1 ^b	1.0±0.1 ^c	0.6±0 ^b	0.6±0.1 ^b
IP								
Invernadero								
Hojas	43.7±0.4 ^b	4.7±0.2 ^a	1.2±0.1 ^b	7.6±2.4 ^b	2.1±0.9 ^b	1.6±0.1 ^a	1.4±0.2 ^a	1.5±0.1 ^a
Tallos	39.3±0.1 ^b	3.7±0.8 ^a	1.5±0.1 ^a	14.4±1.9 ^a	1.1±0.1 ^c	1.2±0.1 ^b ^c	1.3±0.2 ^a	1.4±0.1 ^a
Aire libre								
Hojas	45.0±0.2 ^a	2.5±0.1 ^b	1.5±0.1 ^a	7.1±2.8 ^b	2.7±0.3 ^a	1.4±0.1 ^b	0.6±0.1 ^b	0.7±0.1 ^b
Tallos	43.0±0.7 ^a	1.7±0.3 ^b	0.9±0.1 ^c	6.0±1.9 ^b	1.0±0.2 ^c	1.1±0.1 ^c	0.3±0 ^c	0.5±0.1 ^b

^aValores con letra diferente en la misma columna y subcultivar, son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, P<0.05, n= 10 para cada subcultivar).

Se observaron los siguientes resultados:

- La concentración de C total en los tres cultivares de brócoli, fue mayor en plantas crecidas al aire libre con respecto a las crecidas en invernadero, y no se observaron diferencias significativas entre hojas y tallos de un mismo subcultivar.
- La concentración de N en los tres subcultivares de brócoli, mostró una tendencia opuesta a la observada en el caso del C, siendo mayor en las plantas de invernadero, y no hubo diferencias significativas entre tallos y hojas en ningún subcultivar.
- La concentración de P en los tallos del subcultivar EEP fue mayor en plantas al aire libre que en las plantas en invernadero, mientras que ocurrió lo opuesto para EP y LP, y la concentración foliar de P en los subcultivares EEP y EP fue mayor en las plantas de invernadero mientras que en el subcultivar LP se observó lo opuesto.
- Con respecto a la concentración de K en las hojas, no hubo diferencias significativas entre condiciones de cultivo o subcultivares. Sin embargo, su concentración en los tallos de las plantas cultivadas en invernadero fue mayor que en las plantas al aire libre.
- La concentración de Ca no mostró diferencias significativas en los subcultivares EEP y EP cuando se compararon los tallos y las hojas de las plantas cultivadas al aire libre con las de invernadero, los niveles de Ca fueron mayores al aire libre para las hojas del subcultivar LP. Además, la concentración de Ca fue mayor en hojas que en tallo, en todos los casos.
- La concentración de Mg, de forma similar al Ca, fue mayor en hojas que en tallos en todos los casos. Además, en hoja, la concentración de Mg

encontrada fue mayor en plantas cultivadas en invernadero que en aire libre. Sin embargo, las concentraciones de Mg encontradas en los tallos de los subcultivares EEP, EP y LP, no mostraron diferencias significativas entre condiciones de cultivo.

- La concentración de Na, fue mayor en plantas cultivadas en invernadero, tanto en hojas como en tallos de los tres subcultivares. Además, no hubo diferencias entre la cantidad de Na en tallos y hojas en ningún subcultivar, excepto en el subcultivar LP cultivado al aire libre, donde la cantidad de Na en hoja fue mayor que la mostrada en tallo.
- En cuanto a la concentración de S, no hubo diferencias significativas entre hojas y tallos, en ninguno de los subcultivares. Además, la concentración de S fue mayor en plantas de invernadero, en todos los casos.
- Con respecto a la concentración de Al, B, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, debido a que no hubo diferencias entre subcultivares, muestra vegetal o condición de crecimiento, y a que en la mayoría de los casos, la concentración fue inferior a 1 mg kg^{-1} PS, no se muestran los resultados.

5.3.4. Pigmentos fotosintéticos

Se determinaron espectrofotométricamente las concentraciones de clorofilas a y b (Figura 5.3.A) y de carotenoides (Figura 5.3.B) como pigmentos foliares.

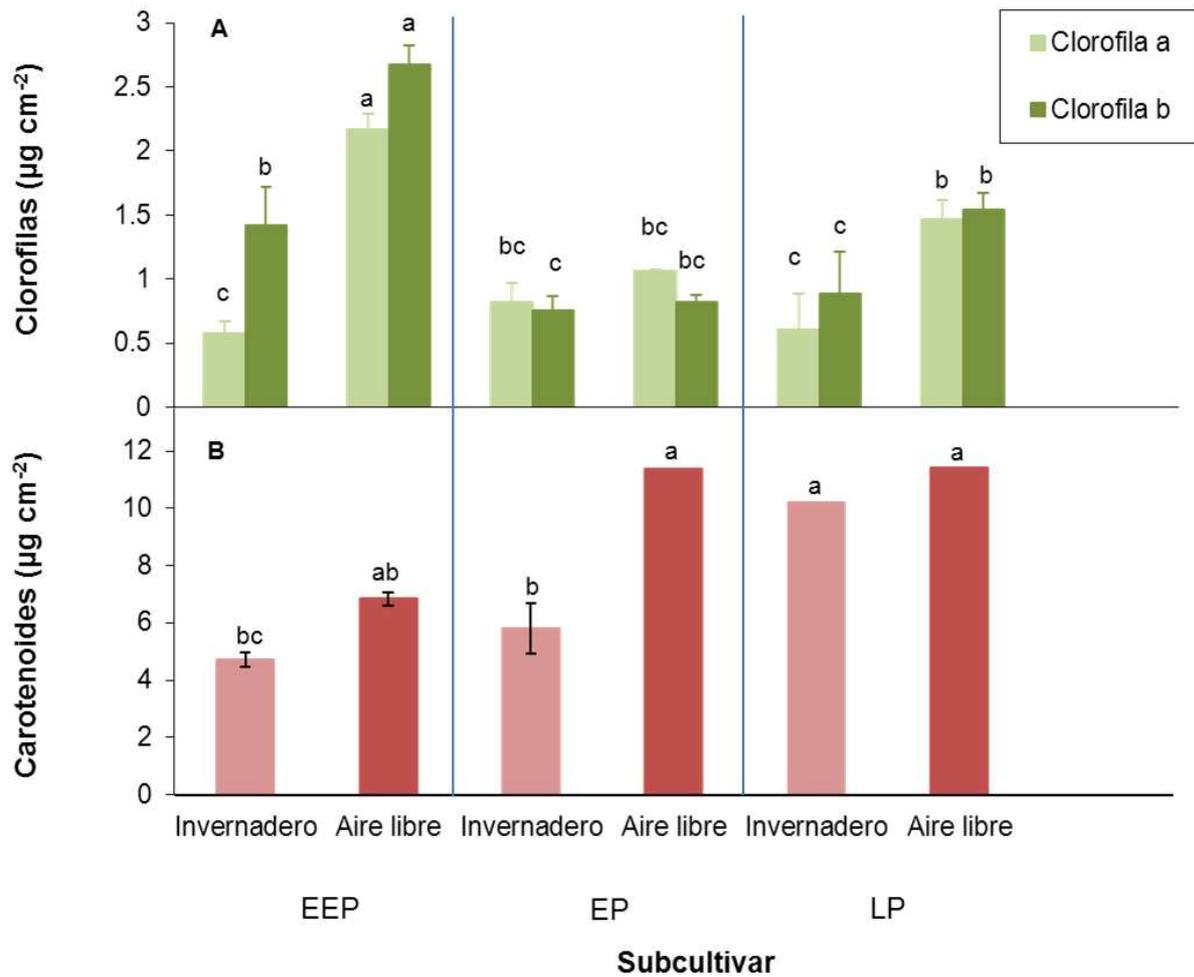


Figura 5.3. Clorofila a y clorofila b (A) y carotenoides (B) de cada subcultivar. Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$, $n = 10$ para cada subcultivar).

La concentración de clorofila a y clorofila b (Figura 5.3.A) fue mayor en las plantas desarrolladas al aire libre, en los subcultivares EEP y LP, mientras que no hubo diferencias significativas entre ambas condiciones de cultivo, en el subcultivar EP. La concentración de carotenoides (Figura 5.3.B) fue mayor en plantas desarrolladas al aire libre con respecto a las de invernadero, en el subcultivar EP. Sin embargo, en los subcultivares EEP y LP, aunque hubo una concentración superior de

carotenoides en plantas cultivadas al aire libre, no se observaron diferencias significativas con respecto a las cultivadas en invernadero.

5.3.5. Glucosinolatos y compuestos fenólicos totales

El análisis del contenido en glucosinolatos y compuestos fenólicos totales en las hojas, tallos e inflorescencias (Tabla 5.3) de distintos subcultivares de brócoli púrpura, mostró diferencias significativas entre subcultivares y condiciones de cultivo. En general, tanto la concentración de glucosinolatos como la de los compuestos fenólicos, fue mayor en plantas desarrolladas al aire libre que en plantas desarrolladas en invernadero.

En el caso de los glucosinolatos, hay que destacar que hubo varias excepciones, como en el caso del subcultivar EP, que mostró la concentración más alta de glucosinolatos, en las plantas de invernadero, y en los tallos del subcultivar LP, no se observó diferencia significativa entre las distintas condiciones de cultivo.

Table 5.3. Glucosinolatos ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ PF) y compuestos fenólicos ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ PF) totales en hojas, tallos e inflorescencias de cada subcultivar de brócoli púrpura estudiado, diferenciando entre el cultivo en invernadero y al aire libre.

		Glucosinolatos	Compuestos Fenólicos
Hoja			
Invernadero	EEP	84.86±5.96c ^a	2.65±0.29b
	EP	307.30±19.42a	2.22±0.08b
	LP	30.17±3.33d	2.40±0.01b
Aire libre	EEP	183.41±11.10b	3.94±0.04a
	EP	106.33±7.90c	3.76±0.04a
	LP	146.62±23.91bc	3.77±0.45a
Tallo			
Invernadero	EEP	88.20±3.58c	0.10±0.01c
	EP	113.40±3.60b	0.02±0.001e
	LP	135.55±12.99a	0.08±0.001d
Aire libre	EEP	114.49±15.30ab	0.14±0.01b
	EP	91.04±7.55c	0.25±0.08a
	LP	139.19±30.18a	0.07±0.01d
Inflorescencia			
Aire libre	EEP	473.95±52.79a	5.31±1.44a
	EP	487.53±87.56a	4.99±0.47a

^aValores con letra diferente en la misma columna y material vegetal, son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, $P < 0.05$, $n = 10$ para cada subcultivar).

En relación con los compuestos fenólicos encontrados en la hoja, no hubo diferencias significativas entre los subcultivares de una misma condición de cultivo, pero al aire libre la concentración de compuestos fenólicos fue mayor a $3.5 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ PF, mientras que en invernadero, la concentración fue menor a $2.7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ PF en todos los casos. Por otro lado, en las muestras vegetales referidas a los tallos del subcultivar LP, no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones de cultivo, pero en los subcultivares EEP y EP, la concentración de compuestos fenólicos fue mayor en aire libre que en invernadero.

En cuanto a las inflorescencias, es importante destacar, que no fue posible obtener inflorescencias en las condiciones de invernadero, para ninguno de los tres subcultivares estudiados, así como tampoco se obtuvieron inflorescencias en el subcultivar LP cultivado al aire libre. Además, no se observaron diferencias significativas en la concentración de glucosinolatos y compuestos fenólicos, entre el subcultivar EEP y el EP. La inflorescencia concentró la mayor concentración de glucosinolatos y compuestos fenólicos del vegetal.

5.4. DISCUSIÓN

En este capítulo, hemos estudiado los factores medioambientales que condicionaron el comportamiento fisiológico de distintos cultivares de brócoli, y su composición bioquímica. En condiciones de cultivo al aire libre, con mayor PAR, la mayor tasa fotosintética resultó en un mayor desarrollo de las plantas en relación a las cultivadas en el invernadero (Pettigrew y Meredith 1994; Faville et al. 1999). Además, las plantas desarrolladas al aire libre tuvieron un mayor contenido de carotenoides y clorofilas (Figura 5.2), coincidiendo con dicha mayor tasa

fotosintética. Estos datos corroboran estudios que señalan que los niveles de fotosíntesis aumentaron con la PAR y que dependían del cultivo (Moens 1991). En nuestro caso, se observó una drástica disminución de la PAR ($420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el invernadero. Estos resultados permitieron inferir que el brócoli púrpura cultivado en el invernadero, se vio afectado por la reducción de la PAR, lo cual modificó su capacidad fotosintética y su consiguiente crecimiento óptimo y desarrollo. De acuerdo con Lee et al. (2000), la intensidad y tipo de radiación puede modificar la estructura de la hoja (tanto de los estomas, como el grado y la forma de los espacios de aire), limitar la asimilación fotosintética y, alterar el contenido y la distribución de los pigmentos, todos estos elementos que en su conjunto, determinan la eficiencia en la captura de radiación por la hoja, e influyen en la actividad fotosintética.

Además de la intensidad de la luz solar, la temperatura del aire fue también muy diferente al aire libre o en invernadero y, por tanto, las diferencias en el contenido de fitonutrientes no puede ligarse a un único factor ambiental. Un menor contenido de clorofilas y carotenoides, en las plantas desarrolladas en el invernadero, en comparación con las crecidas al aire libre, pudo deberse a la reducción de la síntesis de pigmentos por las altas temperaturas, o por una intensidad de luz disminuida. En el brócoli de las parcelas al aire libre, dicha reducción en la síntesis de pigmentos no se compensó con que la planta pudiera usar los carotenoides como fotoprotectores bajo altas intensidades de luz (Hanson et al. 2009).

En las plantas desarrolladas al aire libre, se registraron áreas foliares mayores y mayor eficiencia en la asimilación de CO_2 (como mayor tasa fotosintética), lo que se reflejó en una mayor acumulación de biomasa. Se sabe que el aumento de la conductancia estomática, aumentó la difusión del CO_2 en las hojas, lo que mejoró la tasa de fotosíntesis (Rouphael et al. 2008). Sin embargo, la elevada tasa de

fotosíntesis encontrada en las plantas crecidas al aire libre, no se asoció a una mayor conductancia estomática, indicando que estuvo condicionada principalmente por la PAR. De manera similar, Zeiger y Field (1982), demostraron que la asimilación de CO₂ no sólo estuvo subordinada a la actividad estomática y que la apertura de los estomas puede suceder de forma independiente tanto de la asimilación de CO₂ en el mesófilo, como de la concentración interna de CO₂ en la cavidad subestomática. Por el contrario, los niveles de transpiración encontrados en las plantas desarrolladas al aire libre, se correlacionaron con una conductancia estomática menor, maximizando el uso eficiente del agua, durante el transcurso del tiempo del cultivo (Figura 5.1). La reducción de la transpiración, es un signo común de senescencia foliar, que está generalmente relacionado con un aumento de la producción de ácido abscísico (Heaton et al. 1987). Sin embargo, aunque Singal et al. (1995), demostraron la disminución de la intensidad de la fotosíntesis en plantas de *Brassica campestris* L., como un proceso dependiente de senescencia, nuestros datos no reflejaron variación alguna de la tasa fotosintética con el tiempo, para ningún subcultivar ni condición de crecimiento y, las plantas realizaron las funciones relacionadas con los procesos de asimilación de la radiación solar. En nuestro estudio, las hojas del cultivar EP presentaron una tasa fotosintética por unidad de área foliar mayor, por lo tanto, interceptaron mayor radiación fotosintéticamente activa (Carbo et al. 2005). De esta manera, el subcultivar EP presentó mayores valores de área foliar, tasa fotosintética y biomasa, en comparación con los demás subcultivares.

Se ha observado que las plantas cultivadas con altas intensidades de luz, tuvieron una mayor capacidad de uso de la radiación, a través de un aumento del contenido del Citocromo F, del Citocromo B6F, de la Rubisco y de la asimilación de carbono (Yamori et al. 2010). En este sentido, las plantas cultivadas al aire libre,

podieron tener una mayor tasa de fijación de carbono, reflejada en el mayor % de C (Tabla 5.2). Por otro lado, algunos autores (Yasumura et al. 2006), han establecido que el N foliar está relacionado con la radiación y el contenido de carbono asimilado, por lo tanto, aunque el porcentaje de N fue mayor en las plantas de invernadero, la cantidad de N (g/planta), fue mayor en las plantas al aire libre, con mayor radiación y contenido de carbono (Tabla 5.2). Además, puesto que todas las plantas mostraron una captación similar de nutrientes minerales, se puede concluir que, para estos subcultivares, ninguna de las dos condiciones de cultivo, causó deficiencias en el contenido de macronutrientes, aunque sí lo hizo en el contenido de los micronutrientes Fe, Mn, Zn, Cu y B, al comparar con el rango de suficiencia de referencia (Hanlon y Hochmuth 2000).

El cultivar de brócoli púrpura LP, fue el único que no pudo dar inflorescencias comerciales en cultivo al aire libre. Estudios anteriores han demostrado que uno de los factores determinantes de la producción de brócoli es la temperatura (Dufault 1996, 1997; Grevsen 1998), que influye en el crecimiento y el desarrollo (González-Benavente et al. 1993). Para la correcta producción de brócoli, la temperatura puede rondar entre 8 y 30°C, aunque la temperatura diurna óptima es de 16-18°C, para la mayoría de cultivares (Chaux y Foury 1994). El brócoli resiste las heladas, por lo que las bajas temperaturas del invierno encontradas en las parcelas al aire libre, no causaron ningún daño al cultivo. Además, el crecimiento adecuado de las inflorescencias de alta calidad, se alcanza entre los 14 y 16 °C (Chaux y Foury 1994; Wurr et al. 1996), pero necesita de temperaturas bajas nocturnas para inducir la formación (vernalización), por lo que en el invernadero, en el que las temperaturas mínimas oscilaron entre 14 - 18 °C, las inflorescencias no aparecieron, ya que no se dieron temperaturas más bajas (<10 °C). Además, las bajas temperaturas afectan a la

formación de inflorescencias prematuras (Miller et al. 1985) y la fecha de plantación afecta a las características de las inflorescencias y a la duración del ciclo, debido a las variaciones térmicas (Montoro et al. 1992). Por lo tanto, debido a que los tres subcultivares de brócoli se cultivaron en la misma estación, pero no desarrollaron las inflorescencias de forma sincrónica (90-120 días de edad), podemos concluir que para el subcultivar LP ni la época ni las condiciones de cultivo fueron adecuadas.

Finalmente, se sabe que el contenido de glucosinolatos en brócoli, aumenta a temperaturas medias diarias entre 7 y 13 °C, combinadas con una radiación media diaria de 10-13 mol m⁻² d⁻¹ (Schönhof et al. 2004). Las diferencias en el contenido de glucosinolatos se deben a factores ambientales, tales como el tipo de suelo, o los factores agronómicos, como la intensidad de la fertilización (Fenwick et al. 1983), lo que explicaría los mayores niveles de glucosinolatos en plantas cultivadas al aire libre. Además, las concentraciones de glucosinolatos en las inflorescencias, fueron más altas en comparación con otros cultivares de brócoli verde, como Marathon (Moreno et al. 2008; López-Berenguer et al. 2009), o brócoli púrpura (Lewis y Fenwick 1987).

Se sabe que el contenido de glucosinolatos en el brócoli, se ve afectado por la temperatura (Schönhof et al. 2004), más que por la radiación. Se debe recordar que estos cultivares y otros de brócoli verde, son cultivares de clima frío y cuyo ciclo productivo es en otoño-invierno. Por ello, el cultivo al aire libre presentó condiciones de temperatura y humedad más idóneas. Sin embargo, en las condiciones de invernadero, la temperatura ambiental fue mayor que en el exterior y por tanto, menos beneficiosa para la formación de inflorescencia de estas variedades. En el cultivo al aire libre se dio una activación del metabolismo secundario, mayor síntesis y acumulación de glucosinolatos (Yan y Chen 2007). De forma análoga,

Gliszczyńska-Świgło et al. (2007), demostraron que el contenido en compuestos fenólicos está relacionado positivamente con la radiación solar y con el crecimiento, por lo que nuestros resultados estuvieron en consonancia con esto, puesto que las plantas que crecieron al aire libre, presentaron un mayor contenido en compuestos fenólicos, una mayor tasa fotosintética y mayor crecimiento (biomasa), con mayor rendimiento de pella en la cosecha.

5.5. CONCLUSIONES

El cultivo en invernadero constituye un ambiente excelente de estudio y control para el desarrollo de plantas. Pero, sin embargo, los subcultivares de brócoli púrpura estudiados, se adaptaron mejor a las condiciones de aire libre durante la temporada de invierno del SE de España. Se obtuvo así, un mayor WUE y una mayor producción asociada con la PAR, en dichas plantas en comparación con aquellas desarrolladas en invernadero. Además, la calidad nutricional y de compuestos beneficiosos para la salud (glucosinolatos y compuestos fenólicos), en estos subcultivares, fue mayor que en variedades de brócoli verde tradicional. Por otra parte, también se ha demostrado que los subcultivares de floración temprana (EEP y EP) del brócoli púrpura estudiados, se adaptaron mejor a las condiciones de invierno de la Región de Murcia, con un clima Mediterráneo semiárido.

CAPÍTULO III

**EFECTO DE LA INTERACCIÓN DEL ESTRÉS
POR BORO Y SALINIDAD SOBRE EL
TRASPORTE DE AGUA Y NUTRIENTES EN DOS
CULTIVARES DE BRÓCULI**

6.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar la absorción de agua y minerales, así como la integridad de la membrana plasmática y expresión de acuaporinas PIP de dos cultivares de brócoli en respuesta al efecto combinado de la salinidad y el exceso de boro (B). Para ello, se usó como material vegetal, dos cultivares comerciales de brócoli, uno de una variedad verde (cv. Naxos) y otro de una variedad púrpura (cv. Viola). Se determinaron la biomasa, la conductancia hidráulica radicular, la abundancia de Proteínas Intrínsecas de Membrana Plasmática (PIP1 y PIP2), el índice de estabilidad de la membrana plasmática y la concentración y distribución de los nutrientes minerales, en plantas sometidas a dos concentraciones de B sólo o en combinación con salinidad. Además, se analizó la concentración de compuestos fenólicos, como un indicador biológico de la influencia del B en el metabolismo secundario de las plantas.

6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se realizó con dos cultivares comerciales de brócoli verde y púrpura (*Brassica oleracea* L. (Grupo Italica): cultivares Naxos y Viola, respectivamente.

La germinación y el cultivo de las plantas se realizaron en una cámara de germinación y de cultivo, respectivamente, en condiciones controladas tal y como se describió en el apartado de Material y Métodos.

Después de 15 días en hidroponía con solución Hoagland y aireación constante (cuando las plantas tuvieron 21 días de edad), se les aplicaron los distintos

tratamientos: 0 mM NaCl, 80 mM NaCl, una concentración de B of 0.024 mM (1.5 mg L⁻¹) (H₃BO₃ (B1)), una concentración de B de 0.065 mM (4 mg L⁻¹) (H₃BO₃ (B2)), 80 mM NaCl junto con 1.5 mg L⁻¹ H₃BO₃ (NaCl+B1) y 80 mM NaCl junto con 4 mg L⁻¹ H₃BO₃ (NaCl+B2).

El brócoli es moderadamente sensible al boro, con un umbral de 1 mg L⁻¹ (Boron Tolerance Databases Global Change Master directory, NASA, <http://gcmd.nasa.gov>); por esta razón, para el desarrollo de este experimento, se eligieron concentraciones de B de 1.5 mg L⁻¹ y 4 mg L⁻¹.

Las plantas se recolectaron a los 15 días de tratamiento, aproximadamente cuando tenían 36 días de edad. La recolección y distintas medidas de las plantas se realizaron a mitad del periodo de luz.

Se determinaron parámetros como la biomasa, la conductancia hidráulica radicular (L_0), la abundancia de PIP, el Índice de Estabilidad de la Membrana Plasmática (MSI), el contenido mineral y los compuestos fenólicos.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Biomasa

La biomasa tanto de la raíz como de la parte aérea, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y cultivares (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Peso Seco (g PS planta⁻¹) de la parte aérea y de las raíces de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola) y las plantas tratadas con 80 mM NaCl, H₃BO₃ 1.5 mg L⁻¹ (B1), H₃BO₃ 4 mg L⁻¹ (B2), 80 mM NaCl and H₃BO₃ 1.5 mg L⁻¹ (NaCl+B1) o 80 mM NaCl y H₃BO₃ 4 mg L⁻¹ (NaCl+B2) durante 2 semanas.

	Control	NaCl	B1	B2	NaCl+B1	NaCl+B2
Naxos Parte aérea	5.8a ^a	3.4c	6.3a	6.1a	5.0b	3.8c
Viola Parte aérea	5.3a	3.2b	5.4a	4.5a	3.6b	3.2b
ANOVA	ns ^b	ns	ns	**	***	ns
Naxos Raíz	0.9a	0.6b	1.1a	1.1a	0.8a	0.6b
Viola Raíz	0.9a	0.5c	1.0a	0.8b	0.6c	0.6c
ANOVA	ns ^b	ns	ns	*	*	ns

^aValores con letra diferente son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, P< 0.05, n= 10 para cada tratamiento).

^bSe empleó el test de student para mostrar las diferencias entre cultivares. No-significativo (P> 0.05, ns); Significativo a P< 0.05 (*), P< 0.01 (**), y P< 0.001 (***)

En general, tanto el tratamiento con NaCl como los de NaCl-B disminuyeron la biomasa de ambos órganos en los dos cultivares, con la excepción de las raíces del cv. Naxos tratadas con NaCl+B1 cuyo peso seco se mantuvo en los niveles del tratamiento control. Además, a pesar de que se observó una reducción de la biomasa de la parte aérea en las plantas del cv. Naxos, tratadas con NaCl+B1 con respecto a las plantas control, este tratamiento fue capaz de recuperar el peso seco de la parte aérea del cv. Naxos, cuando lo comparamos con el tratamiento con NaCl.

