

PROHEXADIONA DE CALCIO INCREMENTA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, EL CONTENIDO DE LICOPENO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRUTOS DE TOMATE FLORADADE

Homero Ramírez^{1*}; Bruno Herrera-Gómez¹; Adalberto Benavides-Mendoza¹; José Hugo Rancaño-Arrijo¹; Vicente Álvarez-Mares²; Carlos Amado-Ramírez¹; Ana Martínez-Osorio¹

¹Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila MÉXICO. Correo-e: homeror@terra.com.mx. (*Autor responsable).

²Impulsora Agropecuaria e Insumos para Invernaderos. Saltillo, Coahuila, MÉXICO.

RESUMEN

El uso de prohexadiona de calcio (P-Ca) en frutales aumenta los niveles de sólidos solubles, antocianinas y aromas en el producto cosechado; el efecto de P-Ca en hortalizas es poco conocido. En este trabajo se evaluaron los cambios que provoca la P-Ca en la capacidad antioxidante total, contenido de licopeno y actividad de las enzimas catalasa y peroxidasa en frutos de tomate bola (*Lycopersicon esculentum* Mill.) variedad Floradade. Se evaluaron diferentes concentraciones (0, 125, 175 y 200 mg litro⁻¹) con una y dos aplicaciones. La primera aplicación se realizó cuando las plantas presentaron primordios florales, y la segunda 15 días después. Los resultados sostienen que P-Ca incrementó ($P \leq 0.01$) la capacidad antioxidante total de los frutos, principalmente en los frutos en estado de hombros verdes. La concentración de licopeno aumentó en los frutos de plantas tratadas con cualquiera de las dosis de P-Ca, con una mayor concentración en frutos en hombros verdes. Asimismo, con la aplicación de P-Ca la actividad de la catalasa y peroxidasa aumentó significativamente ($P \leq 0.01$).

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Lycopersicon esculentum* Mill., capacidad antioxidante total, licopeno, catalasa, peroxidasa.

PROHEXADIONE CALCIUM INCREASES ANTIOXIDANT CAPACITY, LYCOPENE CONTENT AND ENZYMATIC ACTIVITY IN FRUITS OF TOMATO FLORADADE

ABSTRACT

Prohexadione calcium (P-Ca) increases the levels of soluble solids, anthocyanins and aromatic compounds in deciduous fruits. In vegetable crops the effect of P-Ca is less documented. In this study it was evaluated the changes originated by P-Ca on total antioxidant capacity, lycopene content and catalase and peroxidase activity in Floradade tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) different concentration (0, 125, 175 and 200 mg·liter⁻¹) with one or two applications of P-Ca were evaluated. The first application was conducted when plants showed floral tissue initials and the second 15 days after. The results showed that P-Ca increased ($P \leq 0.01$) the total antioxidant capacity in fruits under shoulder stage. The lycopene concentration increased in fruits from plants sprayed with any P-Ca concentration, being higher at the stage of green shoulder. The catalase and peroxidase enzyme activity also showed an increase ($P \leq 0.01$) with the application of P-Ca.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Lycopersicon esculentum* Mill. total antioxidant capacity, lycopene, catalase, peroxidase.

INTRODUCCIÓN

Los retardantes del crecimiento son eficaces en el control del crecimiento vegetativo en árboles frutales y plantas ornamentales; sin embargo, sustancias como cloromequat y paclobutrazol, que se utilizaron en manzanos como estimulantes de la brotación y se les atribuyó ciertos beneficios a frutos cosechados se encuentran restringidos para su uso agrícola, puesto que poseen una alta residualidad en los cultivos (Rademacher *et al.*, 2006).

Un retardante de crecimiento que se usa recientemente en la horticultura es la prohexadiona de calcio (P-Ca); [(3-óxido-4-propionil-5-oxo-3-ciclohexano-carboxilato)]. En la Unión Europea y E.E.U.U., se han estudiado sus efectos en algunos cultivos como manzana y cereales (Rademacher, 1993; 2000) y cacahuete (Evans *et al.*, 1999).

