



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Análisis de la calidad organoléptica y nutricional durante la postcosecha de brócoli (*Brassica oleraceae*): evaluación de metabolismos asociados.”

Tesista: Andrea Milagros Reyes Jara

Director/a: Gustavo Adolfo Martínez

Codirector/a: María Eugenia Gómez Lobato

Año: 2020

Agradecimientos

A mi mamá, por estar siempre presente y por acompañarme en cada paso.

A mis hermanas, por su apoyo incondicional y por demostrarme cada día que cuento con ellas.

A Andrés, por acompañarme estos 5 años (y algunos más), por apoyarme y por estar ahí para las dudas, miedos, broncas y festejos, brindando siempre el impulso que a veces necesito.

A Vane, por escucharme y aconsejarme durante todo este tiempo, por los mates compartidos, y los comentarios nerd.

A mis compañeros del laboratorio, para los que ya no están, para los que recién llegaron, gracias por acompañarme todo este tiempo y por enseñarme muchas cosas, más allá de las académicas.

A mis compañeros de INFIVE, por ser como son, tan cálidos y humanos. No pude haber elegido un mejor lugar para la realización de mi tesis, y eso en parte es gracias a ustedes.

A mis directores, Gustavo, Eugenia y Marcos, por su acompañamiento todos estos 5 años, por sus consejos, por estar presentes frente a dudas e inquietudes, y por ayudarme a iniciar mi carrera en el ambiente científico.

A la Facultad, por formarme como profesional y brindarme la casa donde habité tanto tiempo.

Al CONICET, por brindarme la oportunidad de realizar mi doctorado.

A todos ellos, mi más sincero reconocimiento.

La siguiente tesis doctoral se encuentra inscripta (Exp. N°0700-004891/15-000) en la carrera de doctorado para acceder al doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas en el área Ciencias Biológicas (Cat. A Res 747/13 CONEAU).

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la etapa experimental han sido publicados tanto en forma de póster en congresos y jornadas nacionales e internacionales, como en revistas con referato internacional. Los mismos se listan a continuación:

Trabajos publicados en revistas internacionales

Mauro A. Perini, Ignacio N. Sin, **Andrea M. Reyes Jara**, María E. Gómez Lobato, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez. "Hot water treatments performed in the base of the broccoli stem reduce postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var *italic*) heads stored at 20 °C." *LWT - Food Science and Technology* 77 (2017) 314-322.

Andrea M. Reyes Jara, María E. Gómez-Lobato, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez. "Effects of hormonal and physical treatments on the expression of a putative chlorophyll b reductase gene (*BoNYC1*) during postharvest senescence of broccoli." *Postharvest Biology and Technology* 147 (2019) 107–112.

Victoria Casajús, **Andrea Reyes Jara**, Gustavo Gergoff, María Gómez Lobato, Pedro Civello, Gustavo Martínez. "The time of the day to harvest affects the degreening, antioxidant compounds, and protein content during postharvest storage of broccoli." *J Food Biochem* 43 (2019) 1-9.

Trabajos publicados en Congresos o Jornadas

Reyes Jara, Andrea M.; Gómez Lobato, M. Eugenia; Civello, P. Marcos y Martinez, Gustavo. "Clonado y caracterización de la expresión de *BoNYC1* durante la senescencia postcosecha en brócoli. Efecto de reguladores del crecimiento." VIII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha 2015. 10, 11 y 12 de noviembre 2015. Balcarce, Buenos Aires. Forma de participación: Póster. Resumen publicado en Actas de Congreso.

Reyes Jara A.; Gómez Lobato M.; Martínez G. y Civello M. "Análisis de la expresión del gen *BoNYC1* en brócoli sometido a distintos tratamientos físicos que retrasaron su senescencia poscosecha." I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha/ IX Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha. 25, 26 y 27 de octubre 2017. Concordia, Entre Ríos. Forma de participación: Póster. Resumen publicado en Actas de Congreso.

Reyes Jara A., Sin I., Perini M., Lobato M., Civello M. y Martínez G. "Tratamiento térmico sobre el tallo de brócoli reduce la senescencia poscosecha de las cabezas de brócoli almacenadas a 20 °C." I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha/ IX

Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha. 25, 26 y 27 de octubre 2017. Concordia, Entre Ríos. Forma de participación: Póster. Resumen publicado en Actas de Congreso.

Reyes Jara, Andrea M.; Gómez Lobato, M. Eugenia; Civello, Marcos; Martínez, Gustavo. “Análisis genético de las enzimas Chalcona sintasa (BoCHS) y Chalcona isomerasa (BoCHI) en brócoli cosechado en distintos horarios del día”. II Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha/ X Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha. 11, 12 y 13 de septiembre 2019. Ciudad de Santiago del Estero, Santiago del Estero. Forma de participación: Póster. Resumen publicado en Actas del Congreso.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2.1. Acerca de la planta de Brócoli	2
2.1.1. Origen del cultivo	2
2.1.2. Clasificación botánica.....	2
2.1.3. Fisiología del brócoli	3
2.1.4. Aspectos nutricionales	4
2.1.5. Importancia comercial	5
2.1.6. Cosecha del brócoli.....	5
2.2. Senescencia	6
2.2.1. Procesos asociados a la senescencia.....	6
2.2.2. Regulación hormonal de la senescencia	8
2.2.3. Senescencia en brócoli.....	10
2.3. Antioxidantes	10
2.3.1. Rol de los antioxidantes en las plantas	11
2.3.2. Antioxidantes en brócoli	12
2.4. Tratamientos poscosecha	12
2.4.1. Tratamientos con 1-MCP	13
2.4.2. Atmósferas modificadas	13
2.4.3. Tratamientos con Luz Blanca	14
2.4.4. Tratamientos con radiación UV-C	15
2.4.5. Tratamiento térmico.....	16
3. Materiales y Métodos	17
3.1. Recolección y acondicionamiento del material vegetal	17
3.2. Cosecha a distintas horas del día	17
3.3. Estudio de la senescencia de la planta	18
3.4. Estudios hormonales	19
3.5. Tratamientos postcosecha	19
3.5.1. Tratamiento con radiación UV-C.....	19
3.5.2. Tratamiento con luz blanca.....	19
3.5.3. Tratamiento con atmósfera modificada	20
3.5.4. Tratamiento térmico.....	20
3.5.5. Tratamiento con 1-MCP	20
3.6. Medida del color superficial	20
3.7. Determinación del contenido de clorofilas	21
3.8. Determinación del contenido de fenoles totales	21

3.9. Determinación del contenido de flavonoides	21
3.10. Extracción de ARN.....	22
3.11. Cuantificación de ARN	23
3.12. Purificación de ARN	23
3.13. Transcripción reversa.....	23
3.14. Geles de agarosa para visualizar productos de PCR.....	24
3.15. Geles de agarosa para corroborar integridad de ARN	24
3.16. Diseño de cebadores	25
3.17. PCR a punto final.....	25
3.18. PCR en tiempo real	26
3.19. Secuencias nucleotídicas utilizadas	27
3.20. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	28
3.21. Secuenciación de fragmentos de ADN.....	28
3.22. Análisis bioinformático de los fragmentos secuenciados	28
3.23. Análisis de la región promotora	28
3.24. Análisis estadístico de los datos.....	29
4. PARTE A: Caracterización de genes asociados a la vía de degradación de clorofilas.....	30
4.1. Introducción.....	30
4.2. Objetivos específicos	34
4.3. Resultados y discusión	35
4.3.1. Análisis de la región promotora	35
4.3.2. Diseño de cebadores específicos	36
4.3.3. Expresión durante la senescencia.....	38
4.3.4. Estudio en las distintas secciones de brócoli	39
4.3.5. Tratamientos hormonales.....	41
4.3.6. Tratamiento con 1-MCP.....	43
4.3.7. Tratamiento con Atmósfera modificada	46
4.3.8. Tratamiento Térmico	48
4.3.9. Tratamiento con Luz Blanca.....	51
4.3.10. Tratamiento con radiación UV-C.....	53
4.3.11. Ensayo de Tres Cosechas	55
4.4. Conclusiones parciales.....	59
5. PARTE B: Caracterización de genes asociados a la vía de síntesis de compuestos flavonoides	62
5.1. Introducción.....	62
5.2. Objetivos específicos	67
5.3. Resultados y discusión	68
5.3.1. Diseño de cebadores específicos	68

5.3.2. Estudio durante la senescencia.....	69
5.3.3. Estudio en las distintas secciones de brócoli	70
5.3.4. Tratamientos hormonales.....	72
5.3.5. Tratamiento con 1-MCP.....	75
5.3.6. Tratamiento con atmósfera modificada	77
5.3.7. Tratamiento Térmico	79
5.3.8. Tratamiento con Luz Blanca.....	82
5.3.9. Tratamiento con radiación UV-C.....	84
5.3.10. Ensayo de Tres Cosechas	86
5.4. Conclusiones parciales.....	89
6. Conclusiones Generales.....	92
7. Bibliografía	96

1. Resumen

El brócoli es una hortaliza ampliamente consumida y cuya producción se halla en continuo crecimiento a nivel mundial. Se trata de un vegetal que tiene un buen aporte nutricional debido a su contenido de proteínas y vitaminas, además de tener un bajo valor calórico y alto aporte de fibra. El brócoli contiene compuestos de elevado valor nutracéutico, como son los flavonoides y los glucosinolatos, los cuales presentan numerosos beneficios a la salud humana, como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y anticancerígenas.

La parte comestible de la planta de brócoli es su inflorescencia, se trata de un órgano que, al momento de la cosecha, se encuentra en pleno desarrollo y, por lo tanto, la demanda de agua, hormonas y nutrientes, es alta. Es debido a esto último que la cosecha le ocasiona un importante estrés y una senescencia acelerada. Este proceso de senescencia provoca el amarillamiento del órgano junto con la pérdida de proteínas, azúcares, compuestos antioxidantes, como el ácido ascórbico, y glucosinolatos.