Para ambos cultivares, la biomasa de ambos órganos en las plantas tratadas con B, no mostró diferencias con respecto a los valores control, excepto las raíces de las plantas del cv. Viola, tratadas con B2, cuya biomasa se redujo (Tabla 6.1). Curiosamente, se encontraron diferencias significativas entre el peso seco de la parte aérea y las raíces de los cultivares Naxos y Viola, en los tratamientos con B2 y

NaCl+B1 cuando fueron comparados individualmente. De esta forma, el cv. Viola, presentó mayor sensibilidad a la adición de B, lo cual se reflejó en la inferior biomasa de su parte aérea y raíces comparado con el cv. Naxos.

6.3.2. Tasa de transpiración y tasa fotosintética

La tasa de transpiración y la tasa fotosintética de las plantas cultivadas con los distintos tratamientos, se muestran en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Tasa de transpiración ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y tasa fotosintética ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de la parte aérea de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola) y las plantas tratadas con 80 mM NaCl, H_3BO_3 1.5 mg L^{-1} (B1), H_3BO_3 4 mg L^{-1} (B2), 80 mM NaCl and H_3BO_3 1.5 mg L^{-1} (NaCl+B1) o 80 mM NaCl y H_3BO_3 4 mg L^{-1} (NaCl+B2) durante 2 semanas.

		Tasa de transpiración	Tasa fotosintética
Naxos	Control	$2.06 \pm 0.11\text{a}^{\text{a}}$	$9.29 \pm 0.52\text{ab}$
	NaCl	$1.56 \pm 0.14\text{b}$	$8.18 \pm 0.46\text{b}$
	B1	$1.73 \pm 0.08\text{ab}$	$11.62 \pm 0.90\text{a}$
	B2	$1.87 \pm 0.03\text{ab}$	$11.67 \pm 0.54\text{a}$
	NaCl+B1	$1.54 \pm 0.07\text{b}$	$7.87 \pm 0.50\text{b}$
	NaCl+B2	$1.42 \pm 0.08\text{b}$	$6.98 \pm 0.12\text{bc}$
Viola	Control	$2.11 \pm 0.02\text{a}$	$8.03 \pm 0.24\text{a}$
	NaCl	$1.75 \pm 0.06\text{b}$	$6.88 \pm 0.25\text{b}$
	B1	$1.90 \pm 0.01\text{ab}$	$7.63 \pm 0.64\text{a}$
	B2	$1.69 \pm 0.07\text{b}$	$5.88 \pm 0.42\text{c}$
	NaCl+B1	$1.62 \pm 0.02\text{b}$	$6.49 \pm 0.15\text{bc}$
	NaCl+B2	$1.59 \pm 0.06\text{b}$	$5.85 \pm 0.31\text{c}$

^aValores con letra diferente para el mismo cultivar, son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, $P < 0.05$, $n = 10$ para cada tratamiento).

La tasa de transpiración encontrada en el cv. Naxos cultivado en condiciones de salinidad, fue inferior a la encontrada en el tratamiento control, mientras que la tasa fotosintética no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos (control y NaCl). Por otro lado, tanto la tasa de transpiración como la tasa fotosintética, no causó diferencias significativas en los tratamientos con boro (B1 y B2) con respecto al control. Por último, los tratamientos combinados (NaCl+B1 y NaCl+B2) no presentaron diferencias con respecto al tratamiento con NaCl, aunque la tasa de transpiración fue inferior al tratamiento control pero la tasa fotosintética no mostró diferencias entre tratamientos (control y NaCl+B1 y NaCl+B2).

En el cv. Viola, el tratamiento salino produjo una disminución de la tasa de transpiración y fotosintética con respecto al tratamiento control. Por otro lado, el tratamiento con B1 no mostró diferencias significativas con respecto al control, mientras que el tratamiento con B2 produjo una disminución de la tasa de transpiración y la tasa fotosintética, así como también lo hicieron los tratamientos combinados con NaCl y B.

6.3.3. Efecto del NaCl y el B sobre la conductancia hidráulica radicular (L_0)

La L_0 de las plantas de brócoli se midió utilizando una cámara de presión Scholander, dos semanas después de aplicar los tratamientos (Figura 6.1).

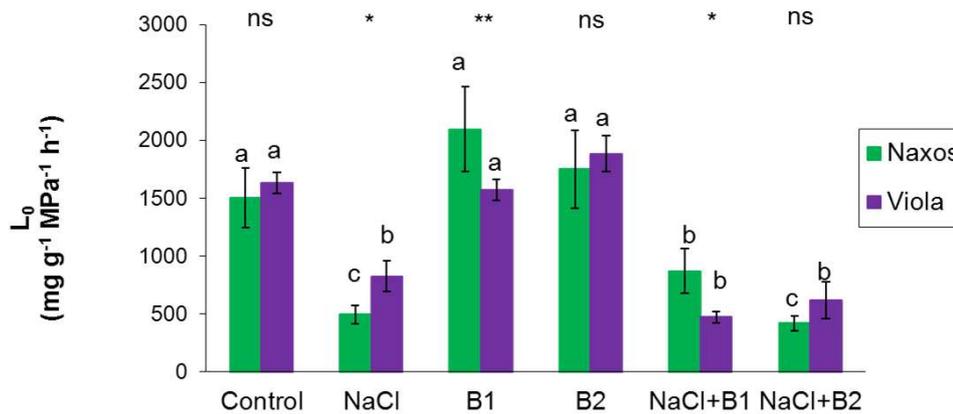


Figura 6.1. Conductancia hidráulica (L_0) de las raíces de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola) y las plantas tratadas con 80 mM NaCl, H_3BO_3 1.5 mg L⁻¹ (B1), H_3BO_3 4 mg L⁻¹ (B2), 80 mM NaCl and H_3BO_3 1.5 mg L⁻¹ (NaCl+B1) o 80 mM NaCl y H_3BO_3 4 mg L⁻¹ (NaCl+B2) durante 2 semanas. Las barras con diferente letra dentro del mismo cv. son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$, $n = 6$ para cada tratamiento). Se empleó el test de student para mostrar las diferencias entre cultivares (No-significativo ($P > 0.05$, ns); Significativo a $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), y $P < 0.001$ (***)).

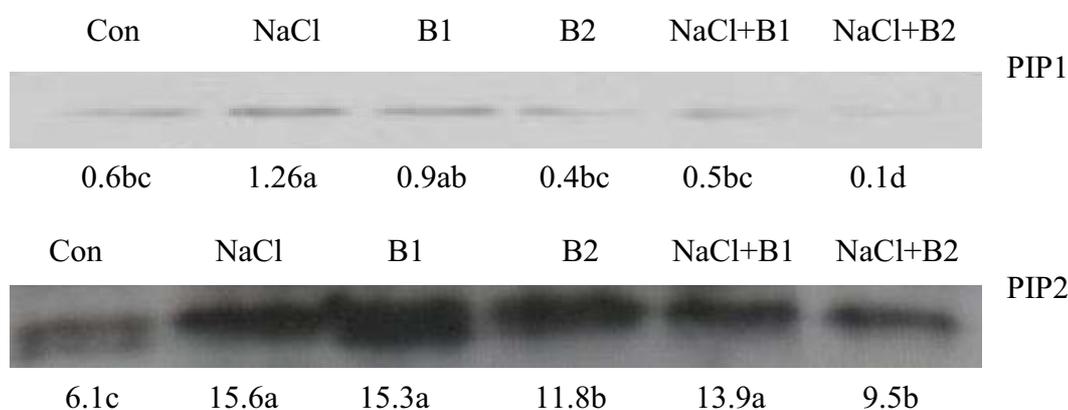
En el cv. Naxos, los tratamientos con NaCl y NaCl+B2 causaron una disminución significativa de L_0 (alrededor del 50 %), comparado con los valores de L_0 observados en las plantas control. Sin embargo, a pesar de que L_0 disminuyó en las plantas tratadas con NaCl+B1 con respecto a las controles, se observó una restitución de los valores con respecto al tratamiento con NaCl. Por otra parte, los tratamientos con B1 y B2 no tuvieron efectos significativos sobre L_0 , al compararlos con las plantas control.

En el cv. Viola, los tratamientos con NaCl, NaCl+B1 y NaCl+B2 produjeron disminuciones de L_0 similares al cv. Naxos (40, 50 y 45 %, respectivamente), comparado con las plantas control. Además, tal y como ocurrió en el cv. Naxos, los tratamientos con B1 y B2 no tuvieron efectos significativos sobre L_0 .

6.3.4. Efecto del NaCl y el B sobre la abundancia de acuaporinas

La abundancia de acuaporinas PIP1 y PIP2 en la membrana plasmática de raíces de plantas de brócoli, se estudió mediante Western blotting (Figura 6.2). Se detectó una banda de 29 kDa (forma monomérica) con ambos anticuerpos (especificados en el apartado de Material y Métodos) en todas las muestras. La intensidad de la inmunotinción difirió entre los distintos tratamientos.

NAXOS



VIOLA

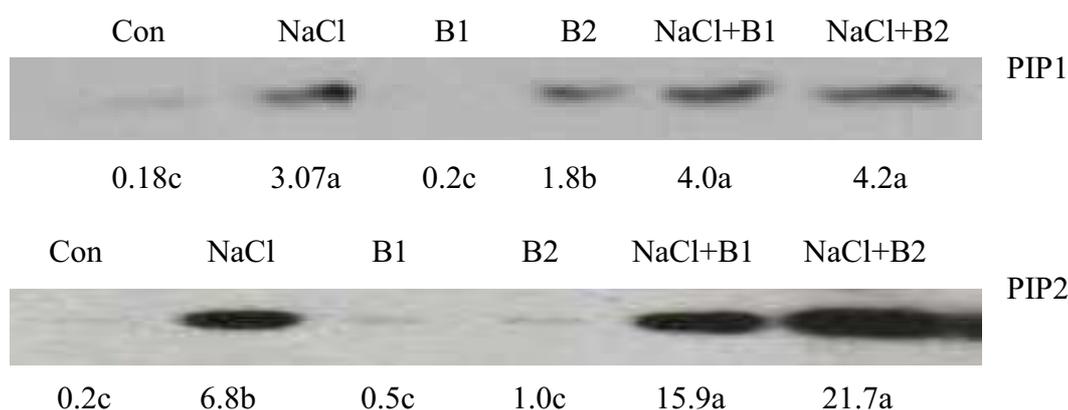


Figura 6.2. Inmunodetección de homólogos de PIP1 y PIP2 en la membrana plasmática (MP) de las raíces de brócoli crecidas con los diferentes tratamientos. Las proteínas de MP se separaron mediante SDS-PAGE y se incubaron con el anticuerpo producido contra AtPIP1;1 o con el anticuerpo producido contra AtPIP2;2. Los números indican intensidad de banda relativa normalizada, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. Para cada cultivar e isoforma PIP, los valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$, $n = 3$ para cada tratamiento).

De esta forma, en el cv. Naxos, se encontró un ligero pero significativo, aumento del contenido de la proteína PIP1 de la membrana plasmática de raíz, cuando se añadió NaCl, mientras que el contenido de la proteína, se mantuvo con valores similares al control, en las plantas tratadas con B1, B2 y NaCl+B1 y disminuyó con NaCl+B2.

En el cv. Viola, la adición de NaCl resultó en un incremento significativo (30 veces) de la cantidad de PIP1 con respecto al control, mientras que el tratamiento con B2 supuso un incremento de la abundancia de 18 veces y, los tratamientos combinados de NaCl y B aumentaron el nivel de esta subfamilia de proteínas 40 veces. La abundancia de proteínas PIP2 en el cv. Naxos, incrementó con todos los tratamientos, mientras que en el cv. Viola, la concentración de proteínas PIP2, se incrementó tras el tratamiento con NaCl o su combinación con B, siendo el valor más alto el producido por el tratamiento con NaCl+B2.

6.3.5. Índice de Estabilidad de la Membrana (MSI)

En ambos cultivares, el MSI mostró una disminución con respecto al control, después de la adición de NaCl, NaCl+B1 o NaCl+B2; en general, la reducción en el cv. Naxos fue mayor que para el cv. Viola (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Índice de Estabilidad de la Membrana (%) de las raíces de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola) y las plantas tratadas con 80 mM NaCl, H₃BO₃ 1.5 mg L⁻¹ (B1), H₃BO₃ 4 mg L⁻¹ (B2), 80 mM NaCl and H₃BO₃ 1.5 mg L⁻¹ (NaCl+B1) o 80 mM NaCl y H₃BO₃ 4 mg L⁻¹ (NaCl+B2) durante 2 semanas.

	Control	NaCl	B1	B2	NaCl+B1	NaCl+B2
Naxos	66.4a ^a	37.9c	67.6a	65.2a	51.4b	39.7bc
Viola	72.1a	51.9b	69.0a	63.7a	52.3b	55.0b
ANOVA	ns ^b	**	ns	ns	ns	**

^aValores con letra diferente son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, P< 0.05, n= 10 para cada tratamiento).

^bSe empleó el test de student para mostrar las diferencias entre cultivares. No-significativo (P> 0.05, ns); Significativo a P< 0.05 (*), P< 0.01 (**), y P< 0.001 (***)).

Los tratamientos con B1 y B2 no tuvieron efectos significativos en el MSI, en comparación con los valores control. Los tratamientos de NaCl y NaCl+B2 produjeron las mayores reducciones en el MSI del cv. Naxos, en relación al cv. Viola, cuando los dos cultivares se compararon individualmente para cada tratamiento (Tabla 6.3).

6.3.6. Análisis mineral

Las condiciones salinas y la adición de ácido bórico alteró significativamente el estado nutricional de las raíces y la parte aérea de los cultivares Naxos y Viola (Tabla 6.4 y 6.5).

Tabla 6.4. Concentración ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$) de elemento mineral del tejido vegetal de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola) y las plantas tratadas con 80 mM NaCl, H_3BO_3 1.5 mg L^{-1} (B1), H_3BO_3 4 mg L^{-1} (B2), 80 mM NaCl and H_3BO_3 1.5 mg L^{-1} (NaCl+B1) o 80 mM NaCl y H_3BO_3 4 mg L^{-1} (NaCl+B2) durante 2 semanas.

Naxos					
	B	Ca	K	Na	Cl
Parte aérea					
Control	3.4d ^a	774a	1239a	24b	78.9c
NaCl	3.6d	516bc	704b	1844a	1859.1a
B1	8.0b	707ab	1232a	32b	59.1c
B2	17.8a	798a	1403a	29b	78.9c
NaCl+B1	5.9cd	459c	615b	1688a	1278.8b
NaCl+B2	9.5b	556bc	703b	1641a	1200b
Raíz					
Control	1.7c	558a	1122a	35b	121.1b
NaCl	2.0c	302b	659b	871a	540.8a
B1	3.2b	566a	1220a	77b	78.9c
B2	6.3a	486ab	1082a	29b	160.5b
NaCl+B1	2.3c	286b	675b	863a	540.8a
NaCl+B2	4.1b	358b	837b	709a	419.7a

^aValores con letra diferente son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, $P < 0.05$, $n = 10$ para cada tratamiento).

Tabla 6.5. Concentración ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS}$) de elemento mineral del tejido vegetal de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola) y las plantas tratadas con 80 mM NaCl, H_3BO_3 1.5 mg L^{-1} (B1), H_3BO_3 4 mg L^{-1} (B2), 80 mM NaCl and H_3BO_3 1.5 mg L^{-1} (NaCl+B1) o 80 mM NaCl y H_3BO_3 4 mg L^{-1} (NaCl+B2) durante 2 semanas.

Viola					
	B	Ca	K	Na	Cl
Parte aérea					
Control	3.3c ^a	930a	1383a	30c	78.8b
NaCl	4.0c	460b	419b	2432a	780.3a
B1	9.3b	925a	1149a	295c	59.1b
B2	16.1a	1081a	1411a	28c	59.1b
NaCl+B1	4.6c	507b	510b	2015ab	921.1a
NaCl+B2	9.4b	443b	485b	1841b	701.4a
Raíz					
Control	1.8c	313a	1455a	36b	59.1b
NaCl	1.8c	116b	1083b	880a	380.28a
B1	3.7b	357a	1445a	38b	59.1b
B2	5.6a	320a	1495a	37b	39.4b
NaCl+B1	2.2c	122b	1140b	765a	380.3a
NaCl+B2	3.1b	128b	1258b	821a	419.7a

^aValores con letra diferente son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, $P < 0.05$, $n = 10$ para cada tratamiento).

La concentración de B en ambos cultivares y órganos fue mayor en los tratamientos con B, comparada con la del tratamiento control y las plantas tratadas con NaCl, las cuales a su vez, presentaron concentraciones de B similares a los del tratamiento control. En ambos cultivares, únicamente el tratamiento con NaCl+B2 presentó un efecto significativo sobre la concentración de B con respecto a las plantas control.

La concentración de Ca y K disminuyó en todos los tratamientos con NaCl, en ambos órganos y cultivares. Además, no hubo diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos con B en cuanto a las concentraciones de Ca y K.

En ambos cultivares y órganos vegetales, la concentración de Na fue mayor en el tratamiento con NaCl que para las plantas control y las tratadas con B. Sin embargo, se mostraron diferencias en la concentración de Na de la parte aérea de ambos cultivares, así como el cv. Viola acumuló en la parte aérea mayor concentración de Na que el cv. Naxos.

Con respecto a la concentración del anión Cl^- , se observó un aumento en todos los tratamientos con NaCl. Sin embargo, no se observaron diferencias en la concentración de Cl^- en las raíces del cv. Naxos o en la parte aérea o raíz del cv. Viola, entre los tratamientos con NaCl, NaCl+B1 o NaCl+B2. En la parte aérea del cv. Naxos, la concentración de Cl^- en los tratamientos con NaCl+B1 y NaCl+B2 disminuyó con respecto al tratamiento con NaCl.

6.3.7. Compuestos fenólicos

La concentración total de compuestos fenólicos de la parte aérea, que se determinaron por HPLC-DAD (Tabla 6.6), fue mayor en los tratamientos con NaCl - con respecto al tratamiento control - en ambos cultivares, particularmente en el cv. Viola.

Tabla 6.6. Compuestos fenólicos totales ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ DW) de la parte aérea de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola) y las plantas tratadas con 80 mM NaCl, H_3BO_3 1.5 mg L^{-1} (B1), H_3BO_3 4 mg L^{-1} (B2), 80 mM NaCl and H_3BO_3 1.5 mg L^{-1} (NaCl+B1) o 80 mM NaCl y H_3BO_3 4 mg L^{-1} (NaCl+B2) durante 2 semanas.

	Control	NaCl	B1	B2	NaCl+B1	NaCl+B2
Naxos	9.3b ^a	14.8a	5.3c	6.1c	11.2ab	12.1ab
Viola	12.7b	22.0a	2.9c	5.8c	18.2ab	16.5ab
ANOVA	* ^b	**	*	ns	**	**

^aValores con letra diferente para el mismo cultivar, son estadísticamente diferentes (Test de Tukey, $P < 0.05$, $n = 10$ para cada tratamiento).

^bSe empleó el test de student para mostrar las diferencias entre cultivares. No-significativo ($P > 0.05$, ns); Significativo a $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), y $P < 0.001$ (***)).

Por otro lado, en las plantas tratadas con B, la concentración de compuestos fenólicos fue menor que la encontrada en las plantas control o en las plantas tratadas con NaCl. El efecto opuesto entre la acción del NaCl y B sobre la abundancia de compuestos fenólicos, se reflejó en los tratamientos con NaCl+B1 y NaCl+B2, donde no se encontraron diferencias en la concentración de estos compuestos, con respecto a las plantas control o las tratadas con NaCl.

6.4. DISCUSIÓN

La relación linear entre la producción de biomasa y el uso del agua por las plantas, se ha documentado en diferentes cultivos y diferentes condiciones de estrés, como el estrés salino (da Silva et al. 2008) o toxicidad por B (Ben-Gal y Shani 2002b). En este trabajo, la disminución de la biomasa tanto de la raíz como de la parte aérea tras la adición de NaCl, estuvo de acuerdo con estudios previos realizados en el grupo (López-Berenguer et al. 2006). Además, en hojas de lechuga, se observó que el incremento de la concentración de B no causó ninguna reducción del peso

seco en la planta (Eraslan et al. 2007b). Similares resultados se encontraron en trigo (Díaz y Grattan 2009) indicando que este cultivar era tolerante a B (20 mg L^{-1}) a pesar de los síntomas de toxicidad descritos en hoja. Sin embargo, también se ha descrito una disminución de la biomasa de la parte aérea con B, en plantas de tomate (Ben-Gal y Shani 2002b) e incluso en brócoli (Smith et al. 2010a), por lo que esta respuesta depende no sólo del cultivar sino también de la concentración de B suministrada y de las condiciones experimentales. En este trabajo, las plantas tratadas exclusivamente con B1, mostraron mayor crecimiento que las tratadas con NaCl, indicando que esta concentración de B es óptima para ambos cultivares, especialmente para el cv. Naxos. Sin embargo, al comparar las raíces y las partes aéreas de los cvs. Naxos y Viola, se observó una respuesta diferente tras la adición de B1 a las plantas tratadas con NaCl, las cuales recuperaron la biomasa en el cv. Naxos. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los encontrados por Bonilla et al. (2004) que después de aplicar B (3.5 mg L^{-1}), a plantas de *Pisum sativum* L. encontraron que este elemento facilitó la tolerancia a la salinidad durante el crecimiento de la planta. Sin embargo, los resultados encontrados para el cv. Viola, podrían indicar una mayor sensibilidad al B. De hecho, en el cv. Viola se observó una disminución de la transpiración y tasa fotosintética en tratamientos con B2 con respecto al control, que no ocurrió en el cv. Naxos (Tabla 6.2).

El efecto de la salinidad sobre la conductancia hidráulica, L_0 , se ha estudiado en brócoli y se ha sugerido, que la reducción de L_0 era debida al estrés hiperosmótico y al desequilibrio iónico causado por la alta concentración de iones Cl^- y Na^+ en el apoplasto, así como a la inactivación de las acuaporinas (López-Berenguer et al. 2006, López-Pérez et al. 2009; Muries et al. 2011). Sin embargo, no hay estudios de la respuesta de los cultivares de brócoli, con respecto a la absorción de agua y

modulación de acuaporinas tras la adición simultánea de B y NaCl. En el cv. Naxos, una mayor L_0 de las plantas tratadas con NaCl+B1, en comparación con los valores obtenidos antes de la adición de B1, podría explicar la recuperación de la biomasa de la raíz y la parte aérea en relación al tratamiento exclusivo con NaCl. De forma similar, el MSI también se recuperó en el cv. Naxos cuando se le añadió B1 a las plantas tratadas con NaCl. Ésto no ocurrió sin embargo en el cv. Viola o en las plantas tratadas con NaCl+B2 de ningún cultivar. De esta forma, la concentración de B1 tuvo un efecto positivo sobre la acción del NaCl en el cv. Naxos, en relación al transporte del agua y crecimiento, lo que indica que este cultivar podría ser regado con agua salina combinada con niveles moderados de B.

Se ha observado que en las raíces de brócoli, los genes de acuaporinas PIP se expresan en la membrana plasmática y son modificados en condiciones de estrés salino (Muries et al. 2011). De esta forma, en este trabajo se consideró si la abundancia de acuaporinas PIP podría explicar los cambios en la L_0 en condiciones en las que B y salinidad se aplican de forma conjunta. Sin embargo, un incremento de la abundancia de PIP2 en la membrana plasmática en condiciones salinas no resultó en un aumento paralelo de L_0 . Estos resultados estaban de acuerdo con trabajos previos (López-Pérez et al. 2009) que mostraron un engrosamiento de la capa phi en las raíces de plantas de *Brassica oleracea* L. crecidas con salinidad, siendo ésta una barrera física al transporte de agua en el apoplasto. Este descubrimiento apoya la acumulación de proteínas PIP en estas condiciones, donde la contribución de la vía apoplástica es relativamente baja y el agua es principalmente transportado vía célula a célula. La falta de correlación entre L_0 y la abundancia de proteínas PIP, podría deberse también a la contribución de las distintas isoformas PIP a la L_0 , a la localización diferencial de PIPs a lo largo de las

raíces (Benabdellah et al. 2009) o a una disminución de la fosforilación de las proteínas PIP, que podría afectar a la funcionalidad de las mismas y disminuir la L_0 (Van Wilder et al. 2008).

Un punto interesante es que la abundancia de PIP2 en el cv. Viola incrementó sólo con los tratamientos con NaCl, mientras que en el cv. Naxos incrementó también como consecuencia de los tratamientos con ácido bórico. Además se observó un patrón de expresión diferente de las subfamilias PIP1 y PIP2 en cada cultivar, lo cual indicó una sensibilidad hídrica diferente, entre estos dos cultivares, a los tratamientos con B y NaCl-B. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos donde se ha observado un patrón de expresión distinto para PIP1 y PIP2 en plantas de maíz (Martínez-Ballesta et al. 2008b). Aunque se ha sugerido que las acuaporinas están implicadas en el transporte de B en plantas superiores (Dordas et al. 2000, Fitzpatrick y Reid 2009) la falta de correlación entre las isoformas PIPs analizadas y la acumulación de B en las raíces de ambos cultivares, indica que otras isoformas de acuaporinas podrían estar implicadas en el transporte de B. Además, se ha relacionado la toxicidad por B con una reducción de la absorción de agua y la expresión de PIP y TIP en *Arabidopsis thaliana*, produciendo estrés hídrico e inhibición del crecimiento (Aquea et al. 2012). Sin embargo, se encontraron resultados diferentes en nuestras plantas de brócoli.

En el cv. Naxos, la concentración de B1 restituyó L_0 tras el tratamiento con NaCl, probablemente a través de un efecto en la funcionalidad de PIP o por un aumento del transporte de agua a través de la bicapa lipídica, tal y como sugiere la recuperación del MSI. En cualquier caso, el aumento de la abundancia de PIP2 no se relacionó directamente con la restitución de L_0 .