Se ha sugerido que la P-Ca puede intervenir en rutas biosintéticas de metabolitos secundarios e impactar positivamente en la capacidad antioxidante (Gosch *et al.*, 2003; Roemmelt *et al.*, 2003a), lo cual explica el incremento en la resistencia al ataque de tizón de fuego (*Erwinia amylovora*) y roña (*Venturia inaequalis*) en manzano y peral (Halbwirth *et al.*, 2003; Roemmelt *et al.*, 2003b). Considerando la importancia de las hortalizas como alimentos funcionales para alimentar y mejorar la salud de la población a través de su riqueza en antioxidantes, es importante establecer si P-Ca puede contribuir positivamente en esta línea de estudio. Por tanto, el objetivo de la investigación fue evaluar los efectos de la P-Ca en la capacidad antioxidante total, en la concentración de licopeno y en la actividad de las enzimas catalasa y peroxidasa en frutos de tomate bola (*Lycopersicon esculentum* Mill.) variedad Floradade.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se aplicaron con un atomizador separadamente cuatro concentraciones de P-Ca (0, 125, 175 y 200 mg·litro⁻¹) en plantas de jitomate bola variedad Floradade. Se realizaron dos aplicaciones, la primera cuando las plantas presentaron primordios florales, y la segunda 15 días después. El cultivo se condujo de agosto de 2005 a febrero 2006 en un invernadero ubicado en Buenavista, Saltillo, estado de Coahuila, México, a 25° 23' LN y 101° 01' LO, con una altitud de 1,743 m. El promedio de temperatura en el invernadero fue 27 °C y la humedad relativa 65 %. La cosecha se inició el 28 de diciembre 2005 cuando los frutos alcanzaron el grado de color tres y un tamaño de 5 x 6 cm de acuerdo a la norma USDA (Crookes y Grierson, 1983).

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres factores para determinar la capacidad antioxidante total y el contenido de licopeno y un bifactorial para medir la actividad de la catalasa y peroxidasa con tres repeticiones

por tratamiento con las siguientes características: Factor (A) concentración de P-Ca, (B) número de aplicaciones y (C) estadios de maduración (inicio de color y hombros verdes). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey usando el paquete SAS, (2000).

Determinación de la capacidad antioxidante total

Los frutos cosechados se seccionaron en dos partes iguales, de la parte central de cada una se tomaron 5 g de muestra, se colocaron en un mortero congelado, se agregó 10 ml de amortiguador de fosfatos (pH 7) y se molió; el extracto obtenido se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min, y el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de antioxidantes empleando el kit "total antioxidant status kit assay" de Calbiochem® que consta de una solución amortiguadora (fosfato salino), cromógeno (Metmioglobina y ABTS[®]- [catión radical 2,2-Azinobois-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)]), sustrato estabilizado (H₂O₂) y como estándar el análogo de la vitamina E, Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8- tetrametil croman-2-carboxílico) 1.5 mM (Miller *et al.*, 1993). Se prepararon los tres reactivos incluidos en el kit de la siguiente forma: Al cromógeno y al sustrato se le agregaron 10 y 7.5 ml de amortiguador (pH 7,) respectivamente, al estándar se le agregó 1 ml de agua destilada. El espectrofotómetro se ajustó a 600 nm contra el aire; el H₂O₂ estabilizado y el cromógeno se equilibraron a 37 °C, exactamente 5 min antes de ser utilizados. El blanco se preparó agregando 20 µl de agua bidestilada en una celda y 1 ml del cromógeno. En otra celda se preparó el estándar, agregando 20 µl de Trolox y 1 ml de cromógeno, y se leyó la absorbancia inicial (A₀) en ambos. Los extractos de los frutos de tomate se analizaron al colocar 20 µl de extracto centrifugado y 1 ml de cromógeno, se mezclaron y se leyó la absorbancia inicial, se añadieron 200 µl del H₂O₂ estabilizado diluido, se mezclaron y se tomó el tiempo de inicio simultáneamente. La absorbancia final (A) se midió después de tres minutos del desarrollo de color. La temperatura se mantuvo a 37 °C durante toda la prueba. La capacidad antioxidante en las muestras se calculó utilizando la concentración del estándar Trolox.