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado a lo largo de varios años diversos tratamientos poscosecha, buscando prolongar la vida del brócoli. Los tratamientos analizados fueron: radiación UV-C, tratamientos térmicos, atmósferas modificadas y luz visible. Y también se realizaron estudios fisiológicos con hormonas vegetales vinculadas al proceso de senescencia, como citoquininas y etileno. Estos estudios brindaron herramientas para la manipulación poscosecha de brócoli. También se ha comprobado que estos tratamientos producen cambios a nivel de expresión génica en brócoli, tanto en la vía de degradación de clorofilas como en la vía de biosíntesis de compuestos flavonoides.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR*, codificantes de las primeras enzimas de la vía de degradación de clorofilas; y analizar la expresión de los genes *BoCHS* y *BoCHI*, que codifican para las primeras enzimas en actuar en la formación del esqueleto primario de los flavonoides, en los distintos tratamientos analizados en brócoli.

Los resultados del presente trabajo señalan que *BoNYC1* sería un gen altamente regulado, a diferencia de *BoNOL* y *BoHCAR* de menor respuesta frente a los distintos estímulos. Se observó que en muchos de los tratamientos la expresión de estos genes se reprimió, correlacionando con una retención en el contenido de clorofilas ocasionada por los tratamientos poscosecha. Mientras que, en otros ensayos, se observó que estos genes presentaron comportamientos diversos, señalando participación en otras vías metabólicas u otra forma de regulación.

Por otro lado, la expresión de *BoCHS* y *BoCHI* fue bastante afectada por los tratamientos, indicando que es una vía de rápida respuesta frente a los agentes externos como la luz solar y la temperatura. Se observó un comportamiento compatible con un ciclo circadiano en ambos genes. Los ensayos de luz visible y radiación UV-C verificaron, además, un incremento en el contenido de flavonoides.

2. Introducción

2.1. Acerca de la planta de Brócoli

2.1.1. Origen del cultivo

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) es una planta nativa de la región mediterránea de Europa y Asia Occidental, su nombre proviene del plural de la palabra italiana *broccolo*, que deriva del latín *brachium* que significa brazo o rama. Fue cultivada para su consumo en Italia durante la época del Imperio Romano, y luego introducida a Inglaterra cerca del 1720. Ya para mediados del siglo XX su producción se desarrolló por toda Europa, y se extendió al resto de los países. (Gray, 1982)



Figura 1: Imagen de una planta de brócoli con su pella apta para ser cosechada.

2.1.2. Clasificación botánica

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) pertenece a la familia *Brassicaceae*, anteriormente denominada *Cruciferae* (Crucíferas) debido a la forma de las flores, con 4 pétalos dispuestos en forma de cruz. Esta familia está compuesta por 375 géneros y más de 3.000 especies, siendo el género *Brassica* el de mayor número de especies.

La especie *Brassica oleracea* es sumamente polimorfa, fue sometida por miles de años a selección artificial dando lugar a la aparición de variaciones de la planta con diferencias drásticas en su aspecto, es decir, distintos rasgos fenotípicos. La preferencia por hojas, brotes terminales, brotes laterales, tallos e inflorescencias dio lugar a la selección de las variedades de coles que hoy se conocen. En Argentina, el investigador Lorenzo Parodi las describió botánicamente en el año 1959. Se distinguen así, al menos siete variedades botánicas que provienen de la misma especie silvestre. En la Tabla 1 se muestran las distintas variedades consumidas en la actualidad y generadas a partir de la especie silvestre de *Brassica oleracea*.

Tabla 1: Hortalizas más consumidas de la especie *Brassica oleracea*.

Variedad botánica	Nombre común
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>itálica</i>	Brócoli
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>	Kale y Berza verde
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>alboglabra</i>	Kai-lan
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i>	Coliflor
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>	Repollo
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i>	Repollitos de Bruselas
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>congylodes</i>	Colirrábano

Dentro de la familia *Brassicaceae* se encuentra la especie *Arabidopsis thaliana*, el organismo modelo para el estudio de la fisiología vegetal. Con solo 5 cromosomas, totalmente secuenciados desde el año 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative 2000), *Arabidopsis thaliana* se convirtió en la primera planta modelo en tener su genoma secuenciado. Desde su publicación ha habido un continuo esfuerzo por completar las secuencias y mejorar las anotaciones génicas.

Estudios de genómica comparativa entre los géneros *Brassica* y *Arabidopsis* han revelado una extensa sintenia entre ambas especies, sugiriendo que el conocimiento obtenido por una especie podría ser productivamente aplicado a la otra. La conservación nucleotídica entre estas dos especies fue reportada en el rango de 70-90% en exones, mientras que en intrones y regiones intergénicas es menos del 70% (Ayele *et al.*, 2005).

2.1.3. Fisiología del brócoli

El brócoli es una planta anual, de hábito de crecimiento erecto, con una altura cercana a los 60 cm, conformada por grandes hojas que recubren una masa densa y compacta de yemas florales denominada pella o cabeza, su inflorescencia, que es la parte comestible de la planta. La cabeza, de color verde grisáceo o morado, puede alcanzar 20 a 35 cm de diámetro, dependiendo del cultivar. Esta necesita vernalización para producir el vástago floral (Díaz y Jaramillo, 2006).



Figura 2: Detalle de las flores del brócoli.

Luego de unos pocos días la cabeza pierde compacidad ya que las yemas florales se separan y se inicia la aparición de las puntas amarillas de los pétalos con lo que deja de tener valor comercial. Esta apertura floral se puede apreciar en la Figura 2.

La superficie foliar está recubierta de ceras epicuticulares que dificultan el mojado causando el escurrimiento del agua. Los tallos son herbáceos, cilíndricos; el tallo principal es relativamente grueso (3 a 6 cm diámetro), de 20 a 50 cm de alto, sobre el cual se disponen las hojas en forma helicoidal, con entrenudos cortos. Las raíces son ramificadas, profundas, extendiéndose alrededor del tallo de 45 a 60 centímetros.

2.1.4. Aspectos nutricionales

Los vegetales del género Brassica, como el brócoli, son muy populares y se encuentran dentro de los vegetales más consumidos a nivel mundial. De acuerdo con datos de la División de Estadística de la FAO (FAOSTAT) en los últimos 20 años la producción de los mismos se ha incrementado notablemente, esto ha ido de la mano de las nuevas tendencias en alimentación que buscan alternativas más saludables. Uno de los motivos de la creciente demanda de esta hortaliza se debe a su elevado valor nutricional (Tabla 2), destacando un alto contenido de proteínas, vitamina A, vitamina K, vitamina C (100 g de producto cubriría las necesidades diarias de un adulto de esta vitamina), y vitaminas del complejo B. También presentan un buen aporte de carotenos (especialmente betacarotenos), fibra y un bajo aporte de calorías (Díaz y Jaramillo, 2006).

Tabla 2: Aporte nutricional cada 100 g de brócoli

	Unidad/100 g de producto		Unidad/100 g de producto
Energía	35 Kcal	<i>Vitaminas</i>	
Agua	89,25 g	Vit. C	64,9 mg
Proteína	2,38 g	Tiamina (Vit. B1)	0,063 mg
Lípidos totales	0,41 g	Riboflavina (Vit. B2)	0,123 mg
Carbohidratos	7,18 g	Niacina (Vit. B3)	0,553 mg
<i>Minerales</i>		Vit. B6	0,200 mg
Calcio	40 mg	Folato	108 µg
Hierro	0,67 mg	Vit. B12	0 µg
Magnesio	21 mg	Vit. A	77 µg
Fósforo	67 mg	Vit. E	1,45 mg
Potasio	293 mg	Vit. D	0 µg
Sodio	41 mg	Vit. K	141,1 µg
Zinc	0,45 mg	<i>Ácidos grasos</i>	
Colesterol	0 mg	Saturados	0,079 g
		Poliinsaturados	0,170 g
		Monoinsaturados	0,040 g

Fuente: Butnariu y Butu (2015) "Chemical composition of vegetables and their products." Handbook of Food Chemistry.

Otro factor clave para este aumento en el consumo de brócoli es la abundancia de compuestos promotores de la salud o compuestos bioactivos. Estudios epidemiológicos han indicado que una dieta rica en estos vegetales está asociada con una reducción en el riesgo de padecer distintos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Estos beneficios para la salud se deben a la presencia de compuestos con propiedades nutraceuticas presentes en estos cultivos como son los **flavonoides** y los **glucosinolatos** (Cabrera y Mach, 2012; Faizal *et al.*, 2013). Estos últimos son los responsables también del sabor y olor característicos de las hortalizas de esta familia.

2.1.5. Importancia comercial

La FAO (“Food and Agriculture Organization of the United Nations”) recoge los datos de producción, exportación e importación de coliflores y brócolis conjuntamente. Al 2010 los 5 principales países productores eran China, India, Italia, Francia y España; éstos mismos al 2016 tuvieron una producción de 10.200.000 tn, 8.200.000 tn, 388.000 tn, 308.000 tn, 605.000 tn respectivamente. Otro país que ha escalado en el último tiempo en la producción y consumo de brócoli es Estados Unidos, con una producción al 2016 de 1.300.000 tn, posicionándose en el tercer lugar (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>). Como en todo el mundo, la difusión en los medios locales de las cualidades nutritivas y de las propiedades anticancerígenas del brócoli ha servido de disparador para atraer un segmento de consumidores que manifiestan una preocupación creciente por la salud. Se prevé que el consumo de las Brassicas se incrementará en países emergentes en rápido desarrollo como China, que ha tenido un incremento en el consumo *per capita* superior a 30 kg, muy por encima del promedio mundial de 10,5 kg.

En Argentina, el cultivo del brócoli presenta un desarrollo económico creciente, la zona del conurbano bonaerense es donde se concentra el 60% de la producción, seguida por Santa Fe y Córdoba con una participación aproximada de 15% cada una. No hay muchos registros al respecto, pero se sabe que en la década de los 80 se consumían 0,5 kg/habitante/año, y que durante el periodo 1990/95 los volúmenes ingresados al Mercado Central de Buenos Aires habían crecido un 265%, representando unas 2.285 t y alcanzando para el periodo 2004 a 2005 unas 15.155 t (Díaz y Jaramillo, 2006).