En el cv. Viola, hubo sin embargo, una mayor regulación de PIP2 en los tratamientos con NaCl-B que no se asoció con los cambios en L_0 . Esto sugiere que se debe considerar además la contribución de otras o distintas isoformas de PIP a la conductancia hídrica del cv. Viola en los tratamientos con NaCl-B. Los resultados indicaron que el umbral de sensibilidad a la concentración de B difirió en ambos cultivares, ya que al contrario que en el cv. Naxos, la concentración de B1 no tuvo un efecto positivo en la L_0 de las plantas del cv. Viola tratadas con NaCl, a través del incremento de la funcionalidad y/o abundancia de PIP, o cualquier cambio en la estabilidad de la membrana plasmática. Esta mayor acumulación de proteínas PIPs en el cv. Viola, en comparación con el cv. Naxos, en los tratamientos con NaCl, podría estar determinada por el hecho de que las reducciones del MSI tras la adición de NaCl son en general menores en el cv. Viola que en el cv. Naxos. Por tanto, las diferencias en la composición lipídica de la membrana plasmática de ambos cultivares, se debe tener en cuenta como un factor que condiciona la modulación del tráfico vesicular y de proteínas en condiciones de estrés salino (Li et al. 2011, Melser et al. 2011). Todos estos hallazgos resaltaron la complejidad de la interacción entre ácido bórico y salinidad y una mayor investigación se requiere para clarificar la contribución y el papel de cada isoforma de acuaporinas, así como su regulación en la respuesta a la interacción de estrés por NaCl y B en los distintos cultivares de brócoli.

Se sabe que el estado nutricional de las plantas afecta en gran medida a la integridad estructural y funcional de las membranas, especialmente en el caso de B y Ca. En este trabajo, la acumulación de B en las raíces y parte aérea de ambos cultivares aumentó en función de la concentración de B en la solución nutritiva, como ocurrió en trabajos previos (Grattan et al. 1997). Además, en los tratamientos

de NaCl+B1 y NaCl+B2, las plantas acumularon menos B en su parte aérea y raíces que con B1 y B2, de acuerdo con resultados anteriores donde las concentraciones de B disminuyeron en las plantas de brócoli sometidas a estrés salino (Ben-Gal y Shani 2002b, Smith et al. 2010b). Se ha postulado que una disminución en la tasa de transpiración con la salinidad puede reducir la absorción pasiva y la difusión de B (Alpaslan y Gunes 2001), o que un efecto combinado sobre la absorción de B y agua (Wimmer et al. 2003, Bastías et al. 2004a) reduciría la concentración de B en la parte aérea. Por lo tanto, la disminución observada en L_0 causada por salinidad tendría consecuencias significativas, con efectos sobre la absorción de ácido bórico por las raíces y su transporte desde la raíz a la parte aérea. Sin embargo, en este trabajo, no hubo diferencias significativas entre la concentración de B en la parte aérea y la raíz de plantas control y plantas tratadas con NaCl, de ambos cultivares, lo que indicó que el transporte mediado por canales de B puede producirse en paralelo a la absorción pasiva dentro de la corriente de transpiración. Además, se sabe que el B juega un papel importante en la estructura de las membranas y en las reacciones asociadas a membrana (Brown et al. 2002). Se ha estudiado que la toxicidad por B no tiene efectos adversos en la membrana plasmática (Eraslan et al. 2007b). De acuerdo con esto, en este trabajo, las plantas tratadas sólo con B mostraron mayor MSI que aquellas tratadas con la combinación de tratamientos NaCl-B, coincidiendo con las mayores concentraciones de B. Se ha estudiado que una cantidad equilibrada de B-Ca mejora los efectos adversos del estrés por salinidad, lo que implica la estabilidad de la pared celular (Bastías et al. 2010, Bonilla y González-Fontes 2011). Por lo tanto, no debe descartarse un posible papel del Ca, sólo o en combinación con B, sobre la pared de la célula o sobre la estructura de la membrana plasmática de las

raíces de las plantas del cv. Naxos tratadas con NaCl+B1, ya que el MSI se recuperó con respecto al tratamiento con NaCl.

Entre ambos cultivares se observaron diferencias en la acumulación de Cl^- y Na^+ . El B afecta a la concentración de Cl^- en los tejidos y viceversa (Yermiyahu et al. 2008, Smith et al. 2010b), lo que sugiere que esta interacción puede ser importante en la comprensión de la relación NaCl-B. En este trabajo, la reducción en la concentración de Cl^- en la parte aérea de las plantas del cv. Naxos tratadas con NaCl+B1, en comparación con el tratamiento con NaCl, podría estar relacionado con la recuperación de la biomasa, mediante la reducción de la absorción de Cl^- en presencia de B. Sin embargo, se encontraron disminuciones similares en el Cl^- en el cv. Naxos en tratamientos con NaCl+B2 - con respecto a la adición de NaCl sólo - y la biomasa de la parte aérea no se restableció, indicando el papel del transporte de agua en la recuperación de la biomasa más que una disminución del Cl^- en la parte aérea. Aunque el cv. Viola acumuló menores concentraciones de Cl^- en la parte aérea, en comparación con el cv. Naxos, en todos los tratamientos salinos, se encontraron cantidades más altas de Na^+ , lo que indicó un efecto tóxico de este ión.

En plantas tratadas con B, no se observaron reducciones de Cl^- con respecto al control, una posible explicación para esto pudo ser que bajo la adición de B, el contenido de Cl^- en la solución Hoagland fue mucho menor que el observado en los tratamientos con NaCl, y por lo tanto, el efecto de B1 y B2 sobre la absorción de Cl^- podría diferir con respecto a los tratamientos con NaCl-B. De hecho, trabajos anteriores mostraron que distintas combinaciones de B y Cl^- en la solución de riego, podrían cambiar la acumulación de Cl^- en la parte aérea de las plantas (Yermiyahu et al. 2008, Smith et al. 2010b).

Finalmente, la formación de compuestos fenólicos es un parámetro clave en relación con la influencia del B en los procesos fisiológicos (Ruiz et al. 1998, Brown et al. 2002, Landi et al. 2012). El contenido de fenoles totales se incrementó significativamente con la salinidad en los dos cultivares de brócoli, un hallazgo similar al observado en muchas especies tales como *Cakile maritima* Scop. (Ksouri et al. 2007), pimiento rojo (Navarro et al. 2006), olivos (Petridis et al. 2012) y *Salvia officinalis* L. (Ben Taârit et al. 2012). El mayor incremento en el cv. Viola podría indicar que este cultivar sintetizó compuestos fenólicos como un mecanismo de adaptación y protección contra la salinidad, en lugar de acumular B como un complejo B-fenoles en las membranas.

Se ha estudiado en muchas especies de plantas herbáceas, el aumento de las concentraciones de compuestos fenólicos en situaciones de deficiencia de boro (Chatterjee et al. 2005); sin embargo, hay poca información disponible sobre sus niveles en condiciones de exceso de B. Ruiz et al. (1998) y Camacho-Cristobal et al. (2002) observaron incrementos en el contenido de compuestos fenólicos en hojas de plantas de tabaco cultivadas tanto en condiciones de deficiencia de B como de toxicidad. En plantas de tomate, la concentración total de compuestos fenólicos y de flavonoides se incrementó significativamente por el tratamiento con 2 mM de B (Cervilla et al. 2012). Sin embargo, en *Citrus* sp., Keles et al. (2004) no encontraron cambios significativos en la concentración de compuestos fenólicos cuando el agua de riego contenía alta concentración de B. Por el contrario, Blevins y Lukaszewski (1998) mostraron una disminución en la cantidad de compuestos fenólicos en diferentes cultivares tratados con alta concentración de B. Por lo tanto, estos resultados - junto con los encontrados en este trabajo - indican una variación considerable en el metabolismo fenólico entre especies, cultivares y tejidos. El efecto

opuesto de los tratamientos con NaCl y B sobre los compuestos fenólicos, se refleja en los tratamientos combinados con NaCl-B, dónde la concentración de fenólicos se mantuvo con respecto al control.

6.5. CONCLUSIONES

En conclusión, se observó una respuesta diferencial a la interacción NaCl-B en los dos cultivares de brócoli. La absorción de ácido bórico a través de la membrana plasmática, por penetración a través de la bicapa lipídica, así como la funcionalidad de las acuaporinas, podrían influir en gran medida en la tolerancia a la salinidad del cv. Naxos en el tratamiento NaCl+B1, a través de los cambios asociados en la conductividad hidráulica de la raíz, más que a través de una menor acumulación de Cl⁻ en la parte aérea. De esta forma, existe un efecto positivo entre la salinidad y la concentración de B1 en el cv. Naxos: una disminución de la toxicidad por NaCl en presencia de B1, lo que permite recuperar el crecimiento, y muestra que este cultivar podría ser regado con aguas salinas combinadas con aguas con moderado contenido en B.

Por el contrario, en el cv. Viola, se observó una mayor expresión de PIP2 en los tratamientos con NaCl-B en comparación al tratamiento con NaCl. Sin embargo, este aumento de BoPIP2 no estuvo asociado con ningún cambio de L₀ con respecto al tratamiento con NaCl, indicando que el umbral de concentración de B difirió entre el cv. Viola y el cv. Naxos. Se observó una disminución de la transpiración y tasa fotosintética en el cv. Viola con respecto al control en el tratamiento con B2, que no ocurrió en el cv. Naxos, por lo que el cv. Viola presentó mayor sensibilidad a este ion, aunque ninguna de las dos concentraciones de B tuvo efectos adversos sobre la

estabilidad de la membrana plasmática. Además, el cv. Viola acumuló menor concentración de Cl^- en la parte aérea en comparación con el cv. Naxos, en todos los tratamientos salinos, pero se encontraron cantidades más altas de Na^+ , lo cual indicó un efecto tóxico de este ion. Se sugiere un posible papel del B, en la pared celular o en la estructura de la membrana plasmática de las raíces de las plantas del cv. Naxos tratadas con $\text{NaCl}+\text{B1}$, ya que el MSI se recuperó con respecto al tratamiento salino. Finalmente, una mayor concentración de compuestos fenólicos en el cv. Viola en todos los tratamientos salinos, indicó el uso de compuestos fenólicos como un mecanismo de adaptación para la protección contra el estrés salino en este cultivar.

CAPÍTULO IV

**EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DEL ELEVADO
CO₂ Y SALINIDAD SOBRE EL METABOLISMO
DEL AZUFRE EN DOS CULTIVARES DE
BRÓCULI (*Brassica oleracea* L.)**

7.1. INTRODUCCIÓN

Los problemas derivados de la salinidad y el continuo aumento de las concentraciones atmosféricas de CO₂, así como la poca información sobre el metabolismo del azufre (S) en fisiología vegetal, incluyendo la respuesta de los glucosinolatos a la elevada concentración de CO₂ atmosférico y salinidad, motivaron el diseño de este experimento, con el fin de determinar el efecto de la interacción entre el CO₂ (ambiental-elevado) y la salinidad en el medio de crecimiento, sobre los parámetros de biomasa, concentración mineral, y contenido de glucosinolatos (totales e individuales) en el brócoli, y estudiar la respuesta de las enzimas del metabolismo del S en la planta, que participan de las rutas de biosíntesis y de degradación de glucosinolatos, así como de los aminoácidos azufrados y el glutatión.

7.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se llevó a cabo con dos cultivares comerciales de brócoli (*Brassica oleracea* L. (Grupo Italica): una variedad verde ‘Naxos’, y una púrpura o ‘Viola’.

La germinación y el cultivo de las plantas de brócoli se realizaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas tal y como se describió en el apartado de Material y Métodos.

Después de 15 días en hidroponía con solución Hoagland y aireación constante (cuando las plantas tuvieron 21 días de edad), las plantas se trataron con 0 mM NaCl (control) y 80 mM NaCl. Además, la mitad de estas plantas fueron tratadas con elevado CO₂ (800 ppm) y la otra mitad con CO₂ ambiental (350 ppm).

Las plantas se recolectaron a los 15 días de tratamiento, aproximadamente cuando tenían 36 días de edad. La recolección y distintas medidas de las plantas se realizaron a mitad del periodo de luz.

Al final del cultivo, se recolectaron las plantas y se determinaron distintos parámetros como la biomasa, el contenido mineral, los glucosinolatos, diferentes actividades enzimáticas, los aminoácidos y el glutatión.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Determinación de la biomasa

En ambos cultivares, tanto en condiciones control como de salinidad, el peso seco fue mayor en las plantas crecidas a elevada concentración de CO₂, con respecto a las plantas crecidas en condiciones ambientales de CO₂ (Figura 7.1).

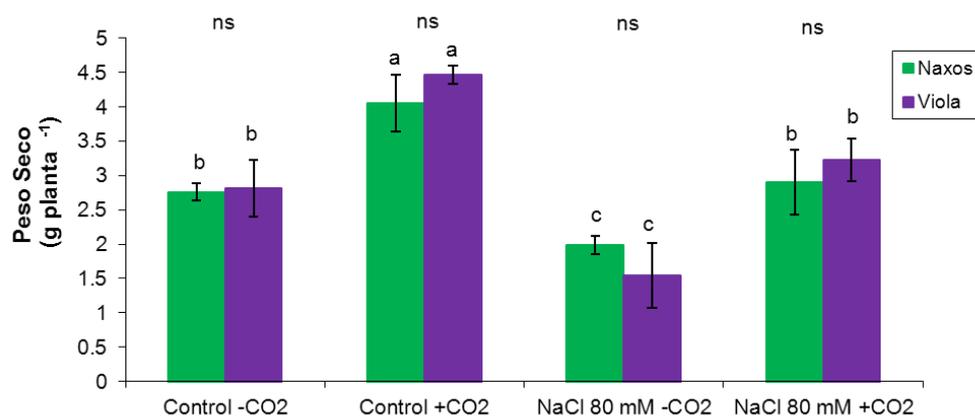


Figura 7.1. Peso seco de la parte aérea de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola), y las plantas tratadas con 80 mM NaCl en condiciones ambientales de CO₂ (350 ppm) y elevado CO₂ (800 ppm) durante 2 semanas. Las barras con diferente letra dentro del mismo cv. son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$, $n = 6$ para cada tratamiento). Se empleó el test de student para mostrar las diferencias entre cultivares (No-significativo ($P > 0.05$, ns); Significativo a $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), y $P < 0.001$ (***)).

Además, la salinidad redujo el peso seco de las plantas, en comparación con las plantas control, tanto en los tratamientos con alta concentración de CO₂ como en los tratamientos con una concentración de CO₂ ambiental. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre cultivares en ningún tratamiento.

7.3.2. Concentración de SO₄²⁻, S total, Na⁺, Cl⁻ y relación C/N y N/S.

En ambos cultivares, el nivel de sulfato (SO₄²⁻) fue mayor en las plantas crecidas con una concentración de CO₂ elevada, en comparación a las plantas crecidas con una concentración de CO₂ ambiental (Tabla 7.1). Por otro lado, la salinidad aumentó la concentración de SO₄²⁻ con respecto al tratamiento control, en ambas condiciones de CO₂. Además, entre cultivares no hubo diferencias significativas en la concentración de SO₄²⁻ en ningún tratamiento.

Tabla 7.1. Concentración de sulfato (SO₄²⁻), azufre (S) total, sodio (Na⁺), cloruro (Cl⁻) (g 100 g⁻¹ PS) y relación C/N y N/S de la parte aérea de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola), y las plantas tratadas con 80 mM NaCl en condiciones ambientales de CO₂ (350 ppm) y elevado CO₂ (800 ppm) durante 2 semanas.

		SO ₄ ²⁻	S total	Na ⁺	Cl ⁻	C/N	N/S
Naxos Parte aérea							
	Control						
	+CO ₂ ^a	0.10±0.01	0.59±0.13	0.03±0.01	0.03±0.01	7.78±0.79	7.69±2.26
	-CO ₂	0.07±0.01	1.08±0.08	0.06±0.01	0.03±0.01	5.41±0.21	5.80±0.32
	Significación	* b	***	**	ns	**	ns
	NaCl						
	+CO ₂	0.17±0.01	0.40±0.04	1.83±0.10	0.13±0.02	8.65±0.80	10.50±0.46
	-CO ₂	0.10±0.01	0.62±0.04	1.67±0.15	0.14±0.02	6.10±0.80	9.72±0.14
	Significación	**	**	ns	ns	**	ns
	+CO ₂ Significación	**	ns	***	**	ns	*
	-CO ₂ Significación	*	***	**	**	ns	*
Viola Parte aérea							
	Control						
	+CO ₂	0.11±0.01	0.51±0.03	0.03±0.01	0.05±0.02	6.04±0.29	10.03±0.13
	-CO ₂	0.07±0.01	0.87±0.04	0.07±0.01	0.03±0.01	5.79±0.07	7.71±0.08
	Significación	**	***	**	ns	*	*
	NaCl						
	+CO ₂	0.15±0.01	0.89±0.06	3.01±0.13	0.17±0.01	8.04±0.54	5.78±0.67
	-CO ₂	0.11±0.01	0.83±0.02	2.08±0.25	0.05±0.01	6.34±0.12	7.11±0.30
	Significación	**	ns	**	***	*	ns
	+CO ₂ Significación	**	***	***	**	ns	**
	-CO ₂ Significación	**	ns	***	*	ns	ns
Genotipo significación							
	Control						
	+CO ₂	ns	ns	ns	ns	*	*
	-CO ₂	ns	ns	ns	ns	ns	*
	NaCl						
	+CO ₂	ns	***	**	*	ns	**
	-CO ₂	ns	**	ns	**	ns	*

^aSignificación en las plantas tratadas con 800 ppm CO₂ (+ CO₂) y las plantas crecidas con condiciones ambientales de CO₂ (-CO₂).

^bSignificación (n= 6) a P < 0.05 de acuerdo al Test de Student, no significativo a P > 0.05 (ns), significativo a P < 0.01 (***) y P < 0.001 (**).

Con respecto a la concentración de azufre (S) total, ésta fue mayor en las plantas crecidas en CO₂ ambiental al compararlas con las crecidas en condiciones de elevado CO₂, en el tratamiento control de ambos cultivares y en el tratamiento salino del cv. Naxos, mientras que la concentración de CO₂ en las plantas del cv. Viola tratadas con salinidad, no tuvo efectos sobre el nivel de S (Tabla 7.1). Por otro lado, la salinidad disminuyó la concentración de S con respecto al control en el cv. Naxos desarrollado en condiciones de CO₂ ambiental, y no tuvo efectos significativos en condiciones de elevado CO₂. En el cv. Viola, la salinidad aumentó la concentración de S en condiciones de elevado CO₂ y no tuvo efectos significativos en condiciones de CO₂ ambiental. Además, la concentración de S mostró diferencias significativas entre cultivares, en ambas condiciones de CO₂ pero sólo en condiciones de estrés salino, donde se observó una mayor concentración en el cv. Viola que en el cv. Naxos.

En condiciones control, para ambos cultivares, la elevada concentración de CO₂ supuso una reducción del contenido en Na⁺, sin embargo este efecto no se observó en condiciones de salinidad en el cv. Naxos, donde no hubo diferencias significativas entre ambas concentraciones de CO₂ y, ésta fue mayor en las plantas tratadas con elevado CO₂ en el cv. Viola, en comparación con las plantas tratadas con CO₂ ambiental. Además, la salinidad incrementó la concentración de Na⁺ en ambos cultivares y a ambas condiciones de CO₂. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre cultivares en ningún tratamiento, excepto en las plantas tratadas con salinidad en condiciones de elevado CO₂, donde el cv. Viola mostró una mayor concentración de Na⁺ que el cv. Naxos.

La concentración de Cl⁻, no mostró diferencias significativas entre las distintas concentraciones de CO₂ en ambos cvs. desarrollados en condiciones

control. Por otra parte, la concentración de Cl^- , fue mayor en las plantas del cv. Viola crecidas con elevado CO_2 y salinidad en comparación con las que crecieron con condiciones de CO_2 ambiental y salinidad. Además, la salinidad incrementó, en ambos cultivares y en ambas concentraciones de CO_2 , el contenido de Cl^- . Por último, las plantas del cv. Viola mostraron una mayor concentración de Cl^- que las del cv. Naxos a concentraciones de CO_2 elevadas y en condiciones de salinidad, mientras que en condiciones ambientales de CO_2 y salinidad, el cv. Naxos mostró una concentración de Cl^- mayor que el cv. Viola.

La relación C/N fue mayor en las plantas tratadas con elevado CO_2 en todos los tratamientos como consecuencia de un incremento en la asimilación de C. Además, en ambos cultivares la salinidad no tuvo efectos significativos sobre la relación C/N. Por otra parte, no hubo diferencias significativas en los valores de C/N entre cultivares excepto en las plantas control crecidas a elevado CO_2 , que mostraron una relación C/N mayor en el cv. Naxos que en el cv. Viola.

El CO_2 no ejerció ningún efecto sobre la relación N/S con la excepción de las plantas control del cv. Viola, que presentaron una mayor relación N/S a elevado CO_2 que a CO_2 ambiental. La salinidad, incrementó la relación N/S en el cv. Naxos, mientras que el estrés salino no influyó en la relación N/S en las plantas del cv. Viola crecidas en condiciones ambientales de CO_2 , y disminuyó la relación N/S en plantas crecidas en condiciones de elevado CO_2 . Finalmente, en todos los casos, hubo diferencias significativas entre cultivares, siendo la relación N/S de las plantas control mayor en el cv. Viola y en el caso de las plantas crecidas con salinidad, la relación N/S fue mayor en el cv. Naxos.

7.3.3. Contenido en glucosinolatos

Los glucosinolatos alifáticos (Glucoiberina (GI) y Glucoerucina (GE)) y los glucosinolatos indólicos (Glucobrasicina (GB), 4-MeO-glucobrasicina (MGB), 4-OH-glucobrasicina (HGB) y Neoglucobrasicina (NGB)) se detectaron en la parte aérea de los cvs. Naxos y Viola. En ambos cultivares y tratamientos (control y salinidad), la concentración total de glucosinolatos fue mayor en condiciones de elevada concentración de CO₂ en comparación a la concentración de CO₂ ambiental (Tabla 7.2). Además, la concentración de glucosinolatos totales fue mayor en plantas tratadas con salinidad en ambas condiciones de CO₂. En general, el cv. Viola tuvo mayor concentración de glucosinolatos que el cv. Naxos, excepto GB que fue mayor en el cv. Naxos en todos los tratamientos y MGB que fue mayor en el cv. Naxos en el tratamiento salino. De forma similar HGB fue menor en el cv. Viola en las plantas crecidas en condiciones de CO₂ ambiental y NGB fue menor en el cv. Viola en las plantas control crecidas en condiciones de elevado CO₂.

Tabla 7.2. Glucosinolatos individuales y totales (mg 100 g⁻¹ PF) de la parte aérea de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola), y las plantas tratadas con 80 mM NaCl en condiciones ambientales de CO₂ (350 ppm) y elevado CO₂ (800 ppm) durante 2 semanas.

Naxos Parte aérea	Glucosinolatos alifáticos					Glucosinolatos indólicos					Total
	GI	GE	GB	MGB	HGB	NGB	HGB	MGB	HGB	NGB	
Control	+CO ₂ ^a	5.47±1.24	0.35±0.06	9.99±1.36	6.65±1.15	0.87±0.21	8.62±1.88	31.96±3.05			
	-CO ₂	0.40±0.01	0.16±0.01	2.91±0.68	1.94±0.09	n.d. ^c	0.78±0.02	6.20±0.65			
	Significación	*** b	**	***	***	ns	**	***			
NaCl	+CO ₂	27.03±7.27	0.76±0.14	21.76±5.31	13.49±0.79	7.90±0.89	10.33±2.75	81.27±11.15			
	-CO ₂	0.50±0.05	0.32±0.02	4.98±0.07	3.44±0.26	4.53±0.47	1.16±0.20	14.93±0.66			
	Significación	*	*	*	**	***	*	**			
+CO ₂ Significación		*	*	*	***	***	ns	**			
-CO ₂ Significación		ns	***	*	***	**	ns	***			
Viola Parte aérea											
Control	+CO ₂	5.82±0.24	0.50±0.08	1.13±0.58	9.20±0.78	2.25±0.87	3.26±1.38	22.16±2.57			
	-CO ₂	2.81±0.86	0.48±0.06	0.17±0.04	6.69±2.38	0.29±0.04	1.79±0.31	9.28±0.73			
	Significación	*	ns	ns	ns	ns	ns	*			
NaCl	+CO ₂	47.48±2.68	3.86±0.93	11.79±1.46	8.14±1.76	10.27±1.31	12.46±2.01	94.01±9.25			
	-CO ₂	9.19±1.06	0.60±0.18	0.21±0.03	2.65±0.71	1.60±0.10	7.54±1.92	21.78±5.44			
	Significación	***	*	***	ns	*	ns	***			
+CO ₂ Significación		***	*	***	***	**	**	***			
-CO ₂ Significación		**	ns	ns	**	*	*	*			
Genotipo significación											
Control	+CO ₂	ns	ns	***	ns	ns	*	*			
	-CO ₂	*	**	*	ns	ns	*	*			
NaCl	+CO ₂	*	*	ns	*	ns	ns	ns			
	-CO ₂	ns	ns	***	ns	***	*	ns			

GI: Glucoiberina, GE: Glucoerucina, GB: Glucobrasicina, MGB: 4-MeO-Glucobrasicina, HGB: 4-OH-Glucobrasicina, NGB: Neoglucobrasicina.

^a Significación en las plantas tratadas con 800 ppm CO₂ (+ CO₂) y las plantas crecidas con condiciones ambientales de CO₂ (-CO₂).

^b Significación (n= 6) a P < 0.05 de acuerdo al Test de Student, no significativo a P > 0.05 (ns), significativo a P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), y P < 0.001 (***).

^c n.d. = no detectado.