El gradiente de la absorbancia (ΔA) para las muestras (ΔA_m), el estándar (ΔA_e) y el blanco (ΔA_b) se determinaron con la siguiente ecuación general: ΔA = A - A₀.

Se calculó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) con la fórmula:

$$CAET \text{ (mM)} = \frac{\text{concentración del estándar Trolox (1.5 mM)} \times [\Delta A_b - \Delta A_m]}{\Delta A_b - \Delta A_e}$$

Los resultados se expresaron como mM de equivalentes de Trolox por mg de peso fresco de muestra.

Determinación de la concentración de licopeno

Se pesaron 3 g de pericarpio del fruto de tomate, se colocaron en un mortero congelado que contenía 3 ml de amortiguador de fosfatos (pH 7) y se molió, de la mezcla se colocaron 2 ml en tubos de centrifuga, se agregaron 4 ml de la mezcla hexano - acetona (3:2), se agitó la mezcla para separar y disolver los pigmentos de las membranas (Davis *et al.*, 2003), se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min para la separación de fases, se extrajo la fase coloreada y se leyó la absorbancia a 502 nm (A_{502}) en un espectrofotómetro Milton Roy Co. El contenido de licopeno se calculó con la fórmula: Licopeno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) = $A_{502} \times \left[\frac{1}{320} \right] \times 4$ (Fish *et al.*, 2002).

Determinación de la actividad catalasa

La extracción se realizó de 0.5 g de pulpa de tomate sin cáscara en 5 ml de amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 7), 50 mg de polivinilpirrolidona en un mortero enfriado a 4 °C, se centrifugó a 3,000 rpm por 11 min a 4 °C. Del sobrenadante se obtuvo la enzima (Masia, 1998). Para la determinación de la actividad enzimática de la catalasa (EC 1. 11. 1. 6) (IUBMB, 2007a) se prepararon 5 ml de la mezcla de reacción que contenía: 300 μM de amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 6.8), 100 μM de H_2O_2 y 1 ml del sobrenadante con la enzima, previamente diluido de 1:20. La mezcla de reacción se incubó por 1 min a temperatura constante 25 °C, la reacción fue detenida al agregar 10 ml de H_2SO_4 al 2 % (v/v). El H_2O_2 residual se tituló con una solución de KMnO_4 (0.2 M) hasta obtener un color púrpura débil que persistió al menos 15 s. Una unidad de catalasa se definió como la cantidad de enzima que descompone 1 μM de $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ a 25 °C.

Determinación de la actividad peroxidasa

Se homogenizaron 0.5 g de pulpa de tomate sin cáscara con 5 ml de amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 6.8), en un mortero enfriado a 4 °C, se centrifugó a 3,000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante que contiene la enzima peroxidasa (EC 1. 11. 1. 7) (IUBMB, 2007b) se separó y diluyó en una proporción de 1:20 (v/v). La actividad enzimática se determinó con 125 μM de amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 6.8), 50 μM de pirogalol, 50 μM de H_2O_2 y 1 ml de extracto de enzima diluido de 1:20 para obtener 5 ml de volumen. La mezcla de reacción se incubó por 1 min a 25 °C, se añadieron 0.5 ml de H_2SO_4 al 5 % (v/v) para detener la reacción. La concentración de purpurogalina se midió a una absorbancia de 420 nm (A_{420}), utilizando el espectrofotómetro previamente referido (Kar y Mishra, 1976).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total mostró diferencias significativas entre tratamientos en su triple interacción (Figura 1).