2.1.6. Cosecha del brócoli

El momento de cosecha es crítico y tiene una ventana de aproximadamente dos días. Si se cosecha demasiado pronto, la cabeza pesa poco y la producción baja. Cuando la recolección es tardía, los granos o yemas florales se abren mostrando pétalos de color amarillo, se aflojan las cabezas, pierden color, compacidad y aumenta la fibrosidad del tallo, lo que deriva en una baja calidad comercial, dificultando a su vez el manejo poscosecha.

Un buen índice de cosecha es el peso de la cabeza, el cual debe tener un promedio de 350 gr, dependiendo del cultivar. La cosecha se debe hacer cuando las cabezas están firmes y compactas, sin grano abierto, de color verde oscuro o verde salvia o aún con una

tonalidad verde púrpura o azulado. Algunas veces se puede obtener una segunda cosecha de rebrotes laterales que continúan desarrollándose luego de ser cortada la cabeza central, con los cuales se hacen posteriormente manojos.

La recolección de los brócolis es manual y se suele hacer en las primeras horas de la mañana. La cosecha provoca un importante estrés, debido a que se trata de un órgano en pleno desarrollo con una alta demanda de agua, nutrientes y hormonas, este estrés provoca una senescencia acelerada de las cabezas de brócoli.

2.2. Senescencia

Las plantas se desarrollan continuamente desde la germinación hasta la muerte. La última parte del proceso del desarrollo que lleva de la madurez a la completa y final pérdida de organización y funciones se denomina **senescencia** (Biwell, 1993). Se trata de un proceso complejo y altamente regulado, que, al igual que el crecimiento y la diferenciación, se lleva a cabo de forma ordenada.

La senescencia puede desencadenarse a partir de distintos estímulos iniciales, como oscuridad, privación de nitrógeno y factores medioambientales (como las horas de luz del día, y estrés biótico o abiótico), a pesar de ello, se comparte un programa interno en común donde los genes regulatorios de la senescencia inician una cascada de señal para desencadenar la expresión de otros genes que conllevan a la senescencia y la muerte. (Page *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2019) De este modo es que algunas vías metabólicas son activadas y en otras decrece su actividad.

Durante la senescencia, se expresan un gran número de enzimas hidrolíticas que degradan proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Los azúcares liberados, nucleósidos y aminoácidos son entonces transportados vía floema hacia las partes en desarrollo de la planta, en particular hacia los órganos reproductores y de almacenamiento, donde serán utilizados para procesos biosintéticos (Kuai *et al.*, 2018).

En consecuencia, el principal propósito de la senescencia en las plantas es la removilización y reciclado de nutrientes. Proceso que no tiene un tiempo estipulado, y puede abarcar tanto la planta entera como algún órgano/ tejido particular.

2.2.1. Procesos asociados a la senescencia

Degradación de pigmentos

La senescencia de las hojas es un proceso muy activo, donde los nutrientes son movilizados de las hojas senescentes hacia hojas nuevas emergentes y órganos reproductores. Los cloroplastos son las primeras organelas en deteriorarse junto con la destrucción de las proteínas tilacoides y enzimas del estroma. El amarillamiento de las hojas, causado por la degradación de las clorofilas, es el fenómeno más marcado durante este proceso. La clorofila como así otros pigmentos, como xantofilas y carotenoides, se encuentran formando parte de complejos proteicos en las membranas tilacoides, como el

fotosistema I, el fotosistema II y el complejo citocromo b6f. (Sato *et al.*, 2009). Para iniciar su degradación primero deben ser liberados de estos complejos, etapa que no se encuentra por completo dilucidada.

Este proceso de desensamble y otros se producen durante la transición de cloroplasto a gerontoplasto (cloroplasto senescente). El metabolismo de los gerontoplastos es principalmente catabólico, y se caracteriza por la degradación de pigmentos y proteínas. En muchas especies se ha comprobado que la senescencia foliar es reversible, indicando que los gerontoplastos maduros retienen suficiente información genética como para revertir a cloroplastos, y donde las hormonas citoquininas jugarían un rol importante (Biswal *et al.*, 2012). Por lo tanto, la senescencia se encuentra permanentemente regulada.

Degradación de proteínas

Muchos compuestos poliméricos, como las proteínas y el ARN se producen cíclicamente en una hoja con metabolismo activo; es decir, continuamente se están degradando y resintetizando. La pérdida de muchas sustancias poliméricas importantes en hojas senescentes sugiere que esta producción cíclica se detiene y la actividad degradativa se acelera en gran medida durante la senescencia.

La degradación de las proteínas permite la removilización de N hacia otras partes de la planta. Más de 75% del N de una hoja se encuentra en los cloroplastos, presente en la proteína RuBisCO (por sus siglas en inglés: Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxigenase) y en los complejos LHC II (por sus siglas en inglés: Light harvesting complex II), localizados en el estroma y en la membrana tilacoide, respectivamente (Poret *et al.*, 2016). Se expresan un gran número de proteasas durante la senescencia, de tipo serínico, aspárticas, metaloproteasas y cisteínicas, así también aquellas involucradas en el sistema ubiquitin-proteosoma. Todas estas enzimas están involucradas en la removilización del N, una de ellas, muy estudiada por su elevada expresión durante esta etapa, es la proteasa cisteínica SAG12 (Grbić, 2003).

Degradación de lípidos

Los lípidos se encuentran presentes en todas las membranas de las organelas, su degradación se inicia con la acción de lipasas que liberan los distintos ácidos grasos de las membranas para ser oxidados en los peroxisomas por el proceso de β -oxidación. Se ha observado una reducción de hasta el 80% en el contenido de ácidos grasos en hojas senescentes (Yang y Ohlrogge, 2009). Las moléculas de acetyl-CoA generadas pueden seguir tres caminos: dirigirse hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos donde se oxidarían para dar CO₂; convertirse a citrato por la enzima citrato sintasa y luego a aminoácidos, o dirigirse hacia la vía de la glucogenogénesis para producir sacarosa. Estos precursores serían luego movilizados hacia otras partes de la planta como las semillas, raíces y tubérculos (Troncoso-ponce *et al.*, 2013).

Metabolismo de los azúcares

Es bien sabido que los azúcares actúan como unidades primarias de energía celular y como moléculas señal, involucradas en diversas repuestas fisiológicas. Dado que el proceso de senescencia está vinculado con la reutilización de la energía, se ha postulado que el contenido de azúcares es un importante factor que daría inicio y/o progreso a esta etapa. Es así que la caída de la fotosíntesis provocando una disminución en los niveles de carbohidratos es considerada como la primera señal del inicio de la senescencia (Biswal *et al.*, 2012). Sin embargo, desde hace ya muchos años existe un debate respecto del rol de los azúcares como moléculas señal durante este proceso. Un análisis reciente postula que durante la senescencia natural los azúcares ejercerían un rol prosenescente mientras que, durante la senescencia inducida por oscuridad, actuarían como antisenescentes (Kim, 2019).

Degradación de ácidos nucleicos

Se sabe que muchos ácidos nucleicos son degradados por nucleasas inducidas durante la senescencia. Es por esto que el contenido total de ARN disminuye marcadamente durante esta etapa. Por otro lado, se ha reportado una leve estabilidad del ADN nuclear y mitocondrial, con respecto al presente en los plastidios, hasta casi el final de la senescencia. Esto puede deberse al rol que juegan en regular la expresión génica durante este proceso. Es así, que ciertos niveles de ARN mensajeros (ARNm) disminuyen significativamente mientras que la abundancia de otros ARNm específicos aumenta (Kim, 2019).

Aquellos genes cuya expresión disminuye durante la senescencia son llamados SDGs ("senescence down-regulated genes" o genes reprimidos de la senescencia). Los SDGs incluyen en mayor medida genes que codifican para proteínas involucradas en procesos anabólicos y fotosíntesis. Por otro lado, aquellos genes que son inducidos durante la senescencia son llamados SAGs ("senescence-associated genes" o genes asociados a la senescencia). Los SAGs incluyen genes que codifican para enzimas hidrolíticas como proteasas, ribonucleasas, lipasas como así también enzimas involucradas en la síntesis de etileno (Biswal *et al.*, 2012).

2.2.2. Regulación hormonal de la senescencia

Son muchos los factores que se ponen en juego cuando una parte de la planta o la planta entera entra en senescencia, se puede decir que depende de un equilibrio entre el programa de desarrollo y los factores ambientales. Se sabe que las hormonas están involucradas en la integración de estas señales, permitiendo que el proceso de senescencia sea una herramienta adaptativa a las variaciones medioambientales con la intención de lograr extraer la mayor cantidad de nutrientes de los tejidos (Jibrán *et al.*, 2013).

Entre el grupo de fitohormonas que regulan esta etapa se pueden destacar el etileno, el ácido jasmónico y el ácido abscísico, que han sido propuestas en diversos trabajos como prosenescentes (Song *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017; Iqbal *et al.*, 2017), y a las citoquininas y

giberilinas como antisenescentes (Trivellini, Cocetta, Vernieri, Mensuali, *et al.*, 2015; Amorim *et al.*, 2017). En este trabajo nos centraremos en dos de estas hormonas de efecto antagonista: citoquininas y etileno.

Citoquininas

Las citoquininas son un grupo de fitohormonas vinculadas a procesos de desarrollo vegetal como la división y diferenciación celular; muchas veces actúan en conjunto con auxinas, otras fitohormonas, para cumplir estos roles (Mok y Mok, 2001). Se creía que estas hormonas eran sintetizadas solo en raíces, pero hoy se sabe que también se sintetizan en partes aéreas como en brotes y que son transportadas por xilema y floema. La principal citoquinina en plantas superiores es la zeatina, descubierta por primera vez en maíz (*Zea mays*). Su síntesis y degradación están continuamente reguladas y obedecen factores internos como externos, como estreses bióticos o abióticos (Kieber y Schaller, 2018).