Al analizar el efecto individual del CO₂, el cv. Naxos mostró un aumento significativo de todos los glucosinolatos individuales con alta concentración de CO₂, independientemente del tratamiento salino. En el cv. Viola este aumento en los glucosinolatos individuales con elevado CO₂ fue significativo para GI en el 0 mM NaCl y para GI, GE, GB y HGB con 80 mM NaCl.

En el cv. Naxos, no se observaron diferencias significativas en el contenido de NGB entre los tratamientos control y con salinidad, en ambas condiciones de CO₂. De forma similar, se observaron los mismos resultados en condiciones de CO₂ ambiental en el caso de GI, pero no a elevada concentración de CO₂ donde la salinidad aumentó la concentración de GI con respecto al control.

En el cv. Viola no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento salino y el tratamiento control, en los glucosinolatos GE y GB encontrados en condiciones de CO₂ ambiental, mientras que en condiciones de elevado CO₂, así como en la gran mayoría de los glucosinolatos restantes, la concentración de GE y GB fue mayor en las plantas crecidas con salinidad.

7.3.4. Actividades enzimáticas

Los resultados obtenidos con el análisis de las actividades enzimáticas O-acetil-L-serina(tiol)lisa (OAS-TL), serina acetiltransferasa (SAT), ATP sulfurilasa (ATPS), Glutation sintetasa (GluS), γ -Glutamilcisteina sintetasa (γ -ECS) y mirosinasa, se muestra en la Tabla 7.3. En general, todas las actividades enzimáticas aumentaron en las plantas tratadas con 80 mM salvo la mirosinasa que disminuyó con este tratamiento.

Tabla 7.3. Actividades enzimáticas O-acetil-L-serina(tio)lilasa (OAS-TL), serina acetiltransferasa (SAT), ATP sulfurilasa (ATPS), Glutacion sintetasa (GluS), γ -Glutamilcisteina sintetasa (γ -ECS) y mirosinasa, de la parte aérea de las plantas de brócoli Naxos y Viola tratadas con NaCl (0 y 80 mM NaCl) en diferentes condiciones de CO₂ (350 ppm, ambiental; 800 ppm, elevado) durante 2 semanas.

Naxos Parte aérea	OAS-TL	SAT	ATPS	GluS	γ-ECS	Mirosinasa
Control						
+CO ₂ ^a	1.37±0.07	1.90±0.03	2.72±0.18	5.54±0.22	0.24±0.01	0.17±0.001
-CO ₂	0.50±0.03	1.36±0.05	0.15±0.03	4.17±0.29	0.08±0.01	0.20±0.002
Significación	***b	***	***	**	***	***
NaCl						
+CO ₂	4.04±0.14	3.48±0.07	4.39±0.16	6.82±0.12	0.33±0.01	0.08±0.0002
-CO ₂	2.24±0.13	1.96±0.03	1.15±0.11	6.29±0.20	0.17±0.01	0.12±0.002
Significación	***	***	***	*	***	***
+CO ₂ Significación	***	***	***	***	***	***
-CO ₂ Significación	***	***	***	***	***	***
Viola Parte aérea						
Control						
+CO ₂	1.97±0.10	1.91±0.04	5.01±0.09	5.77±0.03	0.09±0.02	0.10±0.001
-CO ₂	0.55±0.04	1.54±0.09	0.15±0.03	3.04±0.55	0.01±0.002	0.23±0.003
Significación	***	**	***	**	**	***
NaCl						
+CO ₂	3.63±0.05	3.31±0.07	5.57±0.22	7.26±0.37	0.26±0.01	0.07±0.003
-CO ₂	0.97±0.11	2.03±0.04	1.19±0.14	5.01±0.10	0.09±0.01	0.14±0.001
Significación	***	***	***	***	***	***
+CO ₂ Significación	***	***	*	*	***	*
-CO ₂ Significación	**	***	***	*	***	***
Genotipo significación						
Control						
+CO ₂	***	ns	***	ns	***	***
-CO ₂	ns	ns	ns	ns	***	*
NaCl						
+CO ₂	*	ns	**	ns	***	ns
-CO ₂	***	ns	ns	***	***	*

OAS-TL: O-acetil-L-serina(tio)lilasa, SAT: serina acetiltransferasa, ATPS: ATP sulfurilasa, GluS: Glutacion sintetasa, γ -ECS: γ -Glutamilcisteina sintetasa. ^aSignificación en las plantas tratadas con 800 ppm CO₂ (+ CO₂) y las plantas crecidas con condiciones ambientales de CO₂ (-CO₂).

Unidades: mmoles de cisteína (para OAS-TL y SAT); Pi (para ATPS, GS y γ -ECS); y sinigrina (para Mirosinasa) mg proteína⁻¹

^bSignificación (n= 6) a P< 0.05 de acuerdo al Test de Student, no significativo a P> 0.05 (ns), significativo a P< 0.05 (*), P< 0.01 (**), y P< 0.001 (***).

Además, la concentración elevada de CO₂ (800 ppm) aumentó el nivel de todas las actividades con respecto al CO₂ ambiental (300 ppm), excluyendo de nuevo, el caso de la actividad mirosinasa. Por otro lado, en condiciones de alta concentración de CO₂, la actividad OAS-TL fue mayor en plantas control del cv. Viola que en plantas control del cv. Naxos. Sin embargo, esta actividad fue mayor en el cv. Naxos en condiciones de salinidad independientemente de la concentración de CO₂. En el caso de la actividad SAT, en ambos tratamientos (control y salinidad), no se observaron diferencias entre cultivares a ambas concentraciones de CO₂. En condiciones de CO₂ ambiental, se encontraron valores similares en el caso de la actividad ATPS entre ambos cultivares, mientras que en condiciones de elevado CO₂, el cv. Viola mostró valores mayores que el cv. Naxos. La actividad GS fue ligeramente mayor en el cv. Naxos que en el cv. Viola en condiciones de CO₂ ambiental, tanto en el tratamiento control como en el salino, pero fue similar en ambos cultivares en condiciones de elevado CO₂. La actividad γ -ECS fue mayor en el cv. Naxos que en el cv. Viola en todos los tratamientos. Por último, la actividad mirosinasa del cv. Naxos fue mayor en plantas control crecidas en condiciones de elevado CO₂ con respecto al cv. Viola, mientras que el cv. Viola mostró una mayor actividad mirosinasa en comparación al cv. Naxos, en ambos tratamientos (control y salinidad) en condiciones de CO₂ ambiental. Sin embargo no hubo diferencias significativas entre la actividad mirosinasa de ambos cultivares tratados con salinidad y a elevada concentración de CO₂.

7.3.5. Concentración de aminoácidos

Los dos aminoácidos con azufre cisteína (Cys) y metionina (Met), el ácido glutámico (Glu), así como el triptófano (Trp) y serina (Ser) se determinaron mediante HPLC (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Concentración de aminoácidos (μM) y glutatión (μmol g⁻¹ PF) de la parte aérea de las plantas de brócoli control (cv. Naxos y Viola), y las plantas tratadas con 80 mM NaCl en condiciones ambientales de CO₂ (350 ppm) y elevado CO₂ (800 ppm) durante 2 semanas.

Naxos Parte aérea		CYS	GLU	MET	TRP	SER	GSH
Control	+CO ₂ ^a	100.62±4.40	166.82±9.79	6.84±0.21	5.58±1.24	5.62±0.85	0.64±0.05
	-CO ₂	58.53±2.15	92.31±2.86	3.63±0.49	0.97±0.40	6.03±1.47	0.50±0.09
	Significación	*** ^b	***	*	*	ns	**
NaCl	+CO ₂	171.96±1.80	357.50±70.44	12.35±1.72	11.72±0.54	3.48±0.62	1.72±0.10
	-CO ₂	106.14±8.39	209.02±27.28	6.23±0.10	4.83±0.23	7.09±0.85	1.03±0.11
	Significación	**	***	*	***	*	**
+CO ₂ Significación		***	***	**	**	ns	**
-CO ₂ Significación		***	***	*	***	ns	**
Viola Parte aérea							
Control	+CO ₂	80.61±0.24	315.11±18.46	20.71±1.93	16.18±0.06	1.44±0.5	0.58±0.03
	-CO ₂	53.07±6.12	113.56±2.15	3.52±1.10	0.52±0.23	1.13±0.47	0.48±0.08
	Significación	**	***	*	***	ns	*
NaCl	+CO ₂	133.12±1.89	429.84±11.48	35.99±3.39	24.70±2.11	2.07±0.40	1.12±0.11
	-CO ₂	92.78±11.13	131.73±24.34	10.30±0.65	5.09±0.25	4.82±0.53	0.91±0.11
	Significación	***	***	**	*	ns	*
+CO ₂ Significación		***	***	*	*	ns	**
-CO ₂ Significación		*	*	*	***	*	**
Genotipo significación							
Control	+CO ₂	*	***	***	*	**	*
	-CO ₂	ns	**	ns	ns	**	ns
NaCl	+CO ₂	***	ns	**	**	*	**
	-CO ₂	ns	ns	**	ns	*	**

CYS: Cisteína, GLU: Acido glutámico, MET: Metionina, TRP: Triptófano, SER: Serina, GSH: Glutathion.

^a Significación en las plantas tratadas con 800 ppm CO₂ (+ CO₂) y las plantas crecidas con condiciones ambientales de CO₂ (-CO₂).

^b Significación (n= 6) a P < 0.05 de acuerdo al Test de Student, no significativo a P > 0.05 (ns), significativo a P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), P < 0.001 (***).

En general, la concentración de aminoácidos fue mayor en plantas tratadas con NaCl con respecto al control, siendo los niveles mayores en plantas crecidas a concentraciones elevadas de CO₂ en comparación con las plantas crecidas a una concentración de CO₂ ambiental, excepto en el caso de la Ser, que no mostró diferencias significativas entre tratamientos, en la mayoría de los casos.

Por otra parte, la concentración de Cys fue mayor en el cv. Naxos que en el cv. Viola, mostrando las diferencias más pronunciadas en condiciones de elevado CO₂. Sin embargo, la concentración de Glu fue mayor en el cv. Viola que en el cv. Naxos, con la excepción de las plantas tratadas con NaCl en condiciones de CO₂ ambiental. De forma similar, la concentración de Met y Trp fue en general mayor en el cv. Viola que en el cv. Naxos. Por otro lado, la concentración de Ser fue mayor en el cv. Naxos que en el cv. Viola en todos los casos.

7.3.6. Contenido de Glutathion (GSH)

Al igual que los aminoácidos, la concentración de GSH en ambos cultivares, fue mayor en plantas crecidas a concentraciones elevadas de CO₂ en comparación con las plantas crecidas a una concentración de CO₂ ambiental (Tabla 7.4). Además, la salinidad aumentó los niveles de GSH con respecto a los tratamientos control. Por último, la concentración de GSH fue mayor en el cv. Naxos en todos los tratamientos, excepto en las plantas control crecidas en condiciones de CO₂ ambientales, cuya concentración de GSH no mostró diferencias entre cultivares.

7.4. DISCUSIÓN

Se sabe muy poco sobre el efecto que la interacción entre una elevada concentración de CO₂ y la salinidad ejerce sobre la concentración de los glucosinolatos y las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo del azufre en los vegetales.

Se ha observado que una concentración elevada de CO₂ puede aliviar los efectos represivos de la salinidad sobre el crecimiento de la planta, a través del aumento en la eficiencia de la fotosíntesis, que produce una mayor acumulación de hidratos de carbono y una mayor productividad (Mavrogianopoulos et al. 1999; Poorter y Navas 2003; Pérez-López et al. 2009, 2010; del Amor 2013). En consonancia con lo anterior, en este trabajo una elevada concentración de CO₂ incrementó la biomasa de la planta tanto en condiciones de estrés salino como en condiciones control y ocasionó una mejoría de los efectos adversos de la salinidad. Sin embargo, aunque se ha descrito la influencia del genotipo en el crecimiento, en condiciones de CO₂ y salinidad en tomate (del Amor 2013) y en plantas de cebada (Pérez-López et al. 2009) no hay datos relacionados con la respuesta de las *Brassicas* a la interacción entre el CO₂ y el estrés salino y, la variación similar de la biomasa en los cvs. Naxos y Viola, encontrada en estas condiciones, puede estar asociada al hecho de que ambos cultivares presentaron una respuesta similar en cuanto a crecimiento en condiciones de salinidad.

Además, la exudación de la raíz, que puede aumentar en las plantas cultivadas en condiciones de enriquecimiento de CO₂ (Norby et al. 1987), podría mejorar la adquisición de nutrientes, especialmente en condiciones de estrés (Uren y Reisenauer 1988; Dakota 2002). Mientras que elevados niveles de CO₂ inhibieron la asimilación

de nitrato en trigo y *Arabidopsis* (Bloom et al. 2012), Robredo et al. (2011) observaron que los valores de N absorbido en plantas de cebada, fueron mayores en condiciones de elevado CO_2 en comparación con los datos observados en condiciones de CO_2 ambiental. En ambos cvs. Naxos y Viola, la concentración total de N foliar se vio afectada por el CO_2 , mientras que en el cv. Viola además, la interacción entre CO_2 y salinidad disminuyó el contenido de N con respecto al control, debido a una mayor reducción en la absorción de NO_3^- (datos no mostrados). Además, el cv. Viola acumuló en el tejido foliar (en condiciones de salinidad) mayor cantidad de Na^+ en condiciones de elevado CO_2 ($3,01 \text{ g } 100\text{g}^{-1}\text{PS}$) que en condiciones de CO_2 ambiental ($2,08 \text{ g } 100\text{g}^{-1}\text{PS}$) o que el cv. Naxos ($1,83$ y $1,67 \text{ g } 100\text{g}^{-1}\text{PS}$ en condiciones de elevado CO_2 y en condiciones ambientales de CO_2 , respectivamente). Se notó así un efecto aditivo de ambas condiciones, NaCl y alta concentración de CO_2 , sobre los niveles de N, y una dependencia del genotipo en la respuesta. De manera similar, se ha estudiado que la cantidad de S se ve afectada por la elevada concentración de CO_2 , ya que el aumento en la síntesis de proteínas, relacionado con el mayor crecimiento en condiciones de elevada concentración de CO_2 (Pérez-López et al. 2009), requiere tanto N como S reducido, en una relación específica (Dijkshoorn y van Wijk 1967). La concentración de SO_4^{2-} se incrementó severamente por la combinación de elevado CO_2 y salinidad. Sin embargo, esto no se reflejó en el contenido total de S, que se vio afectado más por la salinidad que por el CO_2 atmosférico y donde se observó una influencia del genotipo en la respuesta a salinidad con respecto a la asimilación de S. La combinación entre el elevado CO_2 y salinidad, aumentó la concentración de Cys de acuerdo con los mayores niveles de SO_4^{2-} y de glucosinolatos encontrados.

Se sabe que los glucosinolatos podrían verse afectados por el enriquecimiento de CO₂ atmosférico, ya que éste mejora el suministro de carbono de la planta, aumentando la relación C:N (Cotrufo et al. 1998.). En este sentido, Reddy et al. en 2004 demostraron que en hojas de colza (*Brassica rapa* subsp. *oleifera*) la concentración de glucosinolatos indólicos y de gluconasturtina aromática, se incrementaron en una atmósfera enriquecida con CO₂. Schonhof et al. (2007a) observaron que el contenido total de glucosinolatos en brócoli, aumentó a niveles elevados de CO₂, como resultado de un fuerte incremento tanto de glucorafanina (GR) como de glucoiberin (GI). Por el contrario, y de forma simultánea, la concentración de glucosinolatos indólicos disminuyó debido principalmente a la reducción de glucobrasicina (GB) y de 4-MeO-glucobrasicina (MGB). Por otro lado, en *Brassica napus*, la concentración de glucosinolatos indólicos disminuyó tras la exposición a niveles elevados de CO₂ (Himanen et al. 2008; Ahuja et al. 2010a). La concentración de glucosinolatos alifáticos, así como la de los glucosinolatos totales, aumentó significativamente en col china (*Brassica alboglabra* L) mientras que la concentración de glucosinolatos indólicos no se vió afectada, por el incremento del CO₂ atmosférico (La et al. 2009). Hasta donde sabemos, ningún trabajo previo ha estudiado el efecto de la interacción del CO₂ y la salinidad sobre el contenido de glucosinolatos. En este trabajo, el nivel de glucosinolatos totales se incrementó en plantas cultivadas a elevada concentración de CO₂ y NaCl en el cv. Naxos y el cv. Viola, pero no se observaron cambios significativos en la concentración de los glucosinolatos indólicos individuales MGB y NGB, en las plantas del cv. Viola crecidas en condiciones salinas después del enriquecimiento con CO₂. Este hecho indica que la respuesta inducida por la combinación de CO₂ y NaCl es dependiente tanto del genotipo como del glucosinolato individual considerado. En general, el

principal efecto del NaCl sobre la concentración de glucosinolatos, fue más pronunciado en plantas cultivadas en condiciones de elevado CO₂, en comparación con las que crecieron a CO₂ ambiental. Por lo tanto, el efecto aditivo de ambas condiciones, hace que estos cultivares sean de interés para crecer, desde el punto de vista de la salud humana, en ambientes con niveles elevados de CO₂, cuando los suelos o los recursos hídricos para el riego contienen altas concentraciones de sal, ya que su biomasa se mantuvo en niveles similares a las del control. Se ha observado que una disminución de la relación N/S causó un aumento de la síntesis de sulfo-Cys (Hesse et al. 2004), un precursor de Met que está implicado en la síntesis de glucosinolatos alifáticos e indólicos (Mikkelsen et al. 2002). Sin embargo, en este estudio, la relación N/S no predijo los cambios en la concentración de glucosinolatos del brócoli cultivado en condiciones de elevado CO₂. La concentración de S disminuyó con el CO₂, mientras que la concentración de N y la relación N/S no variaron, sugiriendo que los cambios en la concentración de glucosinolatos en las hojas del brócoli en condiciones de elevado CO₂ y salinidad, no fueron causados por modificaciones en la relación N/S. De forma similar, la concentración de glucosinolatos indólicos no se vio afectada por la reducción de la relación N/S en condiciones de elevado CO₂ (Schonhof et al. 2007a; La et al. 2009). Se ha estudiado que una relación N/S adecuada influye en la concentración de glucosinolatos, de manera que, una relación N/S mayor de 10/1 tiende a disminuir la concentración de glucosinolatos (Schonhof et al. 2007a). Así, en colza, el nivel de glucosinolatos fue superior a una relación de N/S por debajo de 10/1 que a relaciones N/S superiores. En nuestras plantas de brócoli, la relación N/S no fue mayor de 10/1 en todos los tratamientos y por tanto, una síntesis adecuada de glucosinolatos se vio favorecida. Sin embargo, el contenido de C aumentó con niveles elevados de CO₂ tanto en

condiciones salinas como no salinas, aumentando la relación C/N, así como el nivel de glucosinolatos. Por lo tanto, la relación C/N podría ser un indicador del cambio de glucosinolatos con el CO₂, pero no de las modificaciones en los niveles de glucosinolatos que produce el tratamiento de NaCl.

El menor incremento que el CO₂ produjo en la concentración de glucosinolatos, en el cv. Viola en condiciones no salinas (2.38 veces) en comparación con el tratamiento salino (4.3 veces) o el inducido en el cv. Naxos (5.15 y 5.45 veces en condiciones no salinas y salinas, respectivamente) podría estar indicando la síntesis de otros compuestos derivados de Met en estas condiciones, en lugar de glucosinolatos, ya que el contenido de Met fue en general mayor en el cv. Viola que en el cv. Naxos. De forma similar, el nivel de Cys fue mayor en el cv. Naxos que en el cv. Viola, y se observó una mayor actividad γ -ECS y una mayor concentración de glutation, especialmente en condiciones de elevado CO₂ y salinidad, indicando que en este cultivar (Naxos), los compuestos azufrados pueden actuar como osmolitos o antioxidantes (Barroso et al. 1999). De hecho, el glutation sintetizado en condiciones de estrés salino se ha correlacionado con la tolerancia a la salinidad (Noctor et al. 1998; Ruiz y Blumwald 2002; Kocsy et al. 2004) y las diferencias que existen en la respuesta a la aclimatación por salinidad, se han descrito anteriormente en estos cultivares. En general, en ambos cultivares, los aminoácidos sintetizados aumentaron con el elevado CO₂ y la salinidad, de acuerdo con trabajos previos (Habash et al. 1995; Romero et al. 2001).

En 2001, Ahmad et al. mostraron que el bajo nivel de ATP sulfurilasa (ATPS) era un indicador del bajo nivel de la asimilación de azufre. En nuestro caso, se encontró un mayor aumento de ATPS en el cv. Viola (34 veces) que en el cv. Naxos (18 veces) por el efecto del elevado CO₂, pero en ambos cultivares el CO₂ favoreció

la asimilación del azufre. Sin embargo, el hecho de que en condiciones salinas, el incremento de la actividad ATPS con CO₂ fuera similar en ambos cultivares, podría indicar que el efecto del elevado CO₂ sobre la asimilación de S, estuvo atenuado por la salinidad en el cv. Viola, comparado con el cv. Naxos, lo cual está en consonancia con los altos niveles de Na⁺ y Cl⁻ que se encontraron en las hojas de este cultivar.

En condiciones de estrés salino, el CO₂ aumentó la actividad OAST en el cv. Viola en mayor medida que en el cv. Naxos. Sin embargo, el hecho de que en estas condiciones, la concentración de Ser fuera mayor en el cv. Naxos que en el cv. Viola, podría asegurar una producción mayor de Cys en el cv. Naxos en comparación con el cv. Viola. El papel del azufre en la tolerancia a la salinidad, se evidencia todavía más, por la regulación de diferentes enzimas de asimilación de S en condiciones de estrés salino. López-Berenguer et al. en 2007 demostraron que las enzimas de asimilación de azufre, aumentaron con el estrés salino. Además, se sabe que la isoforma citosólica más abundante de la OASTL, OAS-A1, está implicada en las respuestas de defensa de *Arabidopsis* contra la salinidad (Domínguez-Solís et al. 2001). El hecho de que el CO₂ aumentara esta actividad enzimática en condiciones de salinidad, podría ser un indicador de los efectos beneficiosos del CO₂ en condiciones de estrés salino.

Finalmente, como es bien sabido, la enzima mirosinasa hidroliza los glucosinolatos a productos como tiocianatos, isotiocianatos y nitrilos (Wielanek y Urbanek 1999). La actividad mirosinasa es susceptible a las condiciones de estrés abiótico como el estrés salino (Kim et al. 2006; Yan y Chen 2007; Yuan et al. 2009). En nuestro estudio, la actividad mirosinasa se inhibió por los tratamientos con elevado CO₂ y salinidad y resultados similares se encontraron en brotes de rábano (Yuan et al. 2010). Sin embargo, una disminución de la disponibilidad en la

hidrólisis de glucosinolatos en condiciones combinadas de elevado CO₂ y salinidad, podría comprometer la respuesta de defensa de la planta contra herbívoros y patógenos, lo cual podría estar compensado por la concentración elevada de glucosinolatos que se encontraron en plantas de brócoli en estas condiciones. De manera que otros estudios sobre la respuesta de la interacción planta-huésped o la interacción planta-herbívoro son necesarios.

7.5. CONCLUSIONES

Para concluir, podemos indicar que ambos cultivares (cv. Naxos y cv. Viola) fueron adecuados para su cultivo en condiciones salinas permitiendo una adecuada asimilación de S que derivó a diferentes niveles de glucosinolatos, con una mayor producción en el cv. Viola que en el cv. Naxos, en consonancia con una mayor concentración de Met en el cv. Viola. En ambos cultivares, el elevado CO₂ provocó un efecto aditivo sobre el metabolismo del S en condiciones de estrés salino y estos cambios, fueron mediados por diferentes enzimas como ATPS, OAST, SAT y γ ECS entre otras. Sin embargo, la salinidad podría estar atenuando el efecto del elevado CO₂ sobre las enzimas del metabolismo del S en el cv. Viola, lo cual se relacionó con una mayor acumulación de Na⁺ y Cl⁻ en sus hojas. El estrés salino produjo un aumento en la concentración de Cys intracelular y la actividad γ -ECS, lo cual explica el metabolismo implicado en la inducción de la acumulación celular de glutathione (Liang et al. 2009). Además, la producción de glutathione fue mayor en el cv. Naxos que en el cv. Viola indicando diferencias en los mecanismos implicados en la respuesta a la salinidad con respecto a la asimilación de S, entre ambos cultivares. La conexión conocida entre la fijación de C y la asimilación de S (Kopriva et al. 1999)

se observó también en este estudio y, el efecto de mejoría que el incremento de CO₂ ejerció en condiciones de estrés salino, favoreció el metabolismo del S de una manera dependiente del genotipo.

CAPÍTULO V

ISOTIOCIANATOS DEL BRÓCULI – CONTENIDO Y DISPONIBILIDAD *IN VITRO* SEGÚN LA VARIEDAD Y EL ORIGEN

8.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio fue caracterizar la producción de isotiocianatos (ITCs) tales como sulforafano (SFN) e iberina (IB) y metabolitos relacionados, procedentes de diferentes fuentes de glucosinolatos (GLSs), por medio de la comparación entre muestras de plantas de brócoli verde y lila/púrpura, con respecto a muestras de procedencia industrial, tanto de brócoli como de *Lepidium sp.* (maca), investigando su composición y disponibilidad *in vitro*, y su bioaccesibilidad y metabolismo.

La determinación de los metabolitos que se originan tras la ingestión del brócoli – en particular, los que proceden de la hidrólisis de los glucosinolatos, los isotiocianatos y sus formas conjugadas – es necesaria en los estudios de prevención de enfermedades crónicas y diferentes tipos de cáncer, y en los que se realiza una intervención, mediante la alimentación complementada o suplementada con brócoli o sus derivados, tanto a nivel de estudios de nutrición como en el medio clínico.