La aplicación de cualquiera de las dosis de P-Ca

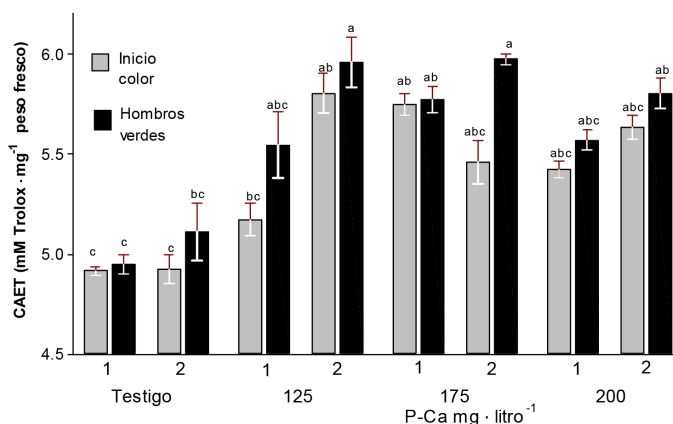


FIGURA 1. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox en frutos de tomate variedad Floradade en respuesta a las aplicaciones con prohexadiona de calcio. Las barras representan el promedio de tres repeticiones \pm error estándar (Tukey, $P \leq 0.01$).

aumentó significativamente ($P \leq 0.01$) la CAET en las dos etapas de maduración con una o dos aplicaciones. Esta diferencia parece señalar al retardante como un promotor del sistema antioxidante en el fruto del tomate. La literatura en donde se señale la posible influencia de P-Ca en el contenido de antioxidantes totales en frutos, es muy escasa (Disegna *et al.*, 2006). Se sabe que P-Ca es capaz de modificar la ruta biosintética de los flavonoides en frutos de manzano, generando nuevos flavonoides que al parecer poseen actividad antioxidante en hojas jóvenes y en los mismos frutos (Rademacher *et al.*, 2006). Jiménez *et al.* (2002), reportaron que los niveles de antioxidantes en la fase acuosa, glutatión y ascorbato se acrecentaron durante el proceso de maduración asociándolos con cambios significativos en el estatus redox del fruto. Además, registraron cambios en actividad de la superóxido dismutasa, catalasa y de otras enzimas que intervienen en el ciclo ascorbato-glutatión durante el proceso de maduración del tomate, indicando que el sistema antioxidante desempeña un papel primordial en este proceso. Es probable que P-Ca contribuya a fortalecer este proceso y por lo tanto sería muy interesante elucidar el efecto directo del retardante en futuros estudios.

La concentración de 125 $\text{mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ de P-Ca incrementó significativamente ($P \leq 0.01$) la CAET, en comparación con el testigo cuando se realizaron dos aplicaciones del retardante en hombros verdes. Se observó una tendencia consistente a incrementar la CAET de acuerdo al estadio de maduración, y al número de aplicaciones.

La concentración de 175 $\text{mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ de P-Ca no mostró una tendencia clara en la CAET, siendo mayor en frutos en hombros verdes en comparación con frutos al inicio de color ($P \leq 0.01$). Una sola aplicación de esta dosis en inicio de color fue superior ($P \leq 0.01$) a dos aplicaciones en este estadio, pero la mayor CAET se encontró con dos aplicaciones en hombros verdes ($P \leq 0.01$).

La concentración de 200 $\text{mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ de P-Ca mostró una tendencia similar a la que provocó la concentración de 125 $\text{mg} \cdot \text{litro}^{-1}$. En ocasiones, P-Ca aplicado a concentracio-

nes de $200 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ en tomate refleja menos antioxidantes en sus frutos, aparentemente como resultado de una concentración supraóptima (Rademacher, 2000). La CAET se incrementó en los estadios inicio de color y hombros verdes, con una y dos aplicaciones. Dos aplicaciones de $200 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ de P-Ca provocaron mayor CAET ($P \leq 0.01$) en frutos en hombros verdes que una sola o dos aplicaciones en inicio de color. Estos resultados concuerdan con los de Disegna *et al.* (2006), quienes al realizar aplicaciones repetidas de P-Ca en uvas para vino, cosecharon frutos con un mayor contenido de antioxidantes, en particular de antocianinas y una mayor persistencia e intensidad aromática. Martínez *et al.* (2002), al cuantificar la actividad antioxidante de nueve variedades de tomates, empleando dos métodos (DPPH y CAET) reportaron una diferencia significativa entre variedades y el método empleado. Las diferencias existentes entre métodos se deben al principio en el cual se desarrolló cada uno (Cao y Prior, 1998; Prior *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2004). Por ejemplo, Wang *et al.* (1996) al determinar la capacidad antioxidante en frutos de tomate con el método ORAC, reportaron $1.89 \text{ mM Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco; mientras que en el presente estudio se obtuvieron valores entre 4.9 y $5.1 \text{ mM Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco en frutos de plantas testigo.