La aplicación de citoquininas sintéticas, como es el 6-bencilamonopurina (6-BAP), en tratamientos poscosecha ha demostrado un retraso en la senescencia de petunias (Trivellini *et al.*, 2015) y otras flores de uso ornamental (Meir *et al.*, 2007). Asimismo, la aplicación en hortalizas también ha mostrado efectos beneficiosos, como el retraso en la degradación de clorofilas y pérdida de peso, y retención del contenido de ácido ascórbico, en especies tan variadas como espárragos (Wei y Ye, 2011), pepino (Chen y Yang, 2013), coliflor (Siddiqui *et al.*, 2015) y brócoli (Rushing, 1990).

Etileno

El etileno es una fitohormona gaseosa que actúa en bajas concentraciones en una gran variedad de procesos durante el desarrollo vegetal. Regula la división y elongación celular, el proceso de maduración de los frutos, la abscisión de las hojas y flores, la entrada en senescencia y la respuesta a estrés biótico y abiótico (Jibran *et al.*, 2013; Broekgaarden *et al.*, 2015). El etileno puede ser liberado por las distintas partes de una planta, como hoja, tallo, flor y fruto. La sensibilidad a esta fitohormona va a depender del tipo de tejido y del estado de madurez del mismo. Por ejemplo, aplicado exógenamente a hojas maduras induce su senescencia mientras que aplicado a hojas jóvenes no lo hace (Jing *et al.*, 2002).

Como tratamiento poscosecha, es habitual su utilización mediante la aplicación de etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico), un producto que libera etileno en contacto con los tejidos vegetales. Se lo suele utilizar para el control de la madurez de frutos, como bananas y tomates (Brecht, 2019), en el desverdizado de cítricos (Mayuoni *et al.*, 2011), también para ayudar a la cosecha de cerezas ya que promueve la abscisión de los frutos (Watada, 1986), entre otros.

En el brócoli, el etileno juega un rol central en la entrada en senescencia del tejido posterior a su cosecha. Presenta, de manera similar a lo observado en frutos climatéricos, un aumento en su tasa respiratoria seguida de un aumento en la liberación de etileno durante esta etapa (Tian *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 2009).

2.2.3. Senescencia en brócoli

La parte de la planta que se consume del brócoli es su inflorescencia, órgano que se encuentra en activo desarrollo al momento de la cosecha y cuya demanda de nutrientes, agua y hormonas es alta. Es debido a este hecho que la cabeza de brócoli cosechada presenta una senescencia acelerada, proceso similar al que acontece en hojas senescentes. El síntoma más evidente es la pérdida del color verde en su inflorescencia tornándose amarilla (Figura 3).

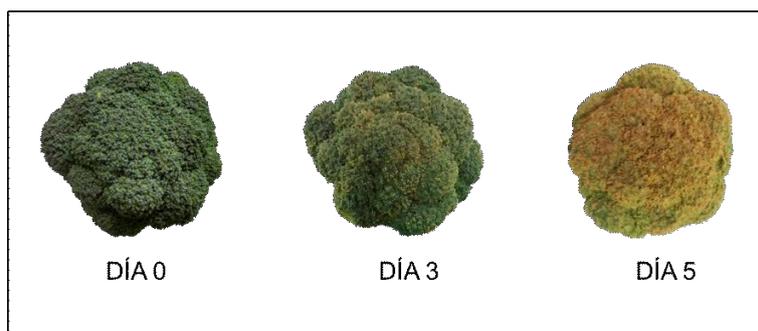


Figura 3: Cabezas de brócoli a distintos tiempos de incubación a 20° C en un cuarto oscuro.

También ocurren otros procesos asociados como la pérdida de agua, quitándole turgencia al tejido debido a la deshidratación; la disminución de sus propiedades nutricionales y nutraceuticas, debido a una disminución en su contenido de proteínas, azúcares, ácido ascórbico y glucosinolatos (Page *et al.*, 2001).

2.3. Antioxidantes

Desde hace varios años que se estudia el rol de las especies reactivas de oxígeno o ROS (por sus siglas en inglés) en el desarrollo de diversas enfermedades en humanos. Estas especies pueden generarse en el organismo por distintos factores: internos, como parte del normal funcionamiento de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, y externos, como la contaminación ambiental, el exceso de radiación solar, y compuestos como el alcohol, tabaco, pesticidas y metales pesados, entre otros (Birben *et al.*, 2012). Dentro del organismo, las ROS son capaces de oxidar biomoléculas como proteínas y lípidos de membranas, dando lugar al desarrollo de enfermedades (Jacob, 1995). Aunque existen barreras propias de defensa contra el estrés oxidativo, como son la presencia de enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, si éstas son superadas puede dar lugar a la generación de diversos tipos de desórdenes.

La presencia de radicales libres y ROS están asociadas con numerosos tipos de enfermedades tales como patologías neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer (Panth *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2017; Prasad *et al.*, 2017) entre otras. Diversos estudios han

demostrado que el consumo de compuestos antioxidantes previene el desarrollo de muchas de estas enfermedades. Uno de ellos es el estudio de Agudo *et al.* (2008) donde se reporta que un alto consumo de frutas y hortalizas ricas en antioxidantes es asociado con una menor mortalidad. Por otro lado, en un ensayo clínico realizado en el trabajo de Han *et al.* (2013) se reporta una menor incidencia en el desarrollo de cáncer de páncreas en pacientes que llevan una dieta rica en antioxidantes. En otro ensayo clínico se detectó una correlación opuesta entre el desarrollo de cáncer de pulmón con una dieta rica en compuestos antioxidantes (Wright *et al.*, 2004). Los trabajos de este tipo son numerosos y el conjunto de evidencia constituye el motivo por el cual se promueve el consumo de alimentos con actividad antioxidante.

Un **antioxidante** se define como cualquier sustancia que, estando presente en baja concentración en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Shahidi, 2000). Los principales antioxidantes de origen vegetal son la vitamina C, vitamina E, carotenoides y los compuestos fenólicos. Estos antioxidantes son capaces de secuestrar las ROS e inhibir la iniciación y/o interrumpir la cadena de propagación de las reacciones desencadenadas por estos radicales.

2.3.1. Rol de los antioxidantes en las plantas

Así como son necesarios para la vida de las plantas, tanto el oxígeno como la luz solar son agentes que provocan daños en los tejidos vegetales. La simple exposición a un ambiente oxigenado provoca con el tiempo la oxidación de componentes como proteínas, membranas y ácidos nucleicos. Por su parte dentro de la radiación solar se encuentran ondas de corta longitud, la radiación ultravioleta (UV) que debido a su interacción con muchos componentes celulares provoca la alteración de las rutas metabólicas (Larson, 1988). Es debido a esto y a la incapacidad de las plantas de desplazarse, que han desarrollado diversos mecanismos que le permiten sobrellevar estas exposiciones, como por ejemplo: la síntesis de metabolitos secundarios. A continuación, se detallan las funciones en las plantas que cumplirían algunos de ellos.

Ácido ascórbico (Vitamina C). En las plantas cumple diversos roles, como cofactor de enzimas y como componente en el ciclo glutatión-ascorbato. Este ciclo es de vital importancia para el control de la concentración de ROS en el organismo. El ascorbato actúa como dador de electrones en el ciclo, reduciendo compuestos, como el H₂O₂, producidos durante el estrés oxidativo. También participa en eventos de señalización redox, como floración, crecimiento, señalización hormonal y respuesta a estrés. El ser humano, a diferencia de muchos animales, no es capaz de sintetizar este compuesto, y por lo tanto debe incorporarlo con la dieta. Carotenoides. En los organismos fotosintéticos cumplen al menos cinco roles: pigmentos captadores de luz accesorios, moléculas secuestrantes y neutralizantes de ROS, disipadores de energía y estabilizantes. También actúan como precursores de la síntesis de hormonas como el ácido abscísico. Tocoferoles (Vitamina E). Como componentes de las membranas tilacoidales, tienen un rol principal como neutralizantes de ROS previniendo la peroxidación lipídica de las membranas y manteniendo

el estado rédox de la planta. *Flavonoides*. Estos compuestos cumplen un gran número de funciones biológicas y fisiológicas, como protección UV, atracción de insectos, defensa de patógenos, polinización y transporte de auxinas. Se trata de los principales compuestos que son sintetizados frente a una situación de estrés que genere ROS (Gupta, Palma y Corpas, 2018).

2.3.2. Antioxidantes en brócoli

Se ha descrito que muchas de las hortalizas del género *Brassica* presentan propiedades anticancerígenas. Esto es, en parte, debido a la gran cantidad de compuestos antioxidantes que presentan como son la vitamina C, vitamina E, los carotenoides, y los compuestos fenólicos (Hwang y Lim, 2015; Le *et al.*, 2019). Adicionalmente, estos vegetales contienen unos compuestos llamados glucosinolatos, antes mencionados, que, a pesar de contener baja actividad antioxidante, se ha demostrado que los productos de su hidrólisis tendrían propiedades anticancerígenas (Liu y Lv, 2013). En este trabajo nos enfocaremos en uno de estos grades grupos, que son los compuestos flavonoides, dentro de ellos, los más abundantes en el brócoli son la quercetina y kaempferol.

El contenido de compuestos fenólicos reportados en brócoli, va desde 40 – 400 (mg de ácido gálico equivalente/ 100 g de brócoli). Caso similar ocurre con el resto de los compuestos nutraceuticos presentes. Estas variaciones en el contenido de antioxidantes en el brócoli son causadas por muchos factores como el cultivar, el grado de madurez al momento de la cosecha, condiciones durante el crecimiento, estado del suelo, y almacenamiento poscosecha (Podsdek, 2007; Lozano *et al.*, 2017).

2.4. Tratamientos poscosecha

Aproximadamente un tercio de los alimentos producidos para el consumo humano se desperdicia, generando una pérdida de 1,3 mil millones de toneladas por año. Estas pérdidas ocurren a lo largo de la cadena de transporte, desde la etapa de cosecha en el campo hasta que llega al consumidor final, y se generan tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. En los países en desarrollo estas pérdidas son mayores en las primeras y medias etapas de la cadena de transporte mientras que en países desarrollados las mayores pérdidas se encuentran en la última parte de cadena, es decir, en la que está involucrado ya el consumidor final.