8.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Muestras de brócoli. Para obtener brócoli, se cultivaron variedades comerciales de brócoli (*Brassica oleracea* L. [Grupo Italica]), de inflorescencias verdes y lilas o púrpuras, Naxos y Viola, respectivamente. La germinación y el desarrollo de las plántulas de brócoli se realizaron en una cámara de cultivo con condiciones controladas, según lo descrito en Material y Métodos (Sección 3). A continuación, el experimento se llevó a cabo durante el período de Otoño-Invierno (Noviembre de 2009 hasta Marzo de 2010) en una finca experimental (latitud

38°06'N; 1°02'O) en clima Mediterráneo Semiárido, con condiciones climáticas típicas de la estación de invierno en Murcia, tal y como se detalló en el apartado de Material y Métodos (Sección 3).

En este experimento, se emplearon un total de 10 plantas de brócoli por subcultivar espaciadas entre sí resultando en una densidad de 2 plantas m⁻². Las plantas se recolectaron el día 95 después de transplante (DAT), cuando tenían aproximadamente 120 días de edad (Ver apartado 3.2.1. de la sección de Material y Métodos). La recolección y distintas medidas de las plantas se realizaron a mitad del periodo de luz.

Brotos de brócoli. Los brotes (germinados) de brócoli Naxos y Viola se obtuvieron de semillas prehidratadas y germinadas en bandejas de celulosa durante 8 días en una cámara de cultivo con condiciones controladas, según lo descrito en Material y Métodos (Sección 3). Las muestras de brotes y de semillas procedentes de imbibición se congelaron instantáneamente utilizando nitrógeno líquido, para después almacenarse a -80°C en ultracongelador hasta ser liofilizadas (Christ Alpha 1-4D, Christ, Osterode am Harz, Alemania), y molidas hasta conseguir un polvo fino para su análisis.

Muestras comerciales de brócoli. Se empleó polvo de brócoli procedente de AQP&Ingredients SL (Murcia, España) y de Draco Natural Products, Inc. (San Jose, California, EE.UU.), para poder realizar la comparación entre muestras experimentales y muestras procedentes de procesado industrial.

Fuente alternativa de glucosinolatos: Polvo de maca (Lepidium meyenii L.). Con el fin de utilizar una muestra vegetal con glucosinolatos, pero con ausencia de glucorafanina (GLS parental del sulforafano (SFN), presente en alta proporción en brócoli Naxos) y de glucoiberina (GLS parental de la Iberina (IB), presente en alta

proporción en brócoli púrpura o violeta), se integró en el experimento el polvo comercial de maca (*Lepidium meyenii* Walp), procedente de Lima, Perú, con diferentes muestras comercializadas por productores nativos, denominadas ‘Energy-Mac’ (Naturalsol SAC, Pucusana, Lima, Perú), ‘Harina’ (El oro de los Andes, Alcorcón, Madrid, España) y ‘natural’ (crecimiento local, Lima, Perú).

8.3. RESULTADOS

Glucosinolatos. Se empleó el HPLC-DAD para cuantificar los principales glucosinolatos intactos de las muestras vegetales (*Brassica oleracea* - brócoli, y *Lepidium spp.* - maca) y los resultados se muestran en las Figuras 8.1, 8.2 y 8.3. Los GLS alifáticos (Glucoiberina, Glucoerucina y Progoitrina) y los GLS indólicos (Glucobrasicina, 4-MeO-Glucobrasicina, 4-OH-Glucobrasicina y Neoglucobrasicina) se identificaron y cuantificaron en los extractos de muestras de brócoli y maca, que se han descrito.

Isotiocianatos y formas conjugadas. Las muestras iniciales corresponden al extracto de muestras no-procesadas/digeridas, tomadas antes de la digestión *in vitro* a 37 °C. Los datos recogidos al finalizar la digestión, tanto del interior como del exterior de la membrana de diálisis de celulosa, se analizaron para determinar la presencia de GLS e ITCs en la fracción dializada (permeada) y no-dializada (retenida), respectivamente.

En la Tabla 8.1 se muestran las condiciones MRM optimizadas para el análisis de los metabolitos de los glucosinolatos glucorafanina y glucoiberina, mediante UPLC acoplado a espectrofotómetro de masas con tecnología de triple cuadrupolo (serie UPLC-1290 y un 6460 QqQ-MS/MS; Agilent Technologies,

Waldbronn, Alemania). La hidrólisis de los glucosinolatos a sus productos bioactivos (isotiocianatos) se realizó en condiciones gastrointestinales *in vitro* (Gil-Izquierdo et al. 2002). De esta manera, se estudió la presencia y producción de compuestos parentales y derivados de metabolismo o digestión de estos glucosinolatos (GR, SFN, GIB, IB, y metabolitos conjugados de SFN).

Tabla 8.1. Condiciones MRM optimizadas de para el análisis de los compuestos estudiados y sus metabolitos mediante un espectrofotómetro de masas triple cuádrupolo (ESI+).

Análito	Transición/ Precursor MRM	Fragmentador (V)	CE^b (eV)	Tiempo (min)
GR^a	438/196	90	4	0.8
SFN	178/114	70	4	1.6
SFN-CYS	299/178	115	0	0.9
SFN-NAC	341/178	80	0	2.2
SFN-GSH	485/178	80	0	0.9
GIB	421.9/357.7	100	0	2.2
IB	164/105	90	6	1.4

^aCompuestos analizados: GR: glucorafanina, SFN-GSH: sulforafano-glutation, SFN-Cys: sulforafano-cisteína, SFN-NAC: sulforafano-N-acetilcisteína, SFN: sulforafano, GIB: glucoiberina, IB: iberina.

^bCE: Energía de Colisión.

El cv. Naxos mostró la mayor concentración de glucosinolatos (Figura 8.1) en las muestras de partida no digeridas (iniciales), y una concentración relativamente menor en muestras dializadas, siendo la fracción no-dializada la que presentó los valores más bajos en todos los órganos analizados. En las muestras iniciales (Figura 8.1.A), existieron diferencias cuantitativas entre órganos, así, las semillas y las inflorescencias fueron ricas en alifáticos, mientras que los brotes (germinados) y las hojas presentaron una concentración más baja. Con respecto a los glucosinolatos

indólicos, se observó una mayor retención en las semillas, reserva principal de estos compuestos. Las flores mostraron las concentraciones más bajas, tanto de glucosinolatos indólicos como de glucosinolatos totales.

En las muestras dializadas del cv. Naxos (Figura 8.1.B), se encontraron los valores más altos de GLS alifáticos en las inflorescencias (con una disminución del 26 % respecto a las muestras iniciales) y las concentraciones más bajas en los brotes (con un 20 % de disminución). La concentración más elevada de GLS indólicos se cuantificó en las semillas (con una disminución del 32 %) y la más baja en las flores (con una disminución del 35 %).

En las muestras no-dializadas del cv. Naxos (Figura 8.1.C.), se observó una mayor concentración de glucosinolatos alifáticos e indólicos en los tallos y una menor concentración en las flores (con una disminución del 75 y el 88 %, respectivamente, con respecto a las muestras iniciales).

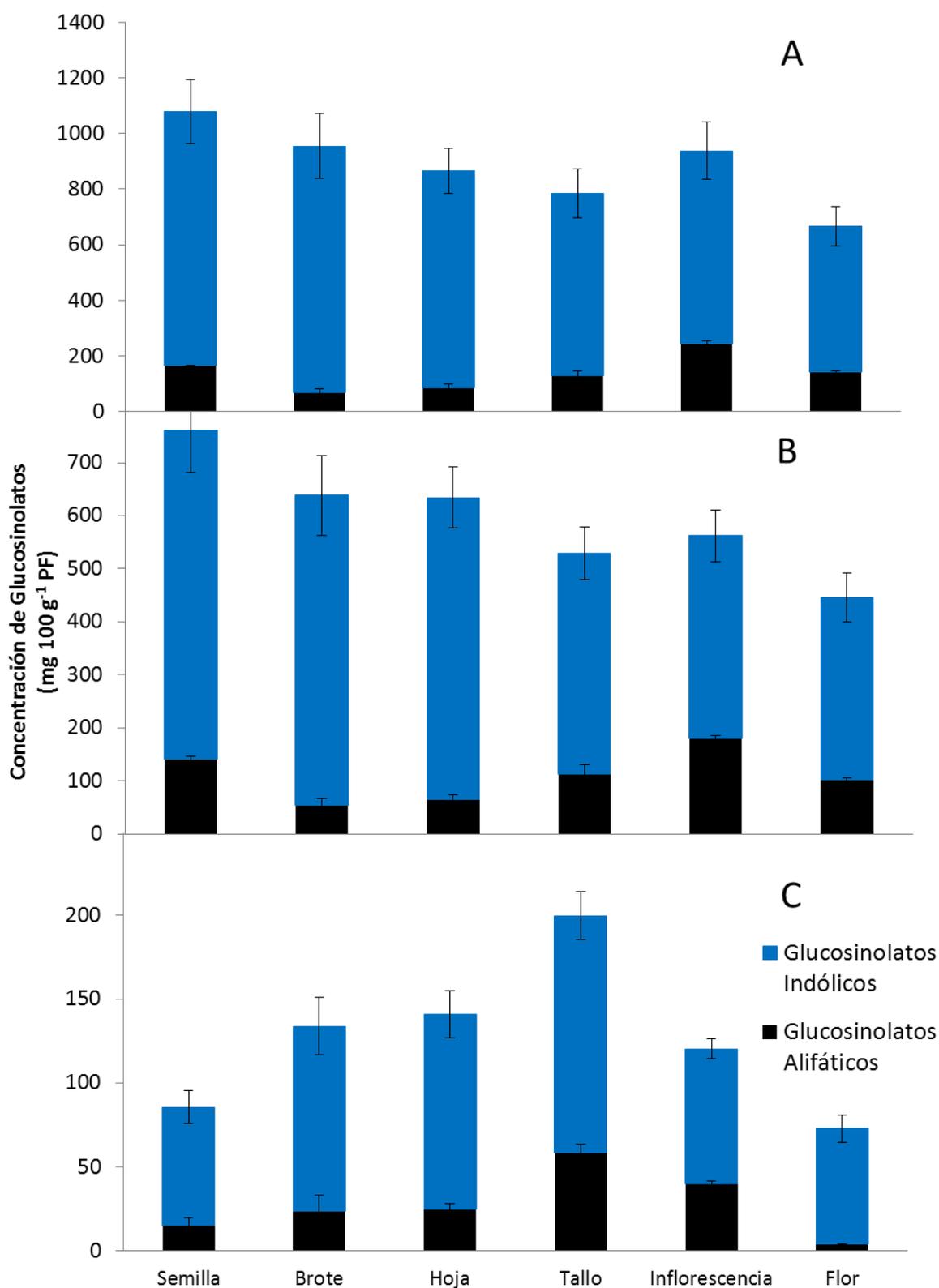


Figura 8.1. Glucosinolatos alifáticos (Glucoiberina, Glucoerucina) e indólicos (Glucobrasicina, 4-MeO-Glucobrasicina, 4-OH-Glucobrasicina, Neoglucobrasicina) (mg 100 g⁻¹ PF) en muestras de brócoli verde del cv. Naxos. Fracción no-digerida (inicial, A), dializada (permeada, B) y no-dializada (retenida, C) de la digestión *in vitro* (n= 4 para cada muestra).

En la Figura 8.2 se muestran los resultados del cv. Viola, y también se encontró una concentración de GLS más elevada en las muestras iniciales, seguida de las muestras dializadas, y finalmente de las muestras no-dializadas. En las muestras iniciales no-digeridas (Figura 8.2.A), la concentración más elevada de GLS alifáticos e indólicos se encontró en las inflorescencias y en los brotes, respectivamente. Además, los tallos presentaron los valores más bajos de GLS.

En las muestras dializadas (Figura 8.2.B), la mayor y menor concentración de glucosinatos alifáticos se mostró en inflorescencias y en brotes (29 y 62 % menos que en las muestras iniciales, respectivamente), mientras que en el caso de los glucosinatos indólicos, se mostró una mayor concentración en las semillas y, las concentraciones más pequeñas se dieron en los tallos (32 y 76 % menos que en las muestras iniciales, respectivamente), de forma similar a lo observado en la concentración de glucosinatos totales.

En las muestras no-dializadas (Figura 8.2.C), la concentración más elevada de GLS alifáticos se observó en los tallos (67 % menos que en las muestras iniciales), y la concentración más pequeña en los brotes (97 % menos que en las muestras iniciales). En el caso de los glucosinatos indólicos, las inflorescencias presentaron los valores más elevados y los tallos los valores más pequeños (76 y 78 % menos que en las muestras iniciales, respectivamente). Además, la concentración más elevada de GLS totales en las muestras no-dializadas, fue la de las inflorescencias (80 % menos que en muestras iniciales) y la concentración más pequeña fue la observada en los brotes (con un 94 % menos que en muestras iniciales).

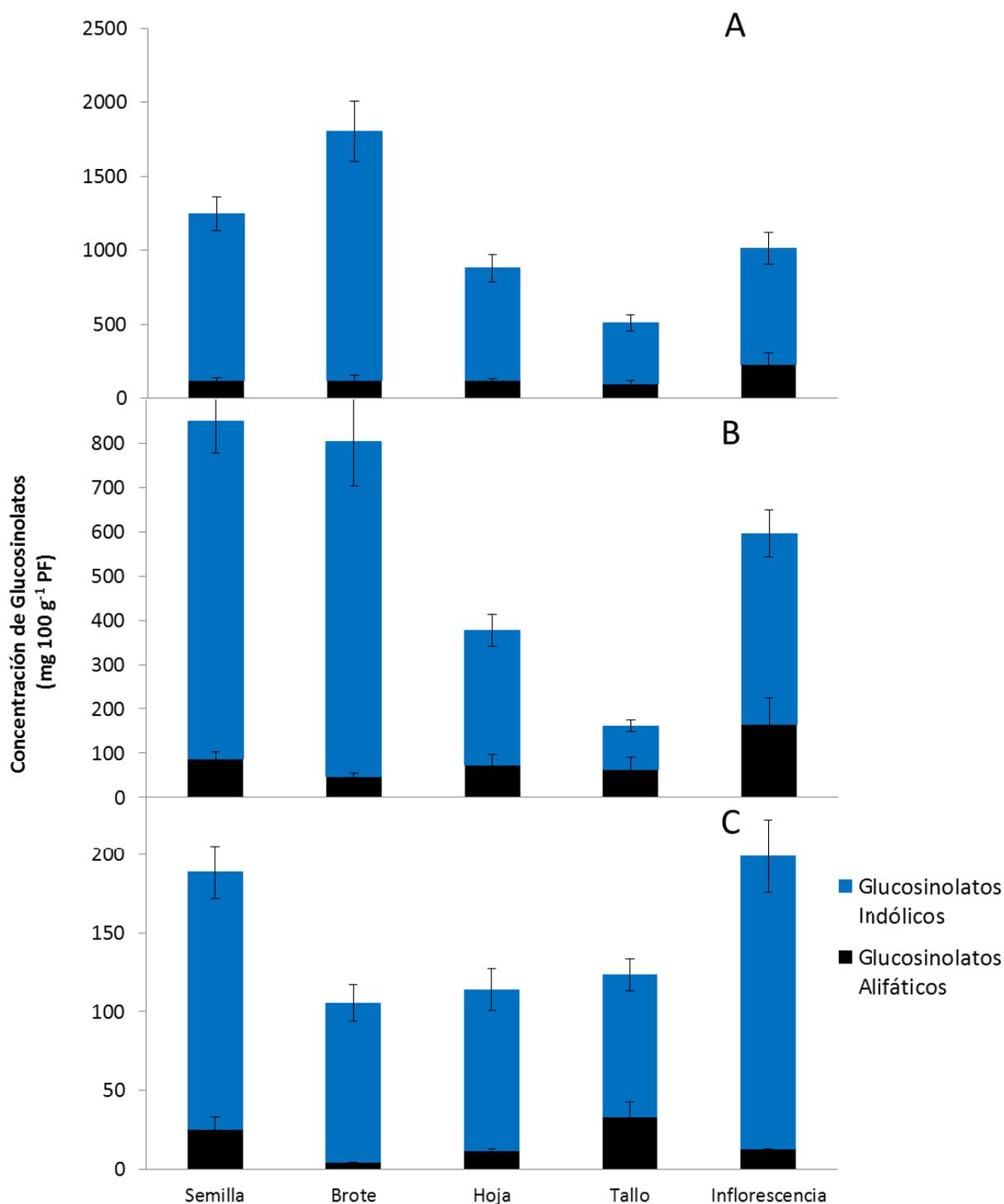


Figura 8.2. Glucosinolatos alifáticos (Glucoiberina, Glucoerucina) e indólicos (Glucobrasicina, 4-MeO-Glucobrasicina, 4-OH-Glucobrasicina, Neoglucobrasicina) (mg 100 g⁻¹ PF) en muestras de brócoli púrpura del cv. Viola. Fracción no-digerida (inicial, A), dializada (permeada, B) y no-dializada (retenida, C) de la digestión in vitro (n= 4 para cada muestra).

En las muestras comerciales (Figura 8.3), se observó una tendencia común, por la que ambas muestras de brócoli presentaban una concentración de GLS mayor en las muestras iniciales, seguidas de las muestras dializadas y las muestras no-dializadas. No obstante, los valores obtenidos en las muestras iniciales, fueron similares entre ambos tipos de muestra comercial (Figura 8.3.A).

En las muestras dializadas (Figura 8.3.B), la concentración de GLS alifáticos fue mayor en las muestras procedentes de AQP&I que en las muestras de Draco, con una reducción del 14 y 48 % respectivamente. En el caso de los GLS indólicos, la reducción fue similar (47 % en AQP&I y 45 % en Draco, con respecto a las concentraciones iniciales).

En las muestras no-dializadas (Figura 8.3.C), la concentración de GLS se redujo fuertemente y, de nuevo, se observó una mayor concentración en las muestras de polvo de brócoli procedente de AQP&I, que en los extractos de Draco (86 y 92 % menos que las muestras iniciales, respectivamente).

En las muestras de maca (*Lepidium sp.*) (Figura 8.3), no se observó ningún glucosinolato indólico, y sólo se encontró el bencil-glucosinolato (glucotropeolina) y sus derivados (hidroxi- y metoxi-benzil-glucotropeolina). Además, hubo una cierta variabilidad entre la concentración de GLS de las diferentes muestras de *Lepidium sp.* tal como sigue: Energy > Harina > Natural. Las muestras dializadas presentaron diferencias por su procedencia (con una disminución del 27 % en Harina, 12 % en Energy y 20 % en maca natural, con respecto a los valores iniciales) así como las muestras no-dializadas (con una disminución del 81 % en Harina, 64 % en Energy y 90 % en maca natural, con respecto a los valores iniciales).

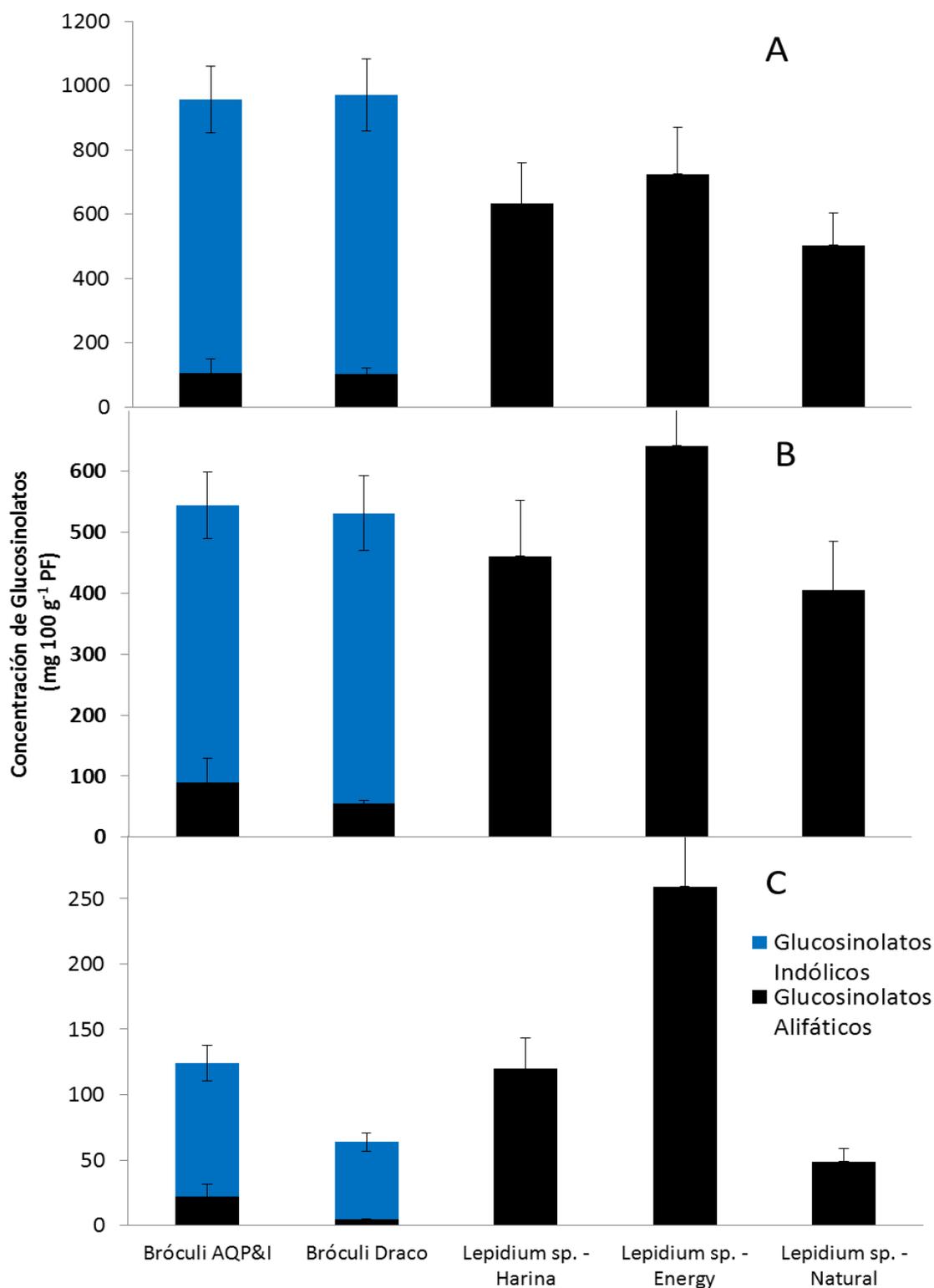


Figura 8.3. Glucosinolatos alifáticos (Glucoiberina, Glucoerucina) e indólicos (Glucobrasicina, 4-MeO-Glucobrasicina, 4-OH-Glucobrasicina, Neoglucobrasicina) (mg 100 g⁻¹ PF) de diferentes muestras comerciales. En el caso de *Lepidium sp.* (harinas de maca), las barras representan el bencil-glucosinolato (glucotropeolina y sus derivados hidroxi- y metoxi-bencil-glucotropeolina). Fracción no-digerida (inicial, A), dializada (permeada, B) y no-dializada (retenida, C) de la digestión *in vitro* (n= 4 para cada muestra).

Cuando se comparan las muestras de los distintos brócolis experimentales y comerciales (Figuras 8.1 a 8.3), destaca Naxos, en las muestras de partida o iniciales, y en la fracción dializada, con la mayor concentración de GLS alifáticos en las semillas y en las inflorescencias, y en las muestras no-dializadas el mayor contenido de GLS se observó en los tallos. En el brócoli Viola, la influencia del órgano fue diferente, con una mayor concentración de GLS alifáticos en las inflorescencias y las semillas, tanto en las muestras iniciales como en las dializadas. No obstante, al igual que en el brócoli verde Naxos, los tallos presentaron los valores más elevados de GLS alifáticos en la fracción no-dializada. Además, las muestras comerciales, tanto las iniciales como las dializadas, mostraron una concentración mucho menor de GLS que las muestras de brócoli experimentales, que no han sufrido un tratamiento térmico a nivel industrial, y por lo tanto preservan mejor su composición, en las condiciones más favorables de liofilización, que son más respetuosas con los fitoquímicos, en general.

Por último, las muestras de *Lepidium Energy*, presentaron, en el caso de las muestras dializadas y no-dializadas, una concentración de GLS totales, mayor a la de las muestras de brócoli comerciales, pero no ocurrió lo mismo en el material no-digerido inicial. No obstante, en las muestras de maca, sólo se detectó la presencia del bencil-GLS bencil (glucotropaeolina), y no se detectó ni glucoiberina, glucoerucina ni glucorafanina, glucosinatos alifáticos con potencial de ejercer un beneficio en la salud con el consumo de brócoli.

Al estudiar los productos de degradación de los glucosinatos, los isotiocianatos, que se analizaron en las muestras iniciales y en las fracciones de material digerido por el procedimiento *in vitro* descrito (Gil-Izquierdo et al. 2002), se empleó la tecnología UPLC-(QQQ)MSⁿ y el análisis simultáneo de sulforafano,

iberina, las formas mercapto-conjugadas del SFN, y los glucosinolatos de partida, glucorafanina y glucoiberina, en la misma inyección (Tabla 8.2). Este procedimiento novedoso supone una ventaja cualitativa en lo que respecta a sensibilidad, capacidad de análisis y reducción en el tiempo de análisis con muestras de matrices complejas como son los alimentos vegetales y sus extractos.

El cv. Naxos mostró en todos los órganos analizados, una concentración de GR mayor en las muestras iniciales, excepto en hojas y flores, dónde no se detectó. En las muestras dializadas, sólo se detectó GR en semillas y, finalmente, en la fracción no-dializada no se detectó GR.