Concentración de licopeno

La concentración de licopeno en frutos de tomate de plantas tratadas mostró diferencias sustanciales ($P \leq 0.01$) en su triple interacción (Figura 2).

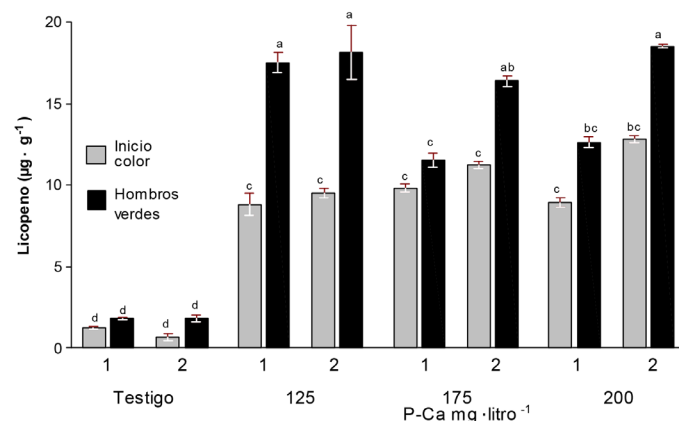


FIGURA 2. Contenido de licopeno en frutos de tomate variedad Floradade en respuesta a las aplicaciones con prohexadiona de calcio. Las barras representan el promedio de tres repeticiones \pm error estándar (Tukey, $P \leq 0.01$).

El contenido de licopeno aumentó significativamente ($P \leq 0.01$) de cuatro a ocho veces con relación al testigo, cuando se aplicó cualquiera de las concentraciones de P-Ca en una o dos aplicaciones. Las concentraciones más altas de licopeno se obtuvieron al aplicar P-Ca en hombros verdes (ocho veces la concentración del testigo). La aplicación en inicio de color provocó concentraciones de licopeno cuatro veces más altas que el testigo (Figura 2). Dentro de la concentración de $125 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ de P-Ca

existió diferencia significativa ($P \leq 0.01$) entre los estadios de maduración, pero no entre el número de aplicaciones. Esto sugiere que la dosis de $125 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ de P-Ca es la óptima para incrementar la concentración de licopeno en el fruto cuando éste alcance la madurez de cosecha.

El factor primordial en la concentración de licopeno en el fruto es el grado de maduración, puesto que frutos en hombros verdes registraron mayor concentración de licopeno comparados con frutos en estadio al inicio de color.

El ciclo de cultivo (Ciruelos *et al.*, 2003) o la variedad (Jiménez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2002) son factores que causan una variación en la concentración del licopeno en frutos del tomate. Con esas experiencias, es probable que P-Ca estimule la extensión de producción de licopeno en los frutos aquí estudiados, como ha sido ya reportado en brócoli, en cuyos frutos P-Ca aumentó el contenido de vitamina C (Rademacher *et al.*, 2006).

Actividad enzimática

Catalasa

La determinación de la actividad catalasa en los frutos de tomate de plantas tratadas con el retardante mostró diferencia ($P \leq 0.01$) en la interacción concentración-número de aplicaciones (Figura 3). La actividad de la enzima, aumentó con P-Ca a cualquier concentración y frecuencia de aplicaciones. La concentración de P-Ca a $200 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ mostró una actividad de la catalasa similar a la concentración del retardante a $125 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$. Este efecto, puede reflejar un comportamiento de concentración supraóptima del P-Ca como se ha demostrado en otros cultivos hortícolas como brócoli y repollo (Rademacher *et al.*, 2006).