En lo que respecta a frutas y hortalizas, en los países desarrollados estas pérdidas son importantes a nivel de la selección, debido a los altos estándares en cuanto a la calidad requerida; y también hay pérdidas importantes por parte de los consumidores, representando entre el 15 – 30% de las pérdidas en estas regiones. Por otro lado, en los países en desarrollo estas pérdidas ocurren principalmente en las primeras etapas de la cadena de transporte, durante la cosecha y en el manejo poscosecha (FAO, 2011).

En este panorama, los tratamientos poscosecha buscan generar una disminución de las pérdidas generadas durante esta etapa, conservando las propiedades nutricionales y calidad organoléptica de las frutas y hortalizas por más tiempo. Previniendo que los productos alcancen su maduración o senescencia de forma prematura, es decir, antes que llegue al consumidor. Cabe destacar que el control de la temperatura y humedad relativa durante esta etapa, son considerados factores fundamentales para la buena conservación de las frutas y las hortalizas. Es así que, muchos de los estudios en tratamientos poscosecha, buscan superar esta barrera y prolongar las expectativas en la conservación del producto perecedero, pero para que esto sea posible son necesarios estudios a nivel fisiológicos.

2.4.1. Tratamientos con 1-MCP

El etileno, como se mencionó anteriormente, es una fitohormona que regula procesos de crecimiento y desarrollo (como maduración y senescencia) en las plantas. En la década del '90 fue descubierta una sustancia capaz de bloquear el efecto del etileno sobre el órgano vegetal aplicado, el 1-metilciclopropeno (1-MCP). El 1-MCP es un compuesto gaseoso (a temperatura y presión estándar) de 54 g de peso molecular y fórmula C_4H_6 . Su mecanismo de acción consiste en ocupar el lugar del etileno en sus receptores, actuando como inhibidor irreversible, e impidiendo que se desencadene la respuesta del etileno. En los sitios de unión de los receptores presenta 10 veces más afinidad que el etileno mismo (Blankenship y Dole, 2003).

Los primeros usos de esta molécula fueron para la conservación de flores y otras plantas de uso ornamental, y muy posteriormente se empezó a utilizar en alimentos. Gracias a la formación de un complejo de esta molécula con ciclodextrina, es posible comercializarlo como un polvo que, al entrar en contacto con el agua, libera el 1-MCP. Para el año 2005 su uso se extendió a un gran número de países y en diversos productos como manzana, kiwi, palta, banana, pera, tomate, entre otras (Watkins, 2006). Su descubrimiento tuvo dos grandes aportes, por un lado, el poder mantener la calidad de muchas frutas y hortalizas luego de cosechadas, y, por otro lado, brindar información acerca de cómo acontecen los procesos de maduración y senescencia.

2.4.2. Atmósferas modificadas

La respiración es un proceso metabólico que provee la energía necesaria para los distintos procesos bioquímicos vegetales. La respiración aeróbica consiste en la oxidación de compuestos orgánicos como carbohidratos, lípidos y ácidos orgánicos en CO_2 , H_2O y energía en presencia de oxígeno. Este proceso se logra gracias a una batería enzimática presente en las vías metabólicas de glucólisis, ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones. Existen ciertos factores internos que controlan la tasa respiratoria de una hortaliza, como por ejemplo el órgano de cual provienen (tallo, raíz, tubérculo, hoja, flor) ya que presentan

una actividad metabólica distinta, la especie, el cultivar, el estado de madurez de la misma, entre otros. Como así factores externos, como la temperatura, la manipulación durante la cosecha y postcosecha y la concentración de O₂ y CO₂ presentes (Fonseca *et al.*, 2002).

Cuando se elige empacar un producto (fruta o vegetal) se busca brindar protección contra los daños externos, aislar de las condiciones fitosanitarias del entorno y brindar un soporte donde colocar información relevante para el consumidor. Los empaques de atmosfera modificada (MAP, por sus siglas en inglés) permiten lograr un beneficio extra. Se trata de films sellados hechos de polímeros que mediante una permeación selectiva provocan un cambio en los niveles de los gases generados por la respiración. Lo que se logra con estos films es que disminuyan los niveles de O₂ y aumenten los de CO₂ en el ambiente que rodea al producto de modo de disminuir el metabolismo del vegetal y así tener una vida poscosecha más prolongada. Adicionalmente el film permite conservar mejor la humedad, lo que también es un factor importante al hablar de extender la vida del vegetal. Las características ideales a cumplir por un MAP van a depender del producto, ya que dependen de su tasa respiratoria el poder lograr las condiciones óptimas de concentración de O₂ y CO₂ eligiendo un material con una permeabilidad selectiva adecuada y de la temperatura a la cual será almacenado (Mahajan, 2009).

Algunas de las ventajas de utilizar MAPs son que no se emplean componentes externos para la conservación, no deja residuos tóxicos e implica un bajo impacto ambiental ya que es posible reciclar estos films. A pesar de que cada vez hay más variedad en la composición química de los films para empaques de atmosferas modificadas, la mayoría aún se forman de alguno de estos cuatro componentes: policloruro de vinilo (PVC), tereftalato de polietileno (PET), polipropileno (PP) y polietileno (PE). Uno de los empaques más comúnmente usado, y el empleado en este trabajo, es el polietileno de baja densidad que presenta una buena barrera al vapor de agua, genera una alta relación CO₂/O₂ y posee la ventaja adicional de ser un material flexible, resistente y económico. A esta variedad en cuanto a la composición de los films se suma la posibilidad de incluir distintos tipos de absorbentes O₂, CO₂, vapor de agua y etileno, como una herramienta adicional para manipular el microambiente.

2.4.3. Tratamientos con Luz Blanca

Durante los últimos años, los tratamientos con luz blanca fueron descubiertos como una novedosa y ecológica tecnología poscosecha. Se ha reportado que, durante la ausencia de luz, genes involucrados en la degradación de proteínas, clorofilas, síntesis de etileno y acumulación de ROS, aumentan su expresión. Estos procesos inducen y aceleran la senescencia durante, por ejemplo, la etapa de transporte donde la luz no es controlada y suelen almacenarse a oscuras. Sin embargo, muchos vegetales, como hortalizas de hoja conservan la respuesta a la luz luego de cosechadas y, si la intensidad es adecuada, pueden continuar con los procesos dependientes de la luz, como la fotosíntesis (Liebsch y Keech, 2016).

Se han reportado numerosos efectos de la aplicación de tratamientos con luz blanca, desde la disminución en la pérdida de peso y pardeamiento en lechuga (Charles *et al.*, 2018), retención de azúcares, capacidad antioxidante y clorofilas en kale (Bárcena *et al.*, 2019), retención de proteínas, azúcares y clorofilas en albahaca (Costa *et al.*, 2013) y conservación del contenido de ácido ascórbico en espinaca (Gergoff Grozeff *et al.*, 2013). También se han observado acumulación de antocianinas y compuestos fenólicos en higos (Rodov *et al.*, 2012), frutillas (Xu *et al.*, 2014) y cerezas (Kokalj *et al.*, 2019).

2.4.4. Tratamientos con radiación UV-C

La radiación UV (200-400 nm) puede dividirse en tres segmentos UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (200-280 nm) (Topcu *et al.*, 2015). La radiación UV-C es la más energética y es absorbida por el ozono de las partes superior y media de las capas de la atmósfera y, por lo tanto, no llega a la superficie terrestre. En contacto con tejidos, la radiación UV induce daño celular a través de la generación de ROS. Si bien depende de la dosis y de la resistencia que se tenga a ella, la radiación UV resulta directamente letal para los microorganismos expuestos. Es así que hoy en día se lo considera una buena alternativa al uso de antisépticos para la esterilización de superficies (Turtoi, 2013).

Además de ser letal para microorganismos, se sabe que la radiación UV resulta perjudicial para las plantas. Sin embargo, se ha observado que aplicada en bajas dosis provoca una estimulación en los tejidos, obteniendo una respuesta beneficiosa para el organismo, lo que se conoce como **hormesis**. La hormesis por UV-C ha sido estudiada durante varios años gracias a su capacidad de inducir resistencia a las enfermedades y retrasar la senescencia de distintos productos hortícolas (Jagadeesh *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha reportado que los tratamientos con luz UV-C inducen la actividad y la expresión de enzimas involucradas con el sistema de defensa, como son la fenilalanina amonio liasa (PAL), la β -1,3 glucanasa y la quitinasa (Ghaouth *et al.*, 2003; Pombo *et al.*, 2011a). La primera de ellas relacionada con la síntesis de compuestos fenólicos, y las otras dos, enzimas antifúngicas. Se ha visto también que los pulsos de luz UV-C contribuyen a conservar la firmeza por disminuir la actividad y expresión de enzimas de la pared celular (Pombo *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). En brócoli, dosis subletales de luz UV-C (10 KJ/m²) han comprobado un retraso en su senescencia (Costa *et al.*, 2006).

Todos estos resultados evidencian que los tratamientos con luz UV-C son efectivos para conservar propiedades organolépticas como son el color y la firmeza, así como evitar el ataque de patógenos, no solo por su efecto germicida sobre las superficies aplicadas sino también por inducir mecanismos de defensa propios del órgano vegetal. Otro efecto muy deseado de estos tratamientos con luz UV-C es la acumulación de compuestos nutraceuticos, como son los flavonoides, ya que se ha reportado una activación de la vía en distintos sistemas vegetales (González-Aguilar *et al.*, 2007; Jagadeesh *et al.*, 2011).

2.4.5. Tratamiento térmico

En los últimos años ha crecido el interés por implementar tratamientos físicos no destructivos y tecnologías amigables con el medio ambiente, para reemplazar aquellos productos químicos que se usan sobre las frutas y hortalizas. Es así que el uso de tratamientos térmicos (agua, vapor o aire caliente) se ha extendido y numerosos estudios reportan sus beneficios en distintas especies vegetales.

Algunos de los mecanismos por los cuales actúan los tratamientos térmicos son: la inhibición directa del crecimiento de patógenos y remoción física de los inóculos presentes, redistribución de la capa de cera epicuticular reforzando la barrera física de defensa, activación de la expresión de enzimas vinculadas con la defensa contra patógenos, como son la quitinasa y la β -1,3-glucanasa, activación de la expresión de enzimas antioxidantes, e inducción de la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides, capaces de actuar como antifúngicos (Lu *et al.*, 2007; Lurie y Lurie, 2016).