Con respecto a la concentración de SFN, el cv. Naxos mostró en todos los órganos, una tendencia similar: muestra inicial > muestra dializada > muestra no-dializada. Para los metabolitos estudiados, el SFN-CYS se detectó en muestras no-digeridas. Las muestras dializadas y no-dializadas presentaron SFN-CYS en semillas, brotes y flores. Por otro lado, el SFN-NAC, detectado en todos los órganos del cv. Naxos de las muestras iniciales, sólo se detectó en semillas, hojas y flores de las muestras dializadas y, no se detectó en prácticamente ningún órgano, excepto en las flores, de las muestras no-dializadas. El SFN-GSH, se detectó sólo en semillas, brotes y tallos de las muestras iniciales y, sólo se detectó en semillas en las muestras dializadas.

En relación a la GIB, la concentración encontrada en los diferentes órganos, fue mucho mayor en muestras iniciales, salvo en las semillas dónde no se detectó. Los niveles encontrados en las muestras dializadas fueron inferiores y finalmente, los más bajos en las muestras no-dializadas. Por último, el ITC derivado de la GIB, IB se encontró en niveles muy bajos en las muestras no-digeridas iniciales, y detectable pero no cuantificable en las muestras dializadas y no-dializadas.

Tabla 8.2. Glucosinatos (GILS) y sus compuestos hidrolizados, isotiocianatos (ITC, mg 100 g⁻¹ PS) de brócoli (cv. Naxos, cv. Viola y muestras comerciales). Fracción no digerida (inicial), dializada (permeada) y no-dializada (retenida) de la digestión *in vitro*.

Inicial	Naxos										Viola			Muestras comerciales		
	Semilla	Brote	Hoja	Tallo	Infloresc.	Flor	Semilla	Brote	Hoja	Tallo	Infloresc.	AQP&I	Draco			
GR ^a	12.06	6.38	nd	5.41	5.55	nd	11.09	11.23	nd	10.68	5.62	3.26	nd			
SFN	121.82	52.40	5.36	38.01	46.80	28.10	29.34	27.83	3.40	12.08	6.23	1.13	1.22			
SFN - CYS	4.54	2.30	2.26	2.26	2.26	2.28	4.51	4.51	nd	nd	2.25	nd	1.13			
SFN - NAC	4.56	2.30	2.25	2.25	2.26	2.29	4.73	4.72	2.29	4.68	2.34	nd	nd			
SFN - GSH	4.51	2.25	nd	2.25	nd	nd	4.51	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
GIB	nd ^b	30.76	34.33	20.91	38.54	28.92	86.70	97.87	32.42	100.45	36.07	5.31	20.48			
IB	0.07	0.02	0.00	0.00	0.01	0.13	0.96	0.79	0.17	0.60	0.36	0.00	0.00			
Dializada																
GR	10.82	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5.27	nd	nd			
SFN	48.55	19.75	3.36	11.10	12.29	13.88	8.75	13.37	2.84	6.79	4.51	1.13	1.19			
SFN - CYS	4.52	2.26	nd	nd	nd	2.26	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
SFN - NAC	4.51	nd	2.25	nd	nd	2.26	nd	nd	2.26	4.52	2.29	nd	nd			
SFN - GSH	4.51	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
GIB	nd	15.14	28.19	5.96	13.03	19.54	82.69	97.52	18.80	47.07	33.01	4.27	16.48			
IB	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.21	0.04	0.15	0.14	0.00	0.00			
No-dializada																
GR	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
SFN	0.08	4.81	3.16	7.95	3.92	11.62	0.02	0.03	2.73	6.66	4.02	nd	nd			
SFN - CYS	0.01	0.02	nd	nd	nd	0.02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
SFN - NAC	nd	nd	nd	nd	nd	0.02	nd	nd	nd	nd	2.28	nd	nd			
SFN - GSH	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
GIB	nd	3.98	4.20	3.96	4.23	4.25	0.02	0.02	4.16	8.20	4.08	1.99	2.11			
IB	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.13	0.11	0.00	0.00			

^aCompuestos analizados: GR: glucorafanina, SFN: sulforafano, IB: iberina, GIB: glucoiberina, SFN-Cys: sulforafano-cisteína, SFN-NAC: sulforafano-N-acetilcisteína, SFN-GSH: sulforafano-glutathión.
^bnd = no detectado.

En las muestras de brócoli del cv. Viola (Tabla 8.2), todos los extractos de material no-digerido mostraron GR, excepto el caso de las hojas. Además, hubo una gran reducción del contenido de GR en las muestras dializadas, dónde sólo se detectó en inflorescencias. Por otra parte, no se detectó GR en muestras no-dializadas. Con respecto a la concentración de SFN en muestras del cv. Viola no-digeridas, todos los órganos presentaron SFN, en mayor proporción que GR. En las muestras dializadas, el contenido de SFN se redujo y, también se detectó en menor proporción en muestras no-dializadas. Al analizar los metabolitos de SFN en estas muestras del cv. Viola, la concentración de SFN-CYS fue mayor en las muestras iniciales, excepto en hojas y tallos, dónde no se detectó. Las muestras dializadas y no-dializadas no mostraron SFN-CYS. Además, se encontró una situación similar en el caso de SFN-NAC, con baja concentración en muestras iniciales, y sólo detectado en hojas, tallos e inflorescencias de las muestras dializadas y, en inflorescencias de las muestras no-dializadas. El SFN-GSH, se detectó sólo en semillas de muestras no-digeridas del cv. Viola, al igual que en el cv. Naxos.

La concentración de GIB fue mucho mayor en el cv. Viola que en el cv. Naxos, en el caso de las muestras no-digeridas. Por otro lado, se encontró una alta proporción de GIB que atravesó la membrana y fue detectado en la fracción dializada, y sólo una pequeña cantidad de GIB se mantuvo en la fracción no-dializada. En el caso de IB, la concentración fue también mucho mayor en el cv. Viola que en el cv. Naxos y, de nuevo, se detectó una baja proporción en las muestras dializadas y, niveles muy escasos en las muestras no-dializadas.

En muestras de brócoli comerciales, en el caso de los glucosinolatos GR y GIB y, sus respectivos ITCs y metabolitos relacionados (Tabla 8.2), sólo encontramos GR, SFN y GIB en el polvo de brócoli AQP&I, con sólo SFN y GIB en

el extracto dializado. Por otro lado, el polvo de brócoli Draco, presentó baja cantidad de SFN y SFN-CYS, pero mayor nivel de GIB. De forma similar, sólo se detectó SFN y GIB en los extractos dializados y, sólo GIB en los extractos no-dializados.

8.4. DISCUSIÓN

La concentración de glucosinolatos, principalmente glucosinolatos alifáticos, varía ampliamente entre los diferentes estados de desarrollo de la planta, y también entre los diferentes órganos (Rask et al. 2000, Clossais-Besnard y Larher 2006, Padilla et al. 2007). Además, los glucosinolatos alifáticos se regulan claramente por el genotipo; no obstante, el efecto del medio ambiente y la interacción genotipo × medio ambiente, sobre la concentración de glucosinolatos indólicos, parecen ser los principales efectos de esta variación (Francisco et al. 2011). Las diferencias encontradas entre los cultivares de brócoli verde y violeta o entre el brócoli y las muestras de maca, estuvieron de acuerdo con ello. En este sentido, los niveles de glucotropeolina (bencil-glucosinolato) encontrados en las muestras de maca, así como de sus derivados, y la ausencia de otros glucosinolatos alifáticos o indólicos en la muestra, se pueden explicar por los efectos de los tratamientos de procesamiento industrial necesarios para elaborar este material, con unos resultados que concuerdan con otros trabajos previos (Piacente et al. 2002).

Las condiciones climáticas y los factores ecofisiológicos, como la temperatura y la radiación, la humedad relativa y el grado de hidratación, tienen un papel muy relevante en el contenido fitoquímico de las crucíferas en general, y del brócoli en particular (Jeffery et al. 2003, Abercrombie et al. 2005). En este sentido, Brown et al. (2002) evaluaron un subconjunto de 10 variedades de brócoli cultivadas

durante 4 estaciones diferentes lo que permitió determinar la medida en la que el contenido de glucosinolatos varía con el genotipo y con las condiciones del entorno. Así, y al igual que Charron et al. (2005a), encontraron variaciones en el contenido de glucosinolatos en hoja (en col cosechada en primavera y otoño), pero las concentraciones de glucosinolatos totales más elevadas se encontraron en los cultivos que se cosecharon durante los períodos de altas temperaturas y días largos. Además, la mayoría de los brotes o germinados de variedades de brócoli estudiados recientemente, contienen glucorafanina como principal glucosinolato tiofuncional, y su concentración depende del genotipo y de la duración del período de germinación (Charron et al. 2005a, Pérez-Balibrea et al. 2011).

A la hora de estudiar la biodisponibilidad de estos compuestos, cabe señalar que, la digestión simulada es mucho menos compleja que un estudio de alimentación animal ya que existe una gran variedad de factores que podrían afectar a la recuperación *in vivo*, tales como la absorción de glucosinolatos intactos (Bheemreddy y Jeffery 2007). De esta forma, en este trabajo, la digestión simulada con enzimas como la α -amilasa, la pepsina gástrica y la pancreatina intestinal, fueron responsables de las diferencias encontradas en la concentración de glucosinolatos analizados, procedentes de las diferentes etapas de la digestión *in vitro*.

Los actuales métodos para extraer y preparar isotiocianatos de muestras biológicas, son a menudo complicados y requieren mucho tiempo (Conaway et al. 2001). Sin embargo, Domínguez-Perlés et al. (2013) desarrollaron un método cuantitativo, para la determinación directa de los isotiocianatos intactos, de muestras vegetales y biológicas.

Oliviero et al. (2012) mostraron que la degradación de glucosinolatos aumenta con la temperatura. En nuestro caso, hubo una mayor concentración de glucosinolatos en las muestras de material vegetal originales, antes de la digestión *in vitro*.

En este trabajo, la concentración de GIB fue mucho mayor en las muestras del cv. Viola que en el cv. Naxos, en el caso de las muestras no-digeridas, tal y como se esperaba y se había observado en la literatura (Pérez-Balibrea et al. 2011).

Además, se analizaron los GLSs e ITCs en muestras de *Lepidium sp.* (harina de maca comercial). No obstante, debido a que el bencil-GLS (glucotropeolina) y su isotiocianato (BITC), no estuvieron disponibles para el experimento, en el estudio con UPLC-QqQ-MS y, debido a que no se esperaba la presencia de GR (SFN y metabolitos relacionados) y/o GIB (IB), los resultados no se muestran para este parámetro.

Por otro lado, los resultados de GR y GIB y sus productos de hidrólisis, mostraron que el cv. Naxos presentó mayor nivel de ITCs en todas las muestras analizadas. Además, los brócolis comerciales presentaron un nivel muy bajo de ITCs o metabolitos relacionados.

Los glucosinolatos se hidrolizan con la mirosinasa (vegetal, o con actividades de glucosidasa de la flora intestinal) a diferentes tipos de productos de degradación: como tiocianatos, isotiocianatos y nitrilos (Wielanek y Urbanek 1999, Traka y Mithen 2009). En el tracto gastrointestinal, los glucosinolatos son hidrolizados por las bacterias durante la digestión, pero a un ritmo menor que en los sistemas de mirosinasa vegetal (Hayes et al. 2008). Los ITCs absorbidos ejercen su función biológica asociada con la prevención del cáncer (Thornalley y IARC Workgroup 2004), por esta razón, la fracción no-dializada mostró los valores más bajos de

glucosinolatos e ITCs y sus derivados/metabolitos, lo que sugiere que la cantidad de GLS o ITCs descartados fue mínima, mostrando así una alta bioaccesibilidad y liberación de estos compuestos, procedentes del tejido vegetal original, en condiciones gastrointestinales. Además, los resultados obtenidos en la fracción permeada (dializada) indican que la mayor parte de estos compuestos ingeridos, podrían estar preparados para ser absorbidos. Por lo tanto, los ITCs y sus precursores naturales, glucosinolatos, se consumen como parte de una dieta rica en vegetales crucíferas como el brócoli (Shapiro et al. 1998), y así, tanto los glucosinolatos como los ITCs mostraron mayor presencia en las muestras no-digeridas iniciales.

Los ITCs se metabolizan principalmente a través de la ruta del ácido mercaptúrico (Higdon et al. 2007). Se han obtenido recientemente más evidencias de que los metabolitos generados a través de la ruta del ácido mercaptúrico, pueden contribuir a la actividad biológica de los ITCs de la dieta, tales como el SFN (Myzak et al. 2004). Los ITCs pueden medirse en la orina y, sus niveles se correlacionan con la ingesta alimentaria de hortalizas y alimentos de crucíferas (Seow et al. 1998; Cramer et al. 2011). En este sentido, la digestión *in vitro* permitió el análisis de los ITCs en diferentes estados de este proceso, y poniendo de manifiesto la degradación que los ITCs sufren con la digestión.

Cramer et al. (2011) demostraron que la fuente de mirosinasa es relevante para obtener una mejor conversión de GR a SFN. En este experimento, la digestión *in vitro* mostró la hidrólisis de GR a SFN principalmente y/o a derivados de SFN (Tabla 8.2), y cabe señalar que en algunos de los casos, el SFN fue sintetizado *in vitro*, lo que sugiere que las enzimas utilizadas en este modelo estaban implicadas en la formación de SFN y sus conjugados. Por lo tanto, la mirosinasa puede verse favorecida en estas condiciones de digestión *in vitro*. La medida de los metabolitos

del SFN en brócoli, ha sido una herramienta útil para evaluar la exposición humana a SFN, lo que se asocia a la actividad biológica de este fitoquímico para reducir el riesgo de diferentes tipos de cáncer (Shapiro et al. 2006), y para el brócoli verde Naxos, supone la fuente más relevante de las estudiadas, por la mayor cantidad de ITCs y metabolitos producidos (en semillas, brotes e inflorescencias).

Por otra parte, la digestión *in vitro* mostró en el cv. Viola, una concentración alta del glucosinolato GIB, que también se reflejó en un alto nivel de IB. Sin embargo, las muestras de *Lepidium sp.*, no mostraron GLS alifáticos tales como GR o GIB, por esta razón, no se esperaba la formación de ni de SFN ni de IB en las mismas (datos no mostrados).

Los glucosinolatos de la dieta, como precursores de ITCs, siguen siendo fundamentales para la visión actual de cómo una dieta rica en vegetales como *Brassica sp.* está asociada con un menor riesgo de padecer cáncer, especialmente cáncer de pulmón, estómago, boca-faringe, colorectal, próstata y vejiga (Thornalley y IARC Workgroup 2004, Jeffery y Araya 2009).

Desde el punto de vista metodológico, los procedimientos novedosos que se han utilizado en este capítulo mediante la tecnología de UPLC-(3Q)MS, representan una novedosa herramienta sensible y rápida para evaluar la ingesta de GLS y su biodisponibilidad a través del estudio simultáneo de los compuestos originales (con potencial para ejercer un beneficio en el organismo, los GLSs) y los metabolitos bioactivos (ITCs y formas conjugadas) de forma simultánea, con un tiempo de análisis muy corto, y mostrando que la mayoría del SFN estaba conjugado en lugar de libre, corroborando que el metabolismo del SFN tiene lugar en el lumen gastrointestinal durante la absorción (Agrawal et al. 2006).

8.5. CONCLUSIONES

En conclusión, podemos decir que la concentración de ITCs depende del cultivar, el órgano vegetal estudiado y el tipo de procesado de la muestra. Los ITCs y sus precursores naturales los GLSs, se consumen como parte de una dieta rica en vegetales de crucíferas como el brócoli. En este sentido, podríamos decir que el cv. Naxos presenta los mejores resultados de composición, y por lo tanto, mayor potencial para quimiopreención. Además, las muestras experimentales (líoofilizadas) mostraron mayor concentración de ITCs que las muestras comerciales (con procesado térmico).

Nuestro estudio, mostró que la digestión *in vitro* reduce significativamente la concentración de fitoquímicos como glucosinolatos en el brócoli, ya que se hidrolizan a ITCs durante la digestión. De esta forma, se ha mostrado una mayor concentración de GSL e ITCs en los pasos iniciales del proceso de digestión, seguido de las concentraciones encontradas en las muestras dializadas y, finalmente en las muestras no dializadas, lo que muestra una alta bioaccesibilidad y liberación de estos compuestos bajo condiciones gastrointestinales, desde el tejido original del vegetal.

Por otra parte, la identificación y cuantificación de los GLSs que dan lugar a ITCs con potencial para ejercer un beneficio con el consumo de estos alimentos, ayudará en el diseño de intervenciones nutricionales y clínicas para estudios sobre enfermedades crónicas y el cáncer. Por lo tanto, estudiar la biodisponibilidad de estos compuestos en adultos humanos y evaluar su beneficio en diferentes parámetros fisiológicos es una clara y urgente necesidad.

9. CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. Los resultados de la evaluación del desarrollo y la calidad nutricional del brócoli púrpura, revelan que este tipo de brócoli es de gran interés en comparación con los brócolis verdes tradicionales o incluso comparado con otros brócolis púrpuras, crecidos bajo diferentes condiciones climáticas. Las variedades más tempranas (EEP y EP) del brócoli púrpura, se han adaptado a las condiciones de invierno de la Región Murciana por lo que interesa su estudio a largo plazo para su implantación comercial.
2. La identificación y cuantificación de los compuestos bioactivos del brócoli púrpura o variedad 'Viola', que incluye su contenido en glucosinolatos y compuestos fenólicos (flavonoles, ácidos fenólicos y antocianinas), favorecerá una mayor demanda de esta hortaliza para el consumo y la industria alimentaria, como fuente de ingredientes saludables, pigmentos naturales, y un alto valor añadido por sus características antioxidantes. Sin duda, abre nuevas oportunidades para su uso en aplicaciones industriales.
3. En el estudio de la adaptación del cultivo de brócoli a las condiciones adversas de riego con aguas de baja calidad (exceso de NaCl y B), se observó que la variedad de nueva introducción, 'Viola', era más sensible a los niveles de B presentes en el medio. Sin embargo, en la variedad verde 'Naxos', se observó un efecto positivo de los niveles moderados de B, cuando hay condiciones de salinidad, que disminuyen sus efectos nocivos,

a través de una recuperación en la biomasa, y los parámetros hídricos como la conductancia hidráulica de las raíces y la estabilidad de la membrana plasmática, lo que fue indicativo de que esta variedad, de interés para su cultivo en invierno y primavera, puede regarse con agua procedente de desalinización, en la que confluyen dos condiciones de estrés, como son la alta salinidad y la presencia de concentraciones elevadas de B.

4. En el estudio de los efectos de la interacción entre una elevada concentración de CO₂ en el ambiente, con la aplicación de salinidad en el medio de crecimiento, se observaron diferencias en los mecanismos de respuesta a estrés en las variedades de brócoli Naxos y Viola, con respecto a la asimilación de S. En ambos cultivares, el elevado CO₂ provocó un efecto aditivo sobre el metabolismo del S en condiciones de estrés salino y estos cambios, fueron mediados por diferentes enzimas como ATPS, OAST, SAT y γ ECS entre otras. Sin embargo, la salinidad podría estar atenuando el efecto del elevado CO₂ sobre las enzimas del metabolismo del S en el cv. Viola, lo cual se relacionó con una mayor acumulación de Na⁺ y Cl⁻ en sus hojas. Además, el estrés salino aumentó el contenido intracelular de Cys y γ -ECS, lo que explica el mecanismo implicado en la inducción de la acumulación celular de glutatión y su mayor producción en el cv. Naxos, indicando diferencias en los mecanismos implicados en respuesta a salinidad con respecto a la asimilación de S entre ambos cultivares.

5. La evaluación del posible beneficio para la salud del consumo de brócoli, pasa por establecer la biodisponibilidad de sus constituyentes y/o accesibilidad de los mismos. Para tal fin, se realizó un experimento *in vitro* con un modelo de digestión gástrica en el que poder estudiar el comportamiento de los glucosinolatos en el brócoli, y como se hidrolizaban a ITCs durante dicha digestión. Se puso de manifiesto como en la fase inicial de la digestión, aún permanecen altos niveles de GSLs. En las membranas de diálisis se observó una reducción importante en la presencia de estos compuestos y la producción de ITCs, y por último, en las muestras no dializadas en las que prácticamente no se detectaron niveles cuantificables de ITCs. Estos resultados, *in vitro*, demostraron una alta bioaccesibilidad y liberación de estos compuestos bajo condiciones gastrointestinales, desde el tejido original del vegetal. Además, de la comparación entre diferentes muestras ricas en glucosinolatos, se pudo constatar que las muestras experimentales (liofilizadas) producían mayor concentración de ITCs que las muestras de origen comercial (en las que se emplean procesados térmicos que inducen a degradación de estos compuestos).

6. El brócoli púrpura de nueva introducción, y en especial las variedades de desarrollo temprano, se adaptan perfectamente al clima del sureste español y resultan de gran interés para su estudio, debido a su alta calidad nutricional, en comparación con el brócoli verde tradicional. Además, aunque el brócoli púrpura es más sensible que el brócoli verde, al cultivo con agua de baja calidad, se desarrolla correctamente y permite su cultivo

en estas condiciones de estrés, así como en condiciones elevadas de CO₂ debido al inminente cambio climático, lo cual resultó en una mayor concentración de compuestos bioactivos en este brócoli de color púrpura.

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abercrombie JM, Farnham MW, Rushing JW.** 2005. Genetic combining ability of glucoraphanin level and other horticultural traits of broccoli. *Euphytica* 143: 145-151.
- Acevedo E, Silva P, Silva H.** 1999. Wheat production in mediterranean environments. En: *Wheat ecology and physiology of yield determination*, E. H. Satorre, G. A. Slafer, eds (The Haworth Press, New York, New York, USA), pp. 295-331.
- Agrawal S, Winnik B, Buckley B, Mi L, Chung FL, Cook TJ.** 2006. Simultaneous determination of sulforaphane and its major metabolites from biological matrices with liquid chromatography–tandem mass spectroscopy. *Journal of Chromatography B* 840 (2): 99-107.
- Ahmad A, Khan I, Abdin MZ.** 2001. Interactive effect of sulfur and nitrogen on N-assimilation and nitrogen harvest of rapeseed mustard. *Indian Journal of Plant Physiology* 6: 46-52.
- Ahmad P, Umar S.** 2011. *Oxidative stress: role of antioxidants in plants*. New Delhi: Studium Press Pvt. Ltd.
- Ahuja I, de Vos RCH, Bones AM, Hall RD.** 2010a. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* 15: 664-674.
- Alia M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L.** 2006. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212: 110-118.
- Al-Maskri A, Al-Kharusi L, Al-Miqbali H, Khan MM.** 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film

technique. *International Journal of Agriculture and Biology* 12 (3): 377-380.

Alpaslan M, Gunes A. 2001. Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant and Soil* 236: 123-128.

Ames BM, Shigena MK, Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 7915-7922.

Andersen ØM. 2001. Anthocyanins. In: *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

Anderson JW. 1981. Light-energy-dependent processes other than CO₂ assimilation. En: *The Biochemistry of Plants* vol. 8. Photosynthesis. Academic Press, Inc. New York, pp. 473-500.

Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. 2005. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neuroscience* 8 (2): 111-120.

Aquea F, Federici F, Moscoso C, Vega A, Jullian P, Haseloff J, Arce-Johnson P. 2012. A molecular framework for the inhibition of *Arabidopsis* root growth in response to boron toxicity. *Plant, Cell & Environment* 35: 719-734.

Ashraf M. 2001. Relationships between growth and gas exchange characteristics in some salt-tolerance amphidiploid *Brassica* species in relation to their diploid parents. *Environmental and Experimental Botany* 45: 155-163.

Ashraf M. 2002. Salt tolerance of cotton: Some new advances. *Critical Reviews in Plant Science* 21: 1-30.

Azaizeh H, Steudle E. 1991. Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiology* 97 (3): 1136-1145.

- Azaizeh H, Gunse B, Steudle E.** 1992. Effects of NaCl and CaCl₂ on water transport across root cells of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiology* 99: 886-894.
- Baenas N, Moreno DA, García-Viguera C.** 2012. Selecting sprouts of brassicaceae for optimum phytochemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 11409-11420.
- Baiges I, Schöffner AR, Affenzeller MJ, Mas A.** 2002. Plant aquaporins. *Plant Physiology* 115: 175-182.
- Bak S, Tax FE, Feldmann KA, Galbraith DW, Feyereisen R.** 2001. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 101-111.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S.** 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99 (1): 191-203.
- Bañuelos GS, Pasakdee S, Finley JW.** 2003. Growth-response and selenium and boron distribution in broccoli varieties irrigated with poor quality water. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 26: 2537-2549.
- Barroso C, Romero LC, Cejudo FJ, Vega JM, Gotor C.** 1999. Salt specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(ly)ase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 40: 729-736.
- Bastías E, Fernández-García N, Carvajal M.** 2004a. Aquaporin functionality in roots of *Zea mays* in relation to the interactive effects of boron and salinity. *Plant Biology* 6: 415-421.

Bastías E, Alcaraz-López C, Bonilla I, Martínez-Ballesta MC, Bolaños L, Carvajal M. 2010. Interactions between salinity and boron toxicity in tomato plants involve apoplastic calcium. *Journal of Plant Physiology* 167: 54-60.

Beckman CH. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 101-110.

Belitz, Grosch. 1988. *Química de los alimentos*. Ed. Acribia, España: Zaragoza.

Ben Taârit M, Msaada K, Hosni K, Marzouk B. 2012. Physiological changes, phenolic content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. grown under saline conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 1614-1619.

Benabdellah K, Ruíz-Lozano JM, Aroca R. 2009. Hydrogen peroxide effects on root hydraulic properties and plasma membrane aquaporin regulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Molecular Biology* 70: 647-661.

Benavides A. 1998. *El azufre en las plantas*. Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México DF.

Ben-Gal A, Shani U. 2002b. Yield, transpiration and growth of tomatoes under combined excess boron and salinity stress. *Plant and Soil* 247: 211-221.

Bheemreddy RM, Jeffery EH. 2007. The metabolic fate of purified glucoraphanin in F344 rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2861-2866.