Con dos aplicaciones de $175 \text{ mg} \cdot \text{litro}^{-1}$ de P-Ca se obtuvo el valor más alto de la actividad de catalasa, el cual fue de hasta tres veces superior al testigo ($P \leq 0.01$). Sin embargo, las tres concentraciones del P-Ca provocaron niveles de la actividad catalasa significativamente superiores al testigo. No existió diferencia entre una y dos aplicaciones. La catalasa es una enzima relacionada con el control celular de los niveles de especies activas de oxígeno, catalizando la dismutación del H_2O_2 en H_2O y O_2 (Acevedo y Scandalios, 1991; Gosch *et al.*, 2003; Roemelt *et al.*, 2003a). Un aumento en los niveles de actividad catalasa se relacionan con una mayor tolerancia al daño oxidativo por frío (Crookes y Grierson, 1983; Jiménez *et al.*, 2002; Lafuente *et al.*, 2004). Puede suponerse también, que el efecto fue consecuencia de la activación de algunos genes relacionados con la defensa celular contra el estrés (Ding *et al.*, 2002; Soh *et al.*, 1994).

Peroxidasa

La actividad peroxidasa mostró un incremento relacionado con las concentraciones de P-Ca. Todas las concentra-

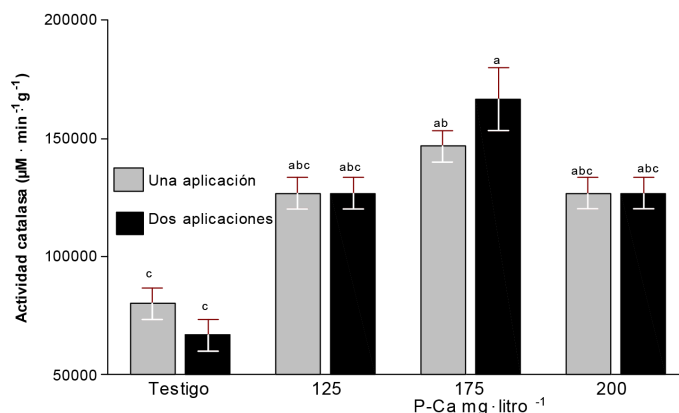


FIGURA 3. Actividad catalasa en frutos de tomate variedad Floradade en respuesta a las aplicaciones con prohexadiona de calcio. Las barras representan la media de tres repeticiones \pm error estándar (Tukey, $P \leq 0.01$).

ciones del retardante fueron superiores ($P \leq 0.01$) al testigo, la concentración más alta (200 mg · litro⁻¹ de P-Ca) con dos aplicaciones provocó la mayor actividad de la enzima (Figura 4). Al parecer, aún es posible generar una mayor actividad peroxidasa en frutos de tomate al incrementar la concentración de P-Ca. Este efecto se observa también cuando se aplican temperaturas altas como inductor de tolerancia al estrés en frutos de mandarina (Andrews *et al.*, 2004; Lepeduš *et al.*, 2005), o bajas temperaturas en trigo (Edreva *et al.*, 1993). Por otra parte, la activación de la enzima peroxidasa está correlacionada con las respuestas de defensa del fruto en presencia de patógenos (Maksimov *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente: Prohexadiona de calcio aumenta sustancialmente la capacidad antioxidante total y la concentración de licopeno en frutos de tomate en los grados de madurez inicio de color y hombros verdes. La actividad de las enzimas catalasa y peroxidasa en frutos maduros se incrementa significativamente con el retardante del crecimiento. Lo anterior resulta en un tomate de mejor calidad para el