Los tratamientos térmicos pueden inducir muchos cambios a nivel de expresión genética, y una de estas respuestas es la generación de proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés *heat shock proteins*). Las HSP pertenecen a una familia de proteínas que se expresan como respuesta al estrés abiótico (altas temperaturas, bajas temperaturas y estrés oxidativo). Se trata de proteínas protectoras o chaperonas que van a conferirle al producto una protección cruzada frente a una serie de estreses bióticos y abióticos (Sui *et al.*, 2016).

Los efectos que han tenido los tratamientos térmicos en frutas y hortalizas es diverso, y van desde una disminución en la propagación de patógenos en mango (Kumah y Appiah, 2011) y durazno (Liu *et al.*, 2012), disminución en la producción de etileno y tasa respiratoria en lima (Kaewsuksaeng *et al.*, 2015), conservación de la firmeza y retraso del deterioro en morrones (Rodoni *et al.*, 2016) y retraso en la degradación de clorofilas y conservación de la actividad antioxidante en brócoli (Funamoto *et al.*, 2002; Duarte-sierra *et al.*, 2017).

3. Materiales y Métodos

3.1. Recolección y acondicionamiento del material vegetal

Las cabezas de brócoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) fueron cosechadas el mismo día que se realizaron los ensayos provistos por un productor del cinturón hortícola de La Plata. Una vez cosechadas fueron trasladadas al laboratorio de inmediato para su acondicionamiento. Se separaron las hojas y se cortó el tallo a una longitud media de 10 cm (Figura 4). Se seleccionaron a aquellas cabezas que presentaron un color uniforme, una cabeza compacta y de tamaño medio de 10-15 cm de diámetro. Se buscó también que no tuvieran lesiones aparentes ni desarrollo de ningún tipo de patógenos.



Figura 4: En la foto de la izquierda se observa cómo llegan las plantas de brócoli al laboratorio y en la foto de la derecha cómo se realiza su acondicionamiento.

3.2. Cosecha a distintas horas del día

Se realizó la cosecha de las cabezas de brócoli en tres horarios del día: 8 h – 13 h – 18 h. En cada uno de estos horarios se procedió a trasladar al laboratorio entre 15 a 20 cabezas, acondicionarlas y seleccionarlas, se las colocó en vasos plásticos y se les tomó medida de color superficial. De cada grupo se seleccionaron al azar 5 cabezas, se tomó muestra de sus flores, congelando las mismas en nitrógeno líquido y se almacenaron en freezer a -20 °C para posteriores determinaciones. El resto de las cabezas fueron llevadas a una cámara oscura a 20 °C para la inducción de su senescencia durante 120 h. El muestreo de las flores y toma de color superficial se realizó a las 0, 72 y 120 horas, respetando el horario en que fueron cosechados. En la Figura 5 se muestra el detalle de la toma de muestra y su posterior almacenamiento.



Figura 5: En la foto de la izquierda se observa el detalle de la toma de muestra de las flores y en la foto de la derecha el cuarto oscuro de almacenamiento a 20 °C.

3.3. Estudio de la senescencia de la planta

Se realizó la cosecha de 15 – 20 cabezas de brócoli para realizar el estudio de la senescencia de las distintas partes de la planta de brócoli. Para esto, se tomó la planta de brócoli y se la dividió en secciones (ver Figura 6): hoja, sección 1 (flores), sección 2 (tallos secundarios) y sección 3 (tallo principal). Luego de seleccionadas las cabezas, se colocaron en vasos plásticos y las hojas, ya separadas, en bandejas y se las llevó a una cámara oscura a 20 °C durante 120 h. Ambas fueron cubiertas débilmente con film PVC para prevenir deshidratación. A los tiempos de 0 h y 120 h se realizó el muestreo de cada una de las secciones, para lo cual se las cortó y congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20 °C.

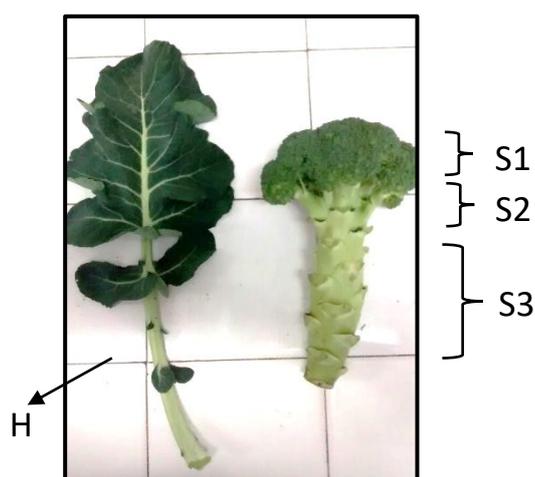


Figura 6: Detalle de las distintas secciones de la planta de brócoli para el análisis de senescencia. H: hoja, S1: pimpollos florales, S2: tallos secundarios y S3: tallo central.

3.4. Estudios hormonales

Las cabezas de brócoli se dividieron en tres grupos: las cabezas a tratar con 6-benzilaminopurina (6-BAP, una citoquinina sintética), con ácido 2-cloroetilfosfónico (Etefón, un agente liberador de etileno) y un grupo control. Las cabezas de cada grupo se sumergieron durante 10 minutos en soluciones que contenían: 100 ppm de 6-BAP (Sigma) con DMSO 0,1% v/v; 100 ppm de Etefón con DMSO 0,1% v/v y DMSO 0,1% v/v como control. Después de los tratamientos, las muestras se colocaron en vasos plásticos, se cubrieron débilmente con un film PVC para prevenir la deshidratación y se almacenaron en oscuridad a 20 °C durante 120 h. Se tomo medida del color superficial y muestra de las flores a las 0 h, 72 h y 120 h.

3.5. Tratamientos postcosecha

Para cada tratamiento se procesaron entre 40 - 50 cabezas de brócoli, se acondicionaron y seleccionaron como se describió más arriba. Luego del tratamiento se almacenaron durante 120 h (5 días) en un cuarto a 20 °C en la oscuridad para la inducción de su senescencia. A continuación, se describen cada uno de los tratamientos postcosecha realizados.

3.5.1. Tratamiento con radiación UV-C

Para el tratamiento con luz UV-C, las cabezas fueron divididas en dos grupos: Controles y Tratados. El grupo de cabezas a tratar se ubicó bajo 4 lámparas UV-C (TUV G30T8, 30W, Philips) a una distancia de 30 cm, y se irradiaron hasta alcanzar una dosis de 10 KJ m⁻², medido con un radiómetro digital (Cole-Palmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA). Mientras que el grupo Control no se irradió. Ambos grupos fueron llevados a una cámara oscura a 20 °C, se midió color superficial y tomó muestra a las 0, 72 y 120 horas.

3.5.2. Tratamiento con luz blanca

Para el tratamiento con luz blanca, las cabezas se colocaron en vasos plásticos con un poco de agua destilada para evitar la deshidratación y se almacenaron en una cabina ventilada y aislada de luz externa. Se seleccionaron dos grupos, Control y Tratados. Una mitad de la cabina se mantuvo a completa oscuridad (< 1 μmol m⁻² s⁻¹) donde se colocaron las cabezas Control y la otra mitad fue expuesta a luz continua, donde se colocó el grupo Tratados, para lo cual se utilizaron tubos fluorescentes de luz blanca de 40 w y una intensidad de 12 μmol m⁻² s⁻¹. Se midió el color superficial y se tomó muestra de las flores a las 0, 72 y 120 horas.

3.5.3. Tratamiento con atmósfera modificada

Para el tratamiento con atmósfera modificada, las cabezas de brócoli se dividieron en dos grupos, Controles y Tratados. Las cabezas a tratar se colocaron en bandejas dentro de bolsas de polietileno de baja densidad (40 μm de espesor, 20 cm x 30 cm) de forma individual y fueron herméticamente selladas. En el otro grupo, el grupo control, las cabezas fueron colocadas en bandejas y cubiertas débilmente con un film PVC para prevenir la deshidratación. Ambos grupos se almacenaron en un cuarto oscuro a 20 °C, se midió el color superficial y se tomó muestra de las flores a las 0, 72 y 120 horas.

3.5.4. Tratamiento térmico

Las cabezas de brócoli se separaron en dos grupos, aquellos a tratar y el grupo control. Las cabezas del grupo a tratar se llevaron en vasos plásticos a una estufa a 42 °C durante 3 h, mientras que al grupo control no se les hizo nada. Una vez terminado en ensayo, ambos grupos fueron llevados a un cuarto oscuro a 20 °C cubiertos débilmente con un film PVC para prevenir deshidratación, se tomó muestra de las flores y se midió el color superficial a las 0, 72 y 120 horas.

3.5.5. Tratamiento con 1-MCP

En este caso, las cabezas a tratar fueron almacenadas en un contenedor hermético con una concentración de 1 $\mu\text{l l}^{-1}$ de 1-MCP durante 16 h a 20 °C. Por otro lado, los controles se colocaron en las mismas condiciones, pero sin 1-MCP. Una vez terminado el ensayo, las cabezas se almacenaron en un cuarto oscuro a 20 °C, se tomó muestra de las flores y medida del color superficial a las 0 h, 72 h y 120 h.

3.6. Medida del color superficial

El color superficial fue medido con un colorímetro (Minolta CR-400, Osaka, Japón) durante el período de almacenamiento. Este equipo maneja parámetros de un espacio de color llamado CIELAB, obteniéndose tres parámetros: luminosidad (L^*) cuya escala va del 0 al 100, siendo 0 para el negro y 100 para el blanco; valor de a^* , que puede tomar valores positivos (rojos) o negativos (verdes) y valor de b^* cuyos valores positivos indican color amarillo y los negativos color azul. Se midió el color en distintos sectores de la inflorescencia, tomando 5 datos por cabeza.