Björkman M, Klingen I, Birch ANE, Bones AM, Bruce TJA, Johansen TJ, Meadow R, Molmann J, Seljasen R, Smart LE, Stewart D. 2011. Phytochemicals of *Brassicaceae* in plant protection and human health – Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry* 72: 538-556.

Blevins DG, Lukaszewski KM. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 481-500.

- Bloom AJ, Rubio-Asensio JS, Randall L, Rachmilevitch S, Cousins AB, Carlisle EA.** 2012. CO₂ enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C₃ but not C₄ plants and slows growth under nitrate in C₃ plants. *Ecological society of America* 93 (2): 355-367.
- Blum A, Munns R, Passioura JB, Turner NC.** 1996. Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: how to interpret osmotic relations?. *Plant Physiology* 110: 1051-1053.
- Boem FHG, Prystupa P, Ferraris G.** 2007. Seed number and yield determination in sulfur deficient soybean crops. *Journal of Plant Nutrition* 30 (1): 93-104.
- Bones AM, Rossiter JT.** 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum* 97: 194-208.
- Bonilla I, El-Hamdaoui AR, Bolaños L.** 2004. Boron and calcium increase *Pisum sativum* seed germination and seedling development under salt stress. *Plant and Soil* 267: 97-107.
- Bonilla I, González-Fontes A.** 2011. Salt stress in vascular plants and its interaction with boron toxicity. En: *Plants and environment*, H. K. N. Vasanthaiah, D. Kambiranda, eds (InTech: Rijeka, Croatia), pp. 227-240.
- Borkowski T, Szymusiak H, Gliszczynska-Swiglo A, Tyrakowska B.** 2005. The effect of 3-Obeta-glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. *Food Research International* 38: 1031-1037.
- Boudet AM.** 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68 (22-24): 2722-2735.
- Bravo L.** 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56 (11): 317-333.

Brown AF, Yousef GG, Jeffery EH, Klein BP, Wallig MA, Kushad MM, Juvik JA. 2002. Glucosinolate profiles in broccoli: Variation in levels and implications in breeding for cancer chemoprotection. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127 (5): 807-813.

Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, Pfeffer H, Dannel F, Römheld V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology* 4: 205-223.

Buchner P, Takahashi H, Hawkesford MJ. 2004. Plant sulphate transporters: coordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany* 55: 1765-1773.

Bumgarner NR, Scheerens JC, Mullen RW, Ling PP, Kleinhenz MD. 2012. Root-zone temperature and nitrogen affect the yield and secondary metabolite concentration of fall- and spring-grown, high-density leaf lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 116-124.

Cabañero FJ, Martínez V, Carvajal M. 2004. Does calcium determine water uptake under saline conditions in pepper plants, or is it water flux which determines calcium uptake?. *Plant Science* 166: 443-450.

Camacho-Cristóbal JJ, Anzellotti D, González-Fontes A. 2002. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 997-1002.

Carbo MR, Taylor NL, Giles L, Busquets S, Finnegan PM, Day DA, Lambers H, Medrano H, Berry JA, Flexas J. 2005. Effects of Water Stress on Respiration in Soybean Leaves. *Plant Physiology* 139 (1): 466-473.

Cartea ME, Velasco P, Obregón S, Padilla G, de Haro A. 2008. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* 69 (2): 403-410.

- Carvajal M, Cooke DT, Clarkson DT.** 1996. Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta* 199: 372-381.
- Casado-Vela J, Muries B, Carvajal M, Iloro I, Elortza F, Martínez-Ballesta MC.** 2010. Analysis of root plasma membrane aquaporins from *Brassica oleracea*: post-translational modifications, de novo sequencing and detection of isoforms by high resolution mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 9: 3479-3494.
- Cervilla LM, Blasco B, Rios JJ, Rosales MA, Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi MM, Romero L, Ruiz JM.** 2012. Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *Journal of Botany* 2012: 17 pages. Article ID 726206, doi:10.1155/2012/726206.
- Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zevallos L.** 2004. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry* 86 (1): 69-77.
- Chalker-Scott L.** 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70: 1-9.
- Charron CS, Sams CE.** 2004. Glucosinolate content and myrosinase activity in rapid-cycling *Brassica oleracea* grown in a controlled environment. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129 (3): 321-330.
- Charron CS, Saxton AM, Sams CE.** 2005a. Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate-myrosinase system. Glucosinolate content in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 671-681.

- Chatterjee C, Sinha P, Dube BK.** 2005. Biochemical changes, yield and quality of gram under boron stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36: 1763-1771.
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ.** 2005. Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell* 97: 749-764.
- Chaux FC, Foury C.** 1994. *Productions legumieres*, vol. III. Lavoisier, tec-doc, Paris.
- Cheng A, van Hoek AN, Yeager M, Verkman AS, Mitra AK.** 1997. Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature* 387: 627-630.
- Chesson A, Russell WR, Provan GJ.** 1997. Metabolites of the phenylpropanoid pathway - common origin, common properties. En: *Polyphenols in foods*, A. Chesson, WR. Russell, GJ. Provan, ed (Luxembourg: Office for Official Publications of the European Community), pp. 17-23.
- Chung K-T, Wong TY, Wei C-I, Huang Y-W, Lin Y.** 1998. Tannins and human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38 (6): 421-464.
- Ciska E, Martyniak-Przybyszewska B, Kozłowska H.** 2000. Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18 (48): 2862-2867.
- Clarke DB.** 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods* 2: 310-325.
- Clifford M.** 1999. Review chlorogenic acids and other cinnamates— nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 362-372.

- Clossais-Besnard N, Larher F.** 2006. Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 56 (1): 25-38.
- Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B.** 1998. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase. *The Plant Journal* 16: 73-78.
- Conaway CC, Krzeminski J, Amin S, Chung FL.** 2001. Decomposition rates of isothiocyanate conjugates determine their activity as inhibitors of cytochrome p450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* 14: 1170-1176.
- Coolong TW, Randle WM, Toler HD.** 2004. Zinc availability in hydroponic culture influences glucosinolate concentrations in *Brassica rapa*. *Hortscience* 39: 84-86.
- Cotrufo MF, Ineson P, Scott A.** 1998. Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biology* 4: 43-54.
- Cramer JM, Terán-García M, Jeffery EH.** 2011. Enhancing sulforaphane absorption and excretion in healthy men through the combined consumption of fresh broccoli sprouts and a glucoraphanin-rich powder. *British Journal of Nutrition* 13: 1-6.
- da Silva EC, Nogueira RJMC, Araújo FPD, de Meloc NF, de Azevedo AD.** 2008. Physiological responses to salt stress in young umbu plants. *Environmental and Experimental Botany* 63: 147-157.
- Dakota FD, Phillips DA.** 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245: 35-47.
- de Souza AP, Gaspar M, Da Silva EA, Ulian EC, Waclawovsky AJ, Nishiyama MY, Santos RV, Teixeira MM, Souza GM, Buckeridge MS.** 2008. Elevated CO₂

increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell & Environment* 31 (8): 1116-1127.

del Amor FM, Cuadra-Crespo P. 2011. Alleviation of salinity stress in broccoli using foliar urea or methyl-jasmonate: analysis of growth, gas exchange, and isotope composition. *Plant Growth Regulation* 63 (1): 55-62.

del Amor FM. 2013. Variation in the leaf $\delta^{13}\text{C}$ is correlated with salinity tolerance under elevated CO_2 concentration. *Journal of Plant Physiology* 170 (3): 283-290.

del Mondragón-Portocarrero AC, Pena-Martínez B, Fernández-Fernández E, Romero-Rodríguez A, Vázquez-Oderiz L. 2006. Effects of different pre-freezing blanching procedures on the physicochemical properties of *Brassica rapa* leaves (Turnip Greens, Grelós). *International Journal of Food Science & Technology* 41: 1067-1072.

D'Hooghe P, Escamez S, Trouverie J, Avice JC. 2013. Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms. *BMC Plant Biology* 13 (23): DOI: 10.1186/1471-2229-13-23.

Díaz FJ, Grattan SR. 2009. Performance of tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum* cv. 'Jose') irrigated with saline-high boron drainage water: implications on ruminant mineral nutrition. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 131: 128-136.

Dijkshoorn W, Van Wijk AL. 1967. The sulphur requirements of plants as evidenced by the sulphur-nitrogen ratio in the organic matter a review of published data. *Plant and Soil* 26: 129-157.

Diksha D, Awasthi CP. 2009. Quality components in broccoli heads harvested at different stages of maturity. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry* 22 (1): 45-50.

- Domínguez-Perles R, Martínez-Ballesta MC, Carvajal M, García-Viguera C, Moreno DA.** 2010. Broccoli-derives by products: a promising source of bioactive ingredients. *Journal of Food Science* 75: C383-C392.
- Domínguez-Perlés R, Medina S, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil-Izquierdo A.** 2013. Bioavailability of glucosinolates from ½ and 1 servings of broccoli sprout by a new UHPLC/MS/MS method. *Food Chemistry*. Aceptado.
- Domínguez-Solís JR, Gutiérrez-Alcalá G, Vega JM, Romero LC, Gotor C.** 2001. The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 9297-9302.
- Dordas C, Chrispeels MJ, Brown PH.** 2000. Permeability and channel mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiology* 124: 1349-1361.
- Drabent R, Pliszka B, Olszewska T.** 1999. Fluorescence properties of plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of anthocyanins in *Brassica oleracea* L. extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 50: 53-58.
- Dufault RJ.** 1996. Dynamic relationships between field temperatures and broccoli head quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121 (4): 705-710.
- Dufault RJ.** 1997. Transplant production and performance: effect of transplant nutrition. *Proceedings of the national symposium on stand establishment*. Columbus, Ohio. *Oardc Hortic Crop Sci Ser* 668: 40-62.
- Duthie SJ, Jenkinson AMcE, Crozier A, Mullen W, Pirie L, Kyle J, Yap LS, Christen P, Duthie GG.** 2006. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy

human volunteers. *European Journal of Nutrition* 45: 113-22.

Edelstein M, Ben-Hur M, Cohen R, Burger Y, Ravina I. 2005. Boron and salinity effects on grafted and non-grafted melon plants. *Plant and Soil* 269: 273-284.

El-Motaium R, Hu H, Brown PH. 1994. The relative tolerance of six prunus rootstocks to boron and salinity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119 (6): 1169-1175.

Engelen-Eigles G, Holden G, Cohen JD, Gardner G. 2006. The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 328-334.

Eraslan F, Inal A, Gunes A, Alpaslan M. 2007a. Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 113: 120-128.

Eraslan F, Inal A, Savasturk O, Gunes A. 2007b. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 114: 5-10.

Eraslan F, Inal A, Pilbeam DJ, Gunes A. 2008. Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regulation* 55: 207-219.

Fahey JW, Zalcman AT, Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56 (1): 5-51.

Fang Z, Zhang M, Wang L. 2007. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). *Food Chemistry* 100 (2): 845-852.

- Faville MJ, Silvester WB, Green TGA, Jermyn WA.** 1999. Photosynthetic characteristics of three asparagus cultivars differing in yield. *Crop Science* 39 (4): 1070-1077.
- Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ.** 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 18: 123-201.
- Ferreyra RE, Aljara AU, Ruiz RS, Rojas LP, Oster JD.** 1997. Behavior of 42 crop species grown in saline soils with high boron concentrations. *Agricultural Water Management* 34: 111-124.
- Finley JW, Ip C, Lisk DJ, Davis CD, Hintze KJ, Whanger PD.** 2001. Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2679-2683.
- Finley JW.** 2005. Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Annals of Botany* 95 (7): 1075-1096.
- Fitzpatrick KL, Reid RJ.** 2009. The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots. *Plant, Cell & Environment* 32: 1357-1365.
- Franceschi VR, Krokene P, Christiansen E, Krekling T.** 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* 167: 353-376.
- Francisco M, Velasco P, Moreno DA, García-Viguera C, Cartea ME.** 2010. Cooking methods of *Brassica rapa* affect the preservation of glucosinolates, phenolics and vitamin C. *Food Research International* 43 (5): 1455-1463.

Francisco M, Cartea ME, Soengas P, Velasco P. 2011. Effect of genotype and environmental conditions on health-promoting compounds in *Brassica rapa*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (6): 2421-2431.

Gaitonde MK. 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. Biochemical Journal 104: 627.

García-Sánchez F, Jifon JL, Carvaial M, Syvertsen JP. 2002. Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na⁺ and Cl₂ accumulation in 'Sunburst' Mandarin grafted on different rootstocks. Plant Science 162: 705-712.

Gee JM, Johnson IT. 2001. Polyphenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health. Current Medicinal Chemistry 8 (11): 1245-1255(11).

Gentile AR, Blum W, McInnes G, Stanners D, Steenmans C, Uhel R, Belmont F, Maukonen T, Witt R. 2000. Down to earth: Soil degradation and sustainable development in Europe: A challenge for the 21st century. European Environment Agency 16.

Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C. 2002. The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. The Plant Journal 30 (1): 71-81.

Gerber S, Joos F, Prentice IC. 2004. Sensitive of a dynamic global vegetation model to climate and atmospheric CO₂. Global Change Biology 10: 1223-1239.

Gil-Izquierdo A, Zafrilla P, Tomás-Barberán FA. 2002. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. European Food Research and Technology 214: 155-159.

Giusti MM, Wrolstad RE. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochemical Engineering Journal 14: 217-225.

- Gliszczyńska-Świgło A, Kałużewicz A, Lemańska K, Knaflewski M, Tyrakowska B.** 2007. The effect of solar radiation on the flavonol content in broccoli inflorescence. *Food Chemistry* 100 (1): 241-245.
- González-Benavente A, Fernández JA, Muñoz J, Montoro P, Pérez JG.** 1993. Production calendar of broccoli for autumn and spring. *Agrícola Vergel* 140: 423-428.
- Gould KS.** 2004. Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5: 314-320.
- Graser G, Oldham NJ, Brown PD, Temp U, Gershenzon J.** 2001. The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 57: 23-32.
- Grattan SR, Shannon MC, Grieve CM, Poss JA, Suarez DL, Francois LE.** 1997. Interactive effects of salinity and boron on the performance and water use of Eucalyptus. *Acta Horticulturae* 449: 607-613.
- Greenway H.** 1973. Salinity, plant growth, and metabolism. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*. 39: 24-34.
- Greenway H, Munns R.** 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 31: 149-190.
- Grevsen K.** 1998. Effects of temperature on head growth of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica): parameter estimates for a predictive model. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73 (2): 235-244.
- Grieve CM, Poss JA.** 2000. Wheat response to interactive effects of boron and salinity. *Journal of Plant Nutrition* 23: 1217-1226.

Grieve CM, Poss JA, Grattan SR, Suarez DL, Smith TE. 2010. The combined effects of salinity and excess boron on mineral ion relations in broccoli. *Scientia Horticulturae* 125: 179-187.

Groppa MD, Benavides MP, Zawoznik MS. 2012. Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: A revision. *Applied Soil Ecology* 61: 247-254.

Grubb C, Abel S. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11: 89-100.

Guidi L, Degl'Innocenti E, Carmassi G, Massa D, Pardossi A. 2011. Effects of boron on leaf chlorophyll fluorescence of greenhouse tomato grown with saline water. *Environmental and Experimental Botany* 73: 57-63.

Güsewell S, Koerselman W, Verhoeven JTA. 2002. Time-dependent effects of fertilization on plant biomass in floating fens. *Journal of Vegetation Science* 13: 705-718.

Habash DZ, Paul MJ, Parry MA, Keys AJ, Lawlor DW. 1995. Increased capacity for photosynthesis in wheat grown at elevated CO₂-the relationship between electron-transport and carbon metabolism. *Planta* 197: 482-489.

Hale SE. 2001. Light regime beneath *Sitka spruce* plantations in northern Britain: preliminary results. *Forest Ecology and Management* 151: 61-66.

Halkier BA, Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* 57: 303-333.

Hanlon EA, Hochmuth GJ. 2000. Reference sufficiency ranges for plant analysis in the southern region of the United States. *Southern Cooperative Series Bulletin #394*. ISBN: 1-58161-394-6. URL: www.ncagr.gov/agronomi/saesd/scsb394.pdf

- Hansen CH, Du L, Naur P, Olsen CE, Axelsen CB, Hick AJ, Pickett JA, Halkier BA.** 2001. CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 24790-24796.
- Hanson P, Yang RY, Chang LC, Ledesma L, Ledesma D.** 2009. Contents of carotenoids, ascorbic acid, minerals and total glucosinolates in leafy *Brassica pakchoi* (*Brassica rapa* L. chinensis) as affected by season and variety. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (5): 906-914.
- Harborne JB.** 1989. General procedures and measurement of total phenolics. En: *Methods in plant phenolics*, P. M. Dey, J. B. Harborne, eds (Academic Press: London), pp. 2-9.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ.** 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Hawkesford MJ.** 2000. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany* 51 (342): 131-138.
- Hawkesford MJ, de Kok LJ.** 2006. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell & Environment* 29 (3): 382-395.
- Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM.** 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition* 47 (2): 73-88.
- Heaton T, Lee A, Tallman G.** 1987. Stomata in senescence leaves: guard cell viability and regulation of stomatal function in *Nicotiana glauca*. En: *Plant senescence: its biochemistry and physiology*. Proceedings of the 10th annual

symposium in plant physiology W. W. Thomson, E. E. Nothnagel, R. C. Huffaker, ed (American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD), pp: 198-214.

Herrmann KM, Weaver LM. 1999. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 473-503.

Hesse H, Nikiforova V, Gakiere B, Hoefgen R. 2004. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55: 1283-1292.

Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research* 55: 224-236.

Himanen SJ, Nissinen A, Auriola S, Poppy GM, Stewart CN, Holopainen JK, Nerg A-M. 2008. Constitutive and herbivore-inducible glucosinolate concentrations in oilseed rape (*Brassica napus*) leaves are not affected by Bt Cry1Ac insertion but change under elevated atmospheric CO₂ and O₃. *Planta* 227: 427-437.

Hooper L, Cassidy A. 2006. A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 1805-1813.

Huamaní Parado K. 2009. Identificación de genes candidatos para la biosíntesis y degradación de glucosinolatos mediante herramientas bioinformáticas. Tesis Doctoral para optar al título profesional de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

Hughes NM, Neufeld HS, Burkey KO. 2004. Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. *New Phytologist* 168: 575-587.

Huxtable RJ. 1986. *Biochemistry of Sulfur*. Plenum Publishing Corp. New York.

- Jackson MB, Davies WJ, Else MA.** 1996. Pressure-flow relationships, xylem solutes and root hydraulic conductance in flooded tomato plants. *Annals of Botany* 77: 17-24.
- Jeffery EH, Brown AF, Kurilich AC, Keck AS, Matusheski N, Klein BP, Juvik JA.** 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* 16 (3): 323-330.
- Jeffery EH, Araya M.** 2009. Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews* 8 (1): 283-298.
- Jenkinson DS.** 1988. Soil organic matter and its dynamics. En: Russell's soil conditions and plant growth. Eleventh edition, A. Wild, ed, pp. 564-607.
- Jiang X, Yu X, Li D.** 2011. Meristem development and its relation to endogenous GA3 and IAA contents during floral bud differentiation in broccoli. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences* 35 (1): 1-6.
- Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P.** 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 13052-13056.
- Kammetloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schaffner AR.** 1994. Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *The Plant Journal* 6: 187-199.
- Keck AS, Finley JW.** 2004. Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies* 3: 5-12.

Keles Y, Ç-nel I, Yenice N. 2004. Relationship between boron content and antioxidant compounds in *Citrus* leaves taken from fields with different water source. *Plant and Soil* 265: 345-353.

Kerkhoff AJ, Fagan WF, Elser JJ, Enquist BJ. 2006. Phylogenetic and growth form variation in the scaling of nitrogen and phosphorus in the seed plants. *The American Naturalist* 168: E103-E122.

Kim HJ, Chen F, Wang X, Choi JH. 2006. Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (19): 7263-7269.

King LS, Yasui M, Agre P. 2000. Aquaporin in health and disease. *Molecular Medicine Today* 6 (2): 60-65.

Kleinhenz MD, Wszelaki A. 2003. Yield and relationships among head traits in cabbage as influenced by planting date and cultivar. I. Fresh Market. *HortScience* 38 (7): 1349-1354.

Kocsy G, Szalai G, Galiba G. 2004. Effect of osmotic stress on glutathione and hydroxymethylglutathione accumulation in wheat. *Journal of Plant Physiology* 161: 785-794.

Kopriva S, Muheim R, Koprivova A, Trachsel N, Catalano C, Suter M, Brunold C. 1999. Light regulation of assimilatory sulfate reduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 20: 37-44.

Kopriva S. 2006. Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Annals of Botany* 97: 479-495.

Kopriva S, Patron N, Leustek T, Keeling P. 2008. Phylogenetic analysis of sulfate assimilation and cysteine biosynthesis in phototrophic organisms. En: *Advances in*

photosynthesis and respiration, vol 27: sulfur metabolism in phototrophic organisms, R. Hell, T. Leustek, C. Dahl, D. Knaff, eds (Springer, Dordrecht), pp. 33-60.

Kopriva S. 2011. Advances in photosynthesis and respiration. Chapter 7 nitrogen and sulfur metabolism in C4 plants. Volume 32, pp. 109-128.

Koyro HW. 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). Environmental and Experimental Botany 56: 136-146.

Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdely C. 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. Plant Physiology and Biochemistry 45: 244-249.

Kurilich A, Jefferey E, Juvik J, Wallig M, Klein B. 2002. Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. Journal of Agricultural and Food chemistry 50: 5053-5057.

La GX, Fang P, Teng YB, Li YJ, Lin XY. 2009. Effect of CO₂ enrichment on the glucosinolate contents under different nitrogen levels in bolting stem of chinese kale (*Brassica alboglabra* L.). Journal of Zhejiang University-Science B 10 (6): 454-464.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Landi M, Degl'Innocenti E, Pardossi A, Guidi L. 2012. Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity: a review. American Journal of Agricultural and Biological Science 7: 255-270.

Lappartient AG, Touraine B. 1996. Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO₄²⁻ uptake in intact canola. The role of phloem-translocated glutathione. Plant Physiology 111: 147-157.

Larsson C, Widell S, Kjellbom P. 1987. Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods in Enzymology* 148: 558-568.

Lauchi A, Epstein E. 1990. Plant responses to saline and sodic conditions. En: *Agriculture Salinity Assessment and Management*, K. K. Tanji, ed (American Society of Civil Engineering), pp. 113-137.

Lee DW, Oberbauer SF, Johnson P, Krishnapilay B, Mansor M, Mohamad H, Yap SK. 2000. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian hopea (Dipterocarpaceae) species. *American Journal of Botany* 87 (4): 447-455.

Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP. 2000. Pathways and regulation of sulphur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 141-165.

Lewis JA, Fenwick GR. 1987. Glucosinolate content of *brassica* vegetables: analysis of twenty four cultivars of calabrese (green sprouting broccoli, *Brassica oleracea* L. var botrytis subvar. cymosa lam.). *Food Chemistry* 25: 259-268.

Lewis JA, Fenwick GR, Gray AR. 1991. Glucosinolates in brassica vegetables-green-curd cauliflower (*Brassica oleracea* L. botrytis group) and purple-headed broccoli (*Brassica oleracea* L. italica group). *LWT- Food Science and Technology* 24: 361-363

Li X, Kushad MM. 2004. Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*A Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6950-6955.

Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu DT, Maurel C, Lin J. 2011. Single-molecule analysis of PIP₂;1 dynamics and partitioning reveals multiple

modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation. *The Plant Cell* 23: 3780-3797.

Liang G, Du G, Chen J. 2009. Salt-induced osmotic stress for glutathione overproduction for *Candida utilis*. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 324-329.

Liska AJ, Shevchenko A, Pick U, Katz A. 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiology* 136: 2806-2817.

Liu CH, Li C, Liang D, Ma FW, Wang SC, Wang P, Wang RC. 2013. Aquaporin expression in response to water-deficit stress in two *Malus* species: relationship with physiological status and drought tolerance. *Plant Growth Regulation* 70 (2): 187-197.

López-Berenguer C, García-Viguera C, Carvajal M. 2006. Are root hydraulic conductivity responses to salinity controlled by aquaporins in broccoli plants?. *Plant and Soil* 279: 13-23.

López-Berenguer C, Carvajal M, García-Viguera C, Alcaraz CF. 2007. Nitrogen, phosphorus, and sulfur nutrition in Broccoli plants grown under salinity. *Journal of Plant Nutrition* 30: 1855-1870.

López-Berenguer C, Martínez-Ballesta MC, García-Viguera C, Carvajal M. 2008. Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. *Plant Science* 174 (3): 321-328.

López-Berenguer C, Martínez-Ballesta MD, Moreno DA. 2009. Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2): 572-578.

López-Pérez L, Fernández-García N, Olmos E, Carvajal M. 2007. The phi thickening in roots of broccoli plants: an acclimation mechanism to salinity. *International Journal of Plant Science* 168: 1141-1149.

López-Pérez L, Martínez-Ballesta MC, Maurel C, Carvajal M. 2009. Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry* 70: 492-500.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Fohn phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275

Lucheta AR, Lambais MR. 2012. Sulfur in agriculture. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 36 (5): 1369-1379.

Lule SU, Xia W. 2005. Food phenolics, pros and cons: a review. *Food Reviews Internationa* 21 (4): 367-388.

Luu DT, Maurel C. 2005. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell & Environment* 28: 85-96.

Luu DT, Maurel C. 2013. Aquaporin Trafficking in Plant Cells: An Emerging Membrane-Protein Model. *Traffic* 14 (6): 629-635.

Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. 1997. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition* 127: 286-292.

Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London, pp. 889.

Martínez-Ballesta MC, Martínez V, Carvajal M. 2000. Regulation of water channel activity in whole roots and in protoplast from roots of melón plants grown under saline conditions. *Australian Journal Plant Physiology* 27: 685-691.

Martínez-Ballesta MC, Aparicio F, Pallas V, Martínez V, Carvajal M. 2003a. Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 160: 689-697.