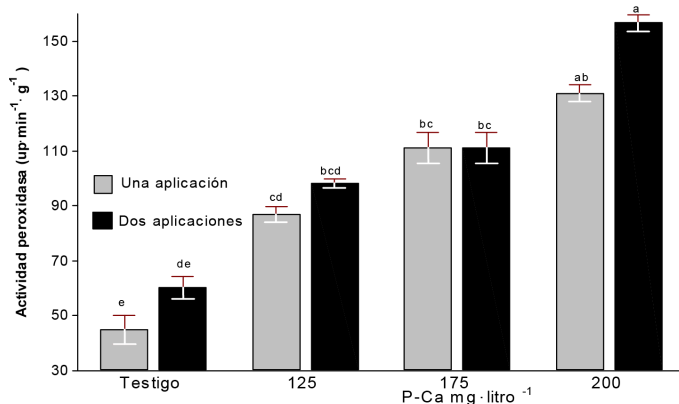


FIGURA 4. Actividad peroxidasa en frutos de tomate variedad Floradade en respuesta a las aplicaciones con prohexadiona de calcio. Las barras representan la media de tres repeticiones \pm error estándar (Tukey, $P \leq 0.01$).

consumo humano.

LITERATURA CITADA

- ACEVEDO, A.; SCANDALIOS, J. C. 1991. Catalase and superoxide dismutase gene expression and distribution during stem development in maize. *Development Genetics* 12(6): 423-430.
- ANDREWS, P. K.; FAHY, D. A.; FOYER, C. H. 2004. Relationships between fruit exocarp antioxidants in the tomato (*Lycopersicon esculentum*) high pigment⁻¹ mutant during development. *Physiology Plantarum* 120(4): 519-528.
- CAO, G.; PRIOR, R. L. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinic Chemistry* 44(6): 1309-1315.
- CHIU, C.; YAN, C.; ON, K.; WAI, K.; SUN, K.; SCOTT, M.; PUI, C. 2004. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clinic Chemistry* 50(5): 952-954.
- CIRUELOS, A.; DE LA TORRE, R.; GONZÁLEZ, C.; ARENAS, A.; LÓPEZ, J. 2003. Estudio comparativo del contenido en pigmentos carotenoides en variedades de distinto ciclo vegetativo de tomate de industria. *Actas Horticulturae* 39: 361-362.
- CROOKES, P. R.; GRIERSON, D. 1983. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiology* 72: 1088-1093.
- DAVIS, A. R.; FISH, W. W.; PERKINS, P. 2003. A rapid hexane – free for analyzing lycopene content in watermelon. *Journal Food Science* 68(1): 328-332.
- DING, C. K.; WANG, C.; GROSS, K. C.; SMITH, D. L. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214(6): 985-901.
- DISEGNA, E.; BOIDO, E.; CARRAU, F.; FARIÑA, L.; MEDINA, K.; MÉNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, P.; DELLACASSA, E. 2006. Efectos de la aplicación del regulador del crecimiento 3,5-dioxo-4-propionilciclohexancarboxilato de calcio (BAS 125) en la producción de uvas, composición del vino y aroma del cv. "tannat". <http://www.inia.org.uy/eventos/M&E-9.pdf> (20 de agosto de 2006).
- EDREVA, A.; SALCHEVA, G.; GEORGIEVA, D. 1993. Stress damage is related to peroxidase induction in wheat plants. In: WELINDER, K. G.; S. RASSMUSEN, K.; C. PENEL; H. GREPPIN. (eds). *Plant Peroxidases, Biochemistry and Physiology*. University of Geneva. pp:401-404.
- EVANS, J. R.; EVANS, R. R.; REGUSCI, C. L.; RADEMACHER, W. 1999. Mode of action, metabolism, and uptake of BAS 125 W, prohexadione-calcium. *HortScience* 34(7): 1200-1201.
- FISH, W. W.; PERKINS, P.; COLLINS, J. K. 2002. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal Food Composites Annals* 15(3): 309-317.
- GOSCH, C.; PUHL, I.; HALBWIRTH, H.; SCHLANGEN, K.; ROEMMELT, S.; ANDREOTTI, C.; COSTA, G.; FISCHER, T. C.; TREUTTER, D.; STICH, K.; FORKMANN, G. 2003. Effects of prohexadione-Ca on various fruit crops: Flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *European Journal Horticulture Sciences* 68(3): 144-151.
- HALBWIRTH, H.; FISCHER, T. C.; ROEMMELT, S.; SPINELLI, F.; SCHLANGEN, K.; PETEREK, S.; SABATINI, E.; MESSINA, C.; SPEAKMAN, J. B.; ANDREOTTI, C.; RADEMACHER, W.; BAZZI, C.; COSTA, G.; TREUTTER, D.; FORKMANN, G.; STICH, K. 2003. Induction of antimicrobial 3-deoxyflavonoids in pome fruit trees controls fire blight. *Zeitschrift für*