El ángulo Hue (h°) se calculó como:

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

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

3.7. Determinación del contenido de clorofilas

Se realizó una extracción acetónica a partir del tejido congelado a -20 °C. Se molieron las flores en mortero usando nitrógeno líquido y se mezcló con acetona 100% en una relación 1:10. Los tubos se homogeneizaron y se incubaron 4 h en oscuridad. A continuación, se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se colectaron los sobrenadantes y se leyeron las absorbancias a 661,6 nm y 644,8 nm. Se determinó el contenido de clorofilas de acuerdo a Lichtenthaler (1987):

Clorofila a ($\mu\text{g/ml}$): $(11,24 \times \text{Abs}^{661,6 \text{ nm}}) - (2,04 \times \text{Abs}^{644,8 \text{ nm}})$

Clorofila b ($\mu\text{g/ml}$): $(20,13 \times \text{Abs}^{644,8 \text{ nm}}) - (4,19 \times \text{Abs}^{661,6 \text{ nm}})$

Las determinaciones se hicieron por quintuplicado. El contenido de pigmento se expresó como mg por gramo de tejido fresco.

3.8. Determinación del contenido de fenoles totales

Se midió el contenido de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC). Este método se basa en la reacción del reactivo de FC, un ácido formado con sales de molibdato sódico y tungstato sódico en ácido fosfórico, que en medio alcalino y en presencia de compuestos fenólicos es reducido dando un compuesto de coloración azul que presenta un máximo de absorción a 760 nm.

Se realizó una extracción etanólica a partir de 0,5 g de tejido congelado y etanol 100% frío en una relación 1:5. Se agitó vigorosamente en vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 4 °C a 9000 x g por 15 minutos. Se separó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

En tubos eppendorf se preparó la siguiente mezcla de reacción: 50 μl de extracto etanólico, 450 μl de agua destilada y 100 μl del reactivo Folin-Ciocalteu (1:1, con agua destilada), se agitaron los tubos y se dejó reposar 3 min. Luego se agregó 500 μl de solución de carbonato de sodio al 10% preparado en solución de hidróxido de sodio 0,1 N. Se agitaron los tubos y se dejaron reaccionar en la oscuridad por 1 h, luego de este tiempo se realizó la lectura a 760 nm. Las determinaciones se hicieron por triplicado, se confeccionó una curva con ácido gálico como patrón y agua destilada como blanco. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico cada g de tejido.

3.9. Determinación del contenido de flavonoides

Se realizó la determinación de compuestos flavonoides por un método colorimétrico adaptado del trabajo de Zhishen *et al.* (1999). Se realizó un extracto etanólico a partir de tejido congelado a -20 °C. Se pesó 1 g de tejido congelado triturado y se agregó etanol 50% frío en una relación 1:4, se agitó en vórtex 1 min y se centrifugó a 4 °C a 9000 x g durante 15 min. Se guardó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción: 100 µl de extracto etanólico, 610 µl de agua destilada, 30 µl de nitrito de sodio al 5%, se agitó en vórtex y se esperó 5 min. Luego se agregaron 60 µl de cloruro de aluminio al 10%, se agitó y se esperó 5 min. Por último, se agregaron 200 µl de solución de hidróxido de sodio 1 M, se agitó y se esperó 5 min. Inmediatamente se realizó la lectura a 515 nm. Se utilizó catequina para realizar la curva patrón y se utilizó agua destilada como blanco. Las determinaciones y curva se realizaron por triplicado. El resultado se expresó como mg equivalente de catequina por gramo de tejido.

3.10. Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó por el método del Borato caliente (Wan y Wilkins, 1994). Se trituró tejido congelado con nitrógeno líquido en mortero, se pesó 0,2 g y se colocó en un eppendorf preenfriado. Se colocó en cada tubo un par de perlas metálicas para favorecer la trituración de tejido con vórtex, luego se agregó 1 ml del buffer de extracción (Bórax 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 1% p/v, deoxicolato de sodio 1% p/v, DTT 10 mM, NP-40 1% v/v, PVP-40 2% p/v) previamente calentado a 80 °C y 15 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se homogenizó, se retiró las perlas y se llevó a estufa a 42 °C por 90 min. Luego se agregó a cada tubo 100 µl de KCl 2 M y se incubó en hielo durante 60 min. Se centrifugaron los tubos a 12000 x g durante 20 min a 4 °C, luego se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó LiCl 8 M un volumen equivalente al triple del colectado. Se almacenó a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron los tubos a 12000 x g durante 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron lavados del pellet con LiCl 2M agregando 400 µl por tubo y centrifugando a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se agregó 150 µl de solución Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y se resuspendió los precipitados a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se centrifugaron los tubos 12000 x g durante 10 min a 4 °C. Se pasó el sobrenadante a otro tubo preenfriado, se agregó 15 µl de KAc 2 M pH 5,5 (1:10 volúmenes respecto el volumen de Tris agregado) por tubo y se incubó en hielo durante 15 min. Se centrifugó los tubos 12000 x g durante 10 min a 4 °C, se pasó el sobrenadante a otro tubo preenfriado y se precipitó el ARN agregando 375 µl (2,5 volúmenes) de etanol 100% frío. Se deja precipitar durante 2,5 h a -80 °C. Luego se centrifugan los tubos a 10000 x g durante 30 min a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol 70% agregando 500 µl por tubo y centrifugando a 1000 x g durante 5 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se elimina el etanol residual dejando evaporar bajo un flujo laminar durante 15 min. Se resuspende el pellet en 100 µl de agua DEPC 0,1 % v/v, se agregan 10 µl (1:10 volúmenes) de acetato de sodio 3 M pH 6 y 250 µl de etanol 100% frío (2,5 volúmenes). Se deja precipitando toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugan los tubos a 16000 x g por 20 min a 4 °C, se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol 70% frío agregando 400 µl por tubo y centrifugando a 16000 x g por 20 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se elimina el etanol residual dejando evaporar bajo un flujo laminar por 15 min. Por último, se resuspenden los precipitados con 25 µl de agua DEPC 0,1 % v/v, se cuantifican por

espectrofotómetro, se analiza su integridad con un gel de agarosa y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

Todas las soluciones utilizadas fueron tratadas con DEPC (un inhibidor de la acción de nucleasas) a una concentración final de 0,1 % v/v durante toda la noche y esterilizadas al día siguiente.

3.11. Cuantificación de ARN

Las cuantificaciones de ARN se hicieron mediante espectrofotometría midiendo a 260 nm (absorbancia de las bases nitrogenadas) y calculando la concentración con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{Abs}_{260} * 40 * \text{dil}^{-1}) / 1000$$

Siendo dil, la dilución que se realizó en la muestra a medir.

Adicionalmente se midió la absorbancia a 280 nm (absorbancia de los anillos correspondientes a los aminoácidos aromáticos) para calcular la relación 260/280 y buscar que la misma sea próxima a 1,8 lo que indicaría una baja contaminación por proteínas.

3.12. Purificación de ARN

Para eliminar posibles contaminaciones de ADN que pudieran haber quedado durante la extracción de ARN se realiza una purificación del material obtenido. Para ello, se trata la muestra con una ADNasa (RQ1 DNAsa). En un tubo estéril se agrega un volumen de la solución de ARN obtenida de modo que contenga 6 µg de ARN, se agregan 4 µl de ADNasa, 1 µl de buffer de reacción 10x (adjunto con la DNAsa) y agua DEPC 0,1 % v/v hasta completar los 10 µl. Los tubos se incuban a 37 °C durante 30 min. Luego se agregan 100 µl de cloroformo - octanol (1:24) y 90 µl de agua DEPC 0,1 % v/v, se homogenizan los tubos y se centrifugan a 12000 x g a 4 °C durante 10 min. Se colecta el sobrenadante en un tubo nuevo preenfriado y se precipita el ARN con el agregado de 200 µl (2 volúmenes) de etanol 100% frío y 20 µl de NaAc 3M. Se deja precipitando durante 1 h a -80 °C, luego se centrifugan los tubos a 12000 x g durante 20 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol 70% frío agregando 400 µl a cada tubo y centrifugando a 12000 x g por 10 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se evapora el etanol residual dejando los tubos abiertos bajo un flujo laminar durante 15 min. Por último, se resuspenden los precipitados en 15 µl de agua DEPC 0,1 % v/v, se cuantifican por espectrofotometría como se describió previamente y se almacenan los tubos a -20 °C hasta su uso.

3.13. Transcripción reversa

Para la obtención de ADN complementario a partir de las muestras de ARN purificado se realiza la reacción de transcripción reversa utilizando la enzima M-MLV RT (por sus siglas en inglés, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase). Se coloca en un tubo eppendorf un volumen de la solución de ARN purificado equivalente a 2 µg de ARN y agua

bidestilada hasta un volumen final de 18,55 μl . Se incuban a 70 °C en un baño termostatzado durante 10 min, se incuban en hielo 5 min y luego se dejan a temperatura ambiente durante 10 min. Se prepara una premezcla que contiene por tubo 5 μl de buffer de reacción 5x (adjunto con la M-MLV), 0,3 μl de dNTP (10 mM), 0,15 μl de solución de Random Primers (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 1 μl de enzima M-MLV. Se dispensa en cada tubo 6,45 μl de la premezcla, se homogeniza y se llevan los tubos a la termocicladora.

El programa utilizado es el siguiente:

(1 ciclo): 37°C - 90 min

95°C - 5 min

El ADN complementario obtenido se almacena a -20 °C hasta su uso. Antes de su uso se realiza una PCR de chequeo con un juego de cebadores ribosomales.