Martínez-Ballesta MC, Martínez V, Carvajal M. 2003b. Aquaporin functionality in relation to H⁺-ATPase activity in root cells of *Capsicum annuum* grown under salinity. *Physiologia Plantarum* 117: 413-420.

Martínez-Ballesta MC, Silva C, López-Berenguer C, Cabañero FJ, Carvajal M. 2006. Plant aquaporins: New perspectives on water and nutrient uptake in saline environment. *Plant Biology* 8 (5): 535-546.

Martínez-Ballesta MC, Bastías E, Zhu C, Schäffner AR, González-Moro B, González-Murua C, Carvajal M. 2008a. Boric acid and salinity effects on maize roots. Response of aquaporins ZmPIP1 and ZmPIP2, and plasma membrane H⁺-ATPase, in relation to water and nutrient uptake. *Physiologia Plantarum* 132: 479-490.

Martínez-Ballesta MC, Bastías E, Zhu C, Schäffner AR, González-Moro B, González-Murua C, Carvajal M. 2008b. Boric acid and salinity effects on maize roots. Response of aquaporins ZmPIP1 and ZmPIP2, and plasma membrane H⁺-ATPase, in relation to water and nutrient uptake. *Physiologia Plantarum* 132: 479-490.

Martínez-Ballesta MC, Domínguez-Perlés R, Moreno DA, Muries B, Alcaraz-López C, Bastías E, García-Viguera C, Carvajal M. 2010. Minerals in plant food: effect of agricultural practices and role in human health. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 295-309.

Martínez-Sánchez A, Allende A, Bennett RN, Ferreres F, Gil MI. 2006. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biology and Technology* 42: 86-97.

Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50: 5-8.

Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology* 130: 2101-2110.

Masood S, Saleh L, Witzel K, Plieth C, Mühling KH. 2012a. Determination of oxidative stress in wheat leaves as influenced by boron toxicity and NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 56: 56-61.

Masood S, Wimmer MA, Witzel K, Zörb C, Mühling KH. 2012b. Interactive effects of high boron and NaCl stresses on subcellular localization of chloride and boron in wheat leaves. *Journal Agronomy & Crop Science* 198: 227-235.

Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V. 2008. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology* 59: 595-624.

Mavrogianopoulos GN, Spanakis J, Tsikalas P. 1999. Effect of carbon dioxide enrichment and salinity on photosynthesis and yield in melon. *Scientia Horticulturae* 79 (1-2): 51-63.

Meinild AK, Klaerke DA, Loo DDF, Wright EM, Zeuthen T. 1998. Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 32446-32451.

Melser S, Molino D, Batailler B, Peypelut M, Laloi M, Wattelet-Boyer V, Bellec Y, Faure JD, Moreau P. 2011. Links between lipid homeostasis, organelle morphodynamics and protein trafficking in eukaryotic and plant secretory pathways. *Plant Cell Reports* 30: 177-193.

Mi LX, Wang XT, Govind S, Hood BL, Veenstra TD, Conrads TP, Saha DT, Goldman R, Chung FL. 2007. The role of protein binding in induction of apoptosis

by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells. *Cancer Research* 67: 6409-6416.

Mikkelsen MD, Petersen B, Olsen C, Halkier BA. 2002. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids* 22: 279-295.

Miller CH, Konsler TR, Lamont WJ. 1985. Cold stress influence on premature flowering of broccoli. *HortScience* 20 (2): 193-195.

Mithen RF, Dekker M, Ververk R, Rabot S, Johnson IT. 2000. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 967-984.

Moens F. 1991. The use of surface active additives as anti-fog agents in agricultural films. En: *Proceedings of the 23rd National Agricultural Plastics Congress*, (American Society for Plasticulture: Mobile, Alabama), pp. 188-195.

Montoro P, Etienne H, Carron M-P, Nougarede A. 1992. Effect of cytokinins on the induction of embryogenesis and the quality of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* Müll. *Argentina and Costa Rica Academy Sci. Paris*, 315 (III), 567-574.

Moreno DA, Carvajal M, López-Berenguer C, García-Viguera C. 2006. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1508-1522.

Moreno DA, García-Viguera C. 2008. El brócoli fuente de ingredientes funcionales: glucosinolatos. *Alimentación, Nutrición y Salud* 15 (2): 49-53.

Moreno DA, López-Berenguer C, Martínez-Ballesta MC, Carvajal M, García-Viguera C. 2008. Basis for the new challenges of growing broccoli for health in hydroponics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (8): 1472-1481.

Moreno DA, Pérez-Balibrea S, Ferreres F, Gil-Izquierdo A, García-Viguera C. 2010. Acylated anthocyanins in broccoli sprouts. *Food Chemistry* 123: 358-363.

Mota-Cadenas C. 2011. Fijación de CO₂ en cultivos y sus implicaciones en el cambio climático. Tesis para optar al título de Doctor en Biología. Universidad de Murcia. Murcia-España.

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* 25: 239-250.

Muries B, Faize M, Carvajal M, Martínez-Ballesta MC. 2011. Identification and differential induction of the expression of aquaporins by salinity in broccoli plants. *Molecular BioSystems* 7: 1322-1335.

Muries B, Carvajal M, Martínez-Ballesta MC. 2013. Response of three broccoli cultivars to salt stress, in relation to water status and expression of two leaf aquaporins. *Planta* 237 (5): 1297-1310.

Myzak MC, Karplus PA, Chung FL, Dashwood RH. 2004. A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane inhibition of histone deacetylase. *Cancer Research* 64: 5767-5774.

Nair MG, Safir GR, Siquera JO. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhizae-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 434-439.

Nakamura K, Hayama A, Masada M, Fukushima K, Tamura G. 1987. Measurement of serine acetyltransferase activity in crude plant extracts by a coupled assay system using cysteine synthase. *Plant and Cell Physiology* 28 (5): 885-891.

Navarro JM, Flores P, Garrido C, Martinez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* 96: 66-73.

Niu XM, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* 109: 735-742.

- Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer, CH.** 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49: 623-647.
- Norby RJ, O'Neill EG, Hood WG, Luxmoore RJ.** 1987. Carbon allocation, root exudation and mycorrhizal colonization of *Pinus echinata* seedlings grown under CO₂ enrichment. *Tree Physiology* 3 (3): 203-210.
- Norby RJ, Luo Y.** 2004. Evaluating ecosystem responses to rising atmospheric CO₂ and global warming in a multi-factor world. *New Phytologist* 162: 281-293.
- North GB, Martre P, Nobel PS.** 2004. Aquaporins account for variations in hydraulic conductance for metabolically active root regions of *Agave deserti* in wet, dry and rewetted soil. *Plant, Cell & Environment* 27: 219-228.
- Oliviero T, Verkerk R, Dekker M.** 2012. Effect of water content and temperature on glucosinolate degradation kinetics in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Food Chemistry* 132: 2037-2045.
- Padilla G, Cartea ME, Velasco P, de Harob A, Ordás A.** 2007a. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry* 68 (4): 536-545.
- Padilla G, Cartea ME, Soengas P, Ordás A.** 2007b. Characterization of fall and spring plantings of Galician cabbage germplasm for agronomic nutritional and sensory traits. *Euphytica* 154: 63-74.
- Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, del Castillo MD, Cano MP, de Pascual-Teresa S.** 2008. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 18 (21): 273-281.
- Palmieri S, Leoni O, Iori R.** 1982. A steady state kinetics study of myrosinase with direct ultra violet spectrophotometric assay. *Analytical Biochemistry* 123: 320-324.
- Paschold P, Kleber J, Adam S, Bogner A, Tauscher B.** 2000. Einfluss von

bewässerung und n-düngung auf ertrag und sulforaphangehalt von brokkoli (*Brassica oleracea*). Proceedings of the 35th conference of the german society of quality research, Karlsruhe, pp. 57-66.

Pascual A. 1994. Brócoli. Su cultivo y perspectivas. Revista Horticultura 97: 34-37.

Peng J, Wang SY, Wang CY, Zheng Y. 2011. Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. Food Chemistry 124: 262-270.

Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. 2008. Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. Journal of the Science of Food and Agriculture 88: 904-910.

Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. 2010. Glucosinolates in broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. italica) as conditioned by sulphate supply during germination. Journal of Food Science 75: C673-C677.

Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. 2011. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. Food Chemistry 125 (2): 348-354.

Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Sgherri C, Munoz-Rueda A, Navari-Izzo F, Mena-Petite A. 2009. The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO₂. Physiologia Plantarum 135: 29-42.

Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Sgherri C, Mena-Petite A, Navari-Izzo F, Muñoz-Rueda A. 2010. Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO₂. Physiologia Plantarum 139 (3): 256-268.

Petridis A, Therios I, Samouris G, Tananaki C. 2012. Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.)

and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and Experimental Botany* 79: 37-43.

Pettigrew WT, Meredith WR. 1994. Leaf gas-exchange parameters vary among cotton genotypes. *Crop Science* 34 (3): 700-705.

Phartiyal P, Kim WS, Cahoon RE, Jez JM, Krishnana HB. 2006. Soybean ATP sulfurylase, a homodimeric enzyme involved in sulfur assimilation, is abundantly expressed in roots and induced by cold treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 450: 20-29.

Phillips DA, Fox TC, Six J. 2006. Root exudation (net efflux of amino acids) may increase rhizodeposition under elevated CO₂. *Global Change Biology* (12): 561-567.

Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C. 2002. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (20): 5621-5625.

Podsedek A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: a review. *LWT- Food Science and Technology* 40: 1-11.

Poorter H, Navas ML. 2003. Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist* 157 (2): 175-198.

Pourcel L, Routaboul J-M, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I. 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 12 (1): 29-36.

Pracros P, Couranjou C, Moreau R. 1992. Effects on growth and respiration due to the ingestion of the rapeseed meal glucosinolates in young larvae of *Tenebrio molitor*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 103 (2): 391-395.

Prior RL, Wu X, Gu L. 2006. Flavonoid metabolism and challenges to understanding mechanisms of health effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86 (15): 2487-2491.

PROEXPORT. Memoria 2012. Asociación de productores y exportadores de frutas y hortalizas de la Región de Murcia (España).

Pulido-Leboeuf P. 2004. Seawater intrusion and associated processes in a small coastal complex aquifer (Castell de Ferro, Spain). *Applied Geochemistry* 19: 1517-1527.

Rajaona AM, Brueck H, Seckinger C, Asch F. 2012. Effect of salinity on canopy water vapor conductance of young and 3-year old *Jatropha curcas* L. *Journal of Arid Environments* 87: 35-41.

Rangkadilok N, Nicolas ME, Bennett RN, Eagling DR, Premier RR, Taylor WJ. 2004. The effect of sulphur fertilizer on glucoraphanin levels in broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) at different growth stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2632-2639.

Rao AV, Rao LG. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* 55 (3): 207-216.

Rask L, Andréasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* 42 (1): 93-114.

Rausch T, Wachter A. 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* 10: 503-509.

Reddy GVP, Tossavainen P, Nerg A-M, Holopainen JK. 2004. Elevated atmospheric CO₂ affects the chemical quality of *Brassica* plants and the growth rate

of the specialist *Plutella xylostella*, but not the generalist, *Spodoptera littoralis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4185-4191.

Rendig VV, Oputa C, McComb EA. 1976. Effects of sulfur deficiency on nonprotein nitrogen, soluble sugars and N/S ratios in young corn (*Zea mays* L.) plants. Plant and Soil 44: 423-437.

Rennenberg H. 1976. Glutathione in conditioned media of tobacco suspension cultures. Phytochemistry 15: 1433-1434.

Rennenberg H, Sekiya J, Wilson LG, Filner P. 1982. Evidence for an intracellular sulphur cycle in cucumber leaves. Planta 154: 516-524.

Reuveny Z, Dougall D, Trinity P. 1980. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 77: 6670-6672.

Robredo A, Pérez-López U, Miranda-Apodaca J, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A. 2011. Elevated CO₂ reduces the drought effect on nitrogen metabolism in barley plants during drought and subsequent recovery. Environmental and Experimental Botany 71 (3): 399-408.

Romero LC, Domínguez-Solís JR, Gutiérrez-Alcalá G, Gotor C. 2001. Salt regulation of O-acetylserine(thiol)lyase in *Arabidopsis thaliana* and increased tolerance in yeast. Plant Physiology and Biochemistry 39: 643-647.

Rosa EAS, Heaney RK, Portas CAM, Fenwick GR. 1996. Changes in glucosinolate concentrations in *brassica* crops (*Brassica oleracea* and *Brassica napus*) through growth seasons. Journal of the Science of Food and Agriculture 71: 237-244.

Rosa EAS, Rodrigues AS. 2001. Total and individual glucosinolate content in 11 broccoli cultivars grown in early and late seasons. HortScience 36 (1): 56-59.

- Rotte C, Leustek T.** 2000. Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of *Arabidopsis* leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiology* 124: 715-724.
- Rouphael Y, Cardarelli M, Coll G.** 2008. Yield, mineral composition, water relations, and water use efficiency of grafted mini-watermelon plants under deficit irrigation. *HortScience* 43 (3): 730-736.
- Rouzaud G, Rabot S, Ratcliffe B, Duncan AJ.** 2003. Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition* 90: 395-404.
- Roy MK, Juneja LR, Isobe S, Tsushida T.** 2009. Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. *Food Chemistry* 114: 263-269.
- Rüegsegger A, Brunold C.** 1992. Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiology* 99: 428-433.
- Ruiz JM, Bretones G, Baghour M, Ragala L, Belakbir A, Romero L.** 1998. Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry* 48: 269-272.
- Ruiz JM, Blumwald E.** 2002. Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*. *Planta* 214: 965-969.
- Sadilova E, Stintzing FC, Carle R.** 2006. Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annuum* L.) peel extracts. *Zeitschrift für Naturforschung C* 61: 527-535.
- Sairam RK.** 1994. Effect of moisture stress on physiological activities of two contrasting wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology* 32: 594-597.

- Saito K.** 2004. Sulfur assimilatory metabolism: the long and smelling road. *Plant Physiology* 136: 2443-2450.
- Schäffner AR.** 1998. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprise to surface in water relation?. *Planta* 204: 131-139.
- Scherer HW.** 2001. Sulfur in crop production. *European Journal of Agronomy* 14: 81-111.
- Schönhof I, Krumbein A, Bruckner B.** 2004. Genotypic effects on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower. *Nahrung – Food* 48: 25-33.
- Schreiner M.** 2005. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition* 44: 85-94.
- Schönhof I, Kläring H-P, Krumbein A, Schreiner M.** 2007a. Interaction between atmospheric CO₂ and glucosinolates in broccoli. *Journal of Chemical Ecology* 33: 105-114.
- Scott T, Eagleson M.** 1988. *Concise Encyclopedia Biochemistry*. Walter de Gruyter. Berlin.
- Seow A, Shi CY, Chung FL, Jiao D, Hankin JH, Lee HP, Coetzee GA, Yu MC.** 1998. Urinary total isothiocyanate (ITC) in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore: relationship with dietary total ITC and glutathione S-transferase M1/T1/P1 genotypes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 7: 775-781.
- Serra IA, Nicastro S, Mazzuca S, Natali L, Cavallini A, Innocenti AM.** 2013. Response to salt stress in seagrasses: PIP1;1 aquaporin antibody localization in *Posidonia oceanica* leaves. *Aquatic Botany* 104: 213-219.
- Shannon MC, Grieve CM, Francois LE.** 1994. Whole-plant response to salinity. In: *Plant environment interactions*, R. E. Wilkinson, ed (New York: Marcel Dekker,

Cop), pp. 199-244.

Shannon MC, Rhoades JD, Draper JH, Scardaci SC, Spyres MD. 1998. Assessment of salt tolerance in rice cultivars in response to salinity problems in California. *Crop Science* 38 (2): 394-398.

Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. 1998. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 7: 1091-1100.

Shapiro TA, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Stephenson KK, Wade KL, Ye L, Talalay P. 2006. Safety, Tolerance, and Metabolism of Broccoli Sprout Glucosinolates and Isothiocyanates: A Clinical Phase I Study. *Nutrition and Cancer* 55 (1): 53-62.

Singal H, Talwar G, Dua A, Singh R. 1995. Pod photosynthesis and seed dark CO₂ fixation support oil synthesis in developing *Brassica* seeds. *Journal of Biosciences* 20: 49-58.

Smith TE, Grattan SR, Grieve CM, Poss JA, Suarez DL. 2010a. Salinity's influence on boron toxicity in broccoli: I. Impacts on yield, biomass, distribution, and water use. *Agricultural Water Management* 97: 777-782.

Smith TE, Grattan SR, Grieve CM, Poss JA, Suarez DL. 2010b. Salinity's influence on boron toxicity in broccoli: II. Impacts on boron uptake, uptake mechanisms and tissue ion relations. *Agricultural Water Management* 97: 783-791.

Smolen G, Bender J. 2002. Arabidopsis cytochrome P450 cyp83B1 mutations activate the tryptophan biosynthetic pathway. *Genetics* 160: 323-332.

Stepien P, Klobus G. 2006. Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biologia Plantarum* 50: 610-616.

- Stepien P, Johnson GN.** 2009. Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiology* 149: 1154-1165.
- Stedde E.** 2000. Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant and Soil* 226: 45-56.
- Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Pruvost C, Polle A, Foyer CH, Rennenberg H.** 1995. Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* X *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. *The Plant Journal* 7 (1): 141-145.
- Stuiver CEE, De Kok LJ.** 2001. Atmospheric H₂S as sulfur source for *Brassica oleracea*: kinetics of H₂S uptake and activity of O-acetylserine (thiol)lyase as affected by sulfur nutrition. *Environmental and Experimental Botany* 46: 29-36.
- Suter M, von Ballmoos P, Kopriva S, den Camp RO, Schaller J, Kuhlemeier C, Schurmann P, Brunold C.** 2000. Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 930-936.
- Taiz L, Zeiger E.** 2002. *Plant Physiology*, 3rd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc. Publishers, pp. 283-310.
- Taiz L, Zeiger E.** 2006. Stress physiology. En: *Plant Physiology*. Fourth Edition, L. Taiz, E. Zeiger, ed (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA), pp. 671-681. Chapter 13: Secondary Metabolites and Plant Defense. Lectured by L-F Chien, 2008.
- Tan W-K, Lin Q, Lim T-M, Kumar P, Loh C-S.** 2013. Dynamic secretion changes in the salt glands of the mangrove tree species *Avicennia officinalis* in response to a changing saline environment. *Plant, Cell & Environment* 36 (8): 1410-1422.

Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N, Fujiwara T. 2006. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *The Plant Cell* 18: 1498-1509.

Tawfiq N, Heaney R, Plumb J, Fenwick G, Musk S, Williamson G. 1995. Dietary glucosinolates as blocking agents against carcinogenesis: glucosinolate breakdown products assessed by induction of quinone reductase activity in murine heap 1c1c7 cells. *Carcinogenesis* 16: 1191-1194.

Tester M, Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-537.

The Merck Index. 1983. En: An encyclopedia of chemicals, drugs and biological 10th Ed., M. Windholz, ed (Merck and Co., Inc., Rahway, NJ).

Thornalley PJ, IARC Workgroup. 2004. Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates and Indoles. *IARC Handbook on Chemoprevention of Cancer* 1-261.

Tolrà R, Pongrac P, Poschenrieder C, Vogel-Mikuš K, Regvar M, Barceló J. 2006. Distinctive effects of cadmium on glucosinolate profiles in Cd hyperaccumulator *Thlaspi praecox* and non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense*. *Plant and Soil* 288 (1-2): 333-341.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.

Traka M, Mithen R. 2009. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews* 8 (1): 269-282.

Traka MH, Spinks CA, Doleman JF, Melchini A, Ball RY, Mills RD, Mithen RF. 2010. The dietary isothiocyanate sulforaphane modulates gene expression and

alternative gene splicing in a PTEN null preclinical murine model of prostate cancer. *Molecular Cancer* 9: 189.

Tyerman SD, Niemietz CM. 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment* 25: 173-194.

Uren NC, Reisenauer HM. 1988. The role of root exudates in nutrient acquisition. *Advances in plant nutrition* 3: 79-114.

Vallejo CF, García-Viguera C, Tomás-Barberán FA. 2003. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3776-3782.

Vallejo CF, Tomás-Barberán FA, Ferreres F. 2004a. Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography–UV diode-array detection–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1054 (1-2): 181-193.

Van Wilder V, Micielica U, Degand H, Derua R, Waelkens E, Chaumont F. 2008. Maize plasma membrane aquaporins belonging to the PIP1 and PIP2 subgroups are in vivo phosphorylated. *Plant & Cell Physiology* 49: 1364-1377.

Velasco P, Cartea ME, Gonzalez C, Vilar M, Ordas A. 2007. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea* acephala group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 955-962.

Vera Nicolás P. 2005. Murcia y el agua: historia de una pasión, Ed. Asamblea Regional de Murcia y Real Academia Alfonso X el Sabio, Murcia.

Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, de Schrijver R, Hansen M, Gerhäuser C, Mithen R, Dekker M. 2009. Glucosinolates in *Brassica* vegetables: The influence of the food supply chain on

intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research* 53 (2): S219.

Verkerk R, Tebbenhoff S, Dekker M. 2010. Variation and distribution of glucosinolates in 42 cultivars of *Brassica oleracea* vegetable crops. *Acta Horticulturae* 856: 63-69.

Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophyll-a and chlorophyll-b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144 (3): 307-313.

West LG, Meyer KA, Balch BA, Rossi FJ, Schultz MR, Haas GW. 2004. Glucoraphanin and 4-hydroxyglucobrassicin contents in seeds of 59 cultivars of broccoli, raab, kohlrabi, radish, cauliflower, brussels sprouts, kale, and cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 916-926.

Wielanek M, Urbanek H. 1999. Glucotropaeolin and mirosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57 (1): 39-45.

Wightman F, Lighty DL. 1982. Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiologia Plantarum* 55 (1): 17-24.

Wimmer MA, Muhling KH, Lauchli A, Brown PH, Goldbach HE. 2003. The interaction between salinity and boron toxicity affects the subcellular distribution of ions and proteins in wheat leaves. *Plant, Cell & Environment* 26: 1267-1274.

Wirtz M, Droux M, Hell R. 2004. O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1785-1798.

Wittstock U, Halkier BA. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis era*. *Trends in Plant Science* 7 (6): 263-270.

- Woodall GS, Stewart GR.** 1998. Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*?. *Journal of Experimental Botany* 49 (325): 1447-1450.
- Wszelaki A, Kleinhenz MD.** 2003. Yield and relationships among head traits in cabbage as influenced by planting date and cultivar. *Hortscience* 38 (7): 1355-1359.
- Wurr DCE, Fellows JR.** 1991. The influence of solar-radiation and temperatura on the head weight of crisp lettuce. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 66: 183-190.
- Wurr DCE, Fellows JR, Phelps K.** 1995. Vernalization in calabrese (*Brassica oleracea* var. *Italica*) – a model for apex development. *Journal of Experimental Botany* 46: 1487-1496.
- Wurr DCE, Fellows JR, Phelps K.** 1996. Investigating trends in vegetable crop response to increasing temperature associated with climate change. *Scientia Horticulturae* 66 (3-4): 255-263.
- Xu Z, Zhou G.** 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany* 59 (12): 3317-3325.
- Yamaguchi T, Blumwald E.** 2005. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science* 10 (12): 615-620.
- Yamori W, Evans JR, Von CS.** 2010. Effects of growth and measurement light intensities on temperature dependence of CO₂ assimilation rate in tobacco leaves. *Plant, Cell & Environment* 33 (3): 332-343.
- Yan XF, Chen SX.** 2007. Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* 226 (6): 1343-1352.

- Yao L, Jiang Y, Singanusong R, D'Arcy B, Datta N, Caffin N, Raymond K.** 2004. Flavonoid in Australian Malaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International* 37 (2): 166-174.
- Yasumura Y, Hikosaka K, Hirose T.** 2006. Seasonal changes in photosynthesis, nitrogen content and nitrogen partitioning in *Lindera umbellata* leaves grown in high or low irradiance. *Tree Physiology* 26 (10): 1315-1323.
- Yermiyahu U, Ben-Gal A, Keren R, Reid RJ.** 2008. Combined effect of salinity and excess boron on plant growth and yield. *Plant and Soil* 304: 73-87.
- Yi H, Galant A, Ravilious GE, Preuss ML, Jez JM.** 2010. Sensing Sulfur Conditions: Simple to Complex. Protein Regulatory Mechanisms in Plant Thiol Metabolism. *Molecular Plant* 3 (2): 269-279.
- Yuan G-F, Sun B, Yuan J, Wang Q-M.** 2009. Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University Science B* 10 (8): 580-588.
- Yuan G, Wang X, Guo R, Wang Q.** 2010. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chemistry* 121 (4): 1014-1019.
- Zagoskina NV, Dubravina GA, Alyavina AK, Goncharuk. EA.** 2003. Effect of ultraviolet (UV-B) radiation on the formation and localization of phenolic compounds in tea plant callus cultures. *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (2): 270-275.
- Zapata S, Dufour J-P.** 1992. Ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. *Journal of Food Science* 57 (2): 506-511.

Zareba G, Serradell N. 2004. Chemoprotective effects of broccoli and other *Brassica* vegetables. *Drugs of the Future* 29 (11): 1097.

Zechmann B, Mauch F, Sticher L, Müller M. 2008b. Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany* 59 (14): 4017-4027.

Zeiger E, Field C. 1982. Photocontrol of the functional coupling between photosynthesis and stomatal conductance in the intact leaf. *Plant Physiology* 70: 370-375.

Zhang Y, Talalay P, Cho C-G, Posner GH. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 89: 2399-2403.

Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

Zimmermann U, Raede H, Steudle E. 1969. Kontinuierliche Druckmessung in Pflanzenzellen. *Naturwissenschaften* 56: 634.

Zukalová H, Becka J, Vasak D. 2010. Glucosinolates-Secondary Plant Products as Important Complex Interaction in our Biosphere. *Current Nutrition & Food Science* 6 (4): 281-289.