Naturforschung 58: 765-770.

- IUBMB. 2007a. Enzyme Nomenclature (Catalase). <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/6.html> Consultado 2 de marzo de 2007
- IUBMB. 2007b. Enzyme Nomenclature (Peroxidase). <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html> Consultado 2 de marzo de 2007
- JIMENEZ, A.; CREISSEN, G.; KULAR, B.; FIRMIN, J.; ROBINSON, S.; VERHOEYEN, M.; MULLINEAUX, P. 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* 214(5): 751-758.
- KAR, M.; MISHRA, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.
- LAFUENTE, M. T.; SALA, J. M.; ZACARIAS, L. 2004. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Journal Agriculture Food Chemistry* 52(11): 3606-3611.
- LEPEDUŠ, H.; JOZIĆ, M.; ŠTOLFA, I.; PAVIČIĆ, N.; HACKENBERGER, B. K.; CESAR, V. 2005. Changes in peroxidase activity in the peel of unshiu mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with different storage treatments. *Food Technology Biotechnology* 43(1): 71-77.
- MAKSIMOV, I. V.; CHEREPANOVA, E. A.; KHAIRULLIN, R. M. 2003. Chitin-specific peroxidases in plants. *Journal Biochemistry* 68(1): 111-115.
- MARTÍNEZ, I.; PERIAGO, M. J.; PROVAN, G.; CHESSON, A. 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal Science Food Agriculture* 82(3): 323-330.
- MASIA, A. 1998. Superoxide dismutase catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. *Physiology Plantarum* 104: 668-672.
- MILLER, N. J.; RICE, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinic Science* 84(4): 407-412.
- PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, J. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal Agriculture Food Chemistry* 51: 3273-3279.
- RADEMACHER, W. 1993. On the mode of action of acylcohexadiones-a new type of plant growth retardant with possible relationships to daminozide. *Acta Horticulturae* 329: 31-34.
- RADEMACHER, W. 2000. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review Plant Physiology* 51: 501-531.
- RADEMACHER, W.; SPINELLI, F.; COSTA, G. 2006. Prohexadione -Ca: Modes of action of a multifunctional plant bioregulator for fruit trees. *Acta Horticulturae* 727: 97-106.
- ROEMMELT, S.; ZIMMERMANN, N.; RADEMACHER, W.; TREUTTER, D. 2003a. Formation of novel flavonoides in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry* 64: 709-716.
- ROEMMELT, S.; FISCHER, T. C.; HALBWIRTH, H.; PETEREK, S.; SCHLANGEN, K.; SPEAKMAN, J. B.; TREUTTER, D.; FORKMANN, G.; STICH, K. 2003b. Effect of dioxygenase inhibitors on the resistance-related flavonoid metabolism of apple and pears: Chemical, biochemical and molecular biological aspects. *European Journal Horticulture Science* 68(3): 129-136.
- SAS INSTITUTE. 2000. SAS/STAT. User's Guide. Release 8.1 ed. SAS Institute Incorporation. Cary, North Carolina.
- SOH, C. H.; KAMIYA, Y.; YOSHIDA, S.; YAMANE, H.; TAKAHASHI, N. 1994. Effects of gibberellins and Prohexadione on the activities of oryzain and α -amylase in rice seeds. *Plant Cell Physiology* 35(7): 1037-1042.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal Agriculture Food Chemistry* 44(3): 701-705.