3.14. Geles de agarosa para visualizar productos de PCR

Para visualizar la correcta amplificación de un fragmento de ADN proveniente de una PCR se prepararon geles de agarosa al 1,5 % v/v (fragmentos de 100 – 150 pb). Se pesó 1,5 g de agarosa y se disolvió en 100 ml de solución amortiguadora TBE (45 mM Tris – Ácido bórico, 1 mM EDTA). Al entibiar se volcó sobre el soporte plástico para el armado de geles con el peine, y se pipeteo el bromuro de etidio sobre el gel a una concentración final de 0,001 % v/v. Se homogenizó bien, se dejó enfriar y se dispensaron las muestras en cada calle. En una de ellas se pipetearon los patrones de peso molecular (Ladder 50 pb precisión de PBL Productos Bio-Lógicos). Cada una de las muestras se mezcló previamente con el colorante de frente de corrida Orange G 6x, (esta mezcla contiene además glicerol para darle más densidad a la muestra y evitar que salga de la celda). Se corrió durante unos 40 min a 90 volt y se reveló en un transiluminador con lámparas UV. Para fragmentos más largos (hasta 600 bp) se utilizaron las mismas concentraciones de agarosa y Ladder 100 pb. La presencia de una banda discreta del peso molecular correspondiente y la no amplificación del control negativo son indicios para determinar la presencia de la secuencia estudiada.

3.15. Geles de agarosa para corroborar integridad de ARN

Se preparó un gel de agarosa al 1% del mismo modo como se describe más arriba, se colocó el bromuro de etidio sobre el gel, se homogenizó y se dejó enfriar. Se tomó 2 μl de la muestra de ARN a analizar, se mezcló con agua DEPC y Orange G 6x hasta un volumen final de 12 μl , y se dispensó en cada pocillo del gel. Se conectó la fuente a 70 volt por 40 min. El gel se reveló en un transiluminador con lámparas UV. La presencia de bandas discretas correspondientes al ARNr permitió estimar que se ha conservado la integridad del ARN extraído.

3.16. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores a utilizar en el estudio de los distintos genes de interés se utilizó la información disponible en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov) que recopila la información actualizada sobre las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de distintas especies, y contiene herramientas que permiten trabajar sobre ellas, buscando por ejemplo regiones de homología.

Se buscó las secuencias de los genes de interés en las especies *Brassica oleracea* y *Arabidopsis thaliana*, que pertenece a la misma familia *Brassicaceae* y por lo tanto se encuentran muy emparentadas genéticamente. A partir de ellas se seleccionó una secuencia que fue utilizada para el diseño de los cebadores para PCR por el programa Beacon Designer 7.9. La región utilizada para el diseño fue consensuada entre más de una secuencia de distintas especies. Una vez que los cebadores ya estuvieron disponibles, se realizó una PCR a punto final utilizando como molde ADN complementario de *Brassica oleracea* var. *italica*, este producto amplificado del peso molecular deseado fue aislado desde el gel de agarosa y fue enviado a secuenciar. El resultado de la secuenciación fue analizado como se describe más abajo, realizando una revisión de los mismos corroborando que amplifiquen el fragmento del gen deseado. Una vez confirmada la identidad del fragmento amplificado, la misma se utilizó para el diseño de los cebadores para PCR en tiempo real por el programa Beacon Designer 7.9. Una vez disponibles estos cebadores se realizó nuevamente la verificación de los mismo mediante una PCR a punto final, corroborando que el producto de amplificación sea del peso molecular deseado.

3.17. PCR a punto final

Se colocó 0,5 µl del molde en tubos y se preparó una premezcla que contiene por tubo 0,5 µl de dNTPs (10mM), 1,25 µl de cebador sentido 5-3 (10µM), 1,25 µl de cebador antisentido 3-5 (10uM), 1,50 µl de MgCl₂ (25mM), 2,50 µl de buffer 10x + (NH₄)₂SO₄, 17,375 µl de agua miliQ y 0,125 µl de Taq polimerasa (5u/µl). Se dispensa por tubo 24,5 µl de la premezcla para obtener un volumen final de 25 µl.

El programa utilizado fue:

Desnaturalización inicial	94 °C - 4 min
25 ciclos:	- Desnaturalización 94 °C - 45 seg
	- T anillado (°C) 70-60 °C - 45 seg
	- Extensión 72 °C - 45 seg
Extensión final	72 °C - 7 min

Se realizó una PCR de verificación de la retrotranscripción a partir del ADN complementario se utilizaron cebadores ribosomales de brócoli, y una temperatura de anillado de 70 °C. Mientras que para la comprobación de los cebadores diseñados se utilizaron éstos mismos para la PCR y una temperatura de anillado de 60 °C.

3.18. PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real consiste en una PCR convencional con la diferencia de que en la mezcla de reacción estará presente alguna molécula que al unirse al ADN emitirá una señal de fluorescencia que será detectada y me permitirá seguir cada ciclo de amplificación en tiempo real. Dicha cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo será proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado.

Se realizaron PCR comparativas en tiempo real de dos pasos utilizando un equipo Step One Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher) y el kit FastStart Universal SYBR Green Master (Roche). En una placa de real time se dispensó por pocillo 1 µl del ADNc a analizar y de la dilución correspondiente y a continuación se dispensaron 9 µl de una premezcla que contiene por tubo los cebadores (sentido y antisentido), agua miliQ y 5 µl de SYBR Green I (2x), que contiene la polimerasa, la solución amortiguadora, los dNTP y el fluorocromo. Los volúmenes específicos de cebadores y agua miliQ están determinados por las respectivas curvas de eficiencia, realizadas con anterioridad, al igual que la dilución del molde. Se utilizó el gen de Actina como gen constitutivo y se realizaron los análisis por triplicado.

El ciclado utilizado fue

1 ciclo:	Desnaturalización inicial	95 °C	10 min
40 ciclos:	- Desnaturalización	95 °C	15 seg
	- Hibridación y Extensión	60 °C	1 min

Como paso de validación de la técnica, se realiza al final una curva de fusión. El objetivo es probar que un solo producto de amplificación se está generando en la reacción y que la fluorescencia registrada corresponde a ese producto en particular y no a productos inespecíficos ó dímeros generados por los cebadores, evidenciado por la presencia de más de un pico.

El ciclado de la curva de fusión fue:

1 ciclo:	95 °C	15 seg
	60 °C	1 min
	95 °C	15 seg

A continuación, se muestran la información correspondiente a los cebadores utilizados: sentido o forward (Fw) y antisentido o reverse (Rv). La tabla muestra las secuencias correspondientes de cada cebador utilizado, el peso del fragmento amplificado y la concentración final utilizada en la placa de real time.

Tabla 3: Listado de los cebadores utilizados para las reacciones de PCR convencional y PCR en tiempo real.

Cebador	Secuencia	Fragmento amplificado	Concentración (nmol. L ⁻¹)
BoNOL - Fw	TAACGGTCGTTCACTAGCAGA	480 pares de bases (pb)	
BoNOL - Rv	ACGGAGAGCCGTTGTATTGTA		
BoHCAR - Fw	TCCAAGACCAGTATTAGCC	656 pb	
BoHCAR - Rv	GACCTTGACCAAACCTTAGC		
BoCHS - Fw	TCAGACAGGCTCAAAGAG	460 pb	
BoCHS - Rv	TCCATCATGAGACGCTTGA		
BoCHI - Fw	AATCCGTCCTTTCTTCC	325 pb	
BoCHI - Rv	TCGAAAATAAGTTGTTGGCA		
qBoACT - Fw	CCAGAGGTCTTGTTCCAGCCATC	136 pb	500
qBoACT - Rv	GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAC		
qBoNYC1 - Fw	TTACATCTCGCAGTTCTGA	130 pb	500
qBoNYC1 - Rv	GCAATACCAACTACCTTAGC		
qBoNOL - Fw	ATCTATGAAGCCGACTTACA	126 pb	300
qBoNOL - Rv	GATCTACTGCGATATCTACTCT		
qBoHCAR - Fw	TGGAGCAGCATCTTAATCT	158 pb	500
qBoHCAR - Rv	AAGTTGGACCTTGTAACTTG		
qBoCHS - Fw	GACTACTACTTCCGCATCA	138 pb	700
qBoCHS - Rv	CATGTCTGGGTTCTCCTT		
qBoCHI - Fw	TCTTCCGTGAAATCGTCA	153 pb	300
qBoCHI - Rv	CTTAGCCTCAGAGTCTGT		

3.19. Secuencias nucleotídicas utilizadas

Se utilizaron las siguientes secuencias nucleotídicas obtenidas de la base de datos GenBank del NCBI: *Brassica oleracea* var. *alboglabra* NYC1 mRNA (EH428873) (Hasperué *et al.*, 2013), *Brassica oleracea* var. *oleracea* chlorophyll(ide) b reductase NOL mRNA (XM_013771448.1), *Brassica oleracea* actin (Act1) mRNA (AF044573), *Brassica rapa* 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase HCAR mRNA (XM_009121024.1), *Brassica oleracea* var. *italica* chalcone synthase CHS mRNA (GU266209) y *Arabidopsis thaliana* Chalcone-flavanone isomerase CHI mRNA (NM_115370.4).

3.20. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

A partir del gel de agarosa se buscó aislar las bandas de interés, cortándolas sobre el transiluminador de lámpara UV para visualizarlas, luego usando el kit comercial GFX (GE Healthcare) se logró obtener una solución con el fragmento de ADN amplificado. La concentración de ADN se midió utilizando un minifluorómetro (QubitFluorometer, Invitrogen) y el kit Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen).

3.21. Secuenciación de fragmentos de ADN

El servicio de secuenciación fue llevado a cabo por el Departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Las muestras fueron preparadas a una concentración determinada de acuerdo a las instrucciones dadas por el Departamento y entregadas para su análisis.

3.22. Análisis bioinformático de los fragmentos secuenciados

Para corroborar la identidad del fragmento secuenciado se analizó contra la base de datos del NCBI y se encontró que cada secuencia cumplía con un alto porcentaje de identidad con su secuencia de diseño, así como con otras homólogas. Se utilizó el paquete de programas de DNA Star 7 con el cual se pudieron hacer los alineamientos de las secuencias recibidas del servicio de secuenciación y diseñar una secuencia consenso. A partir de la misma se hizo el diseño de los cebadores para PCR en tiempo real utilizando el programa Beacon Designer 7.9.

3.23. Análisis de la región promotora

A partir de la secuencia de la región promotora, obtenida de la base de datos NCBI, se realizó un análisis *in silico* de los elementos reguladores presentes. Para ello se utilizaron las páginas Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) y New PLACE - A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>). Estas páginas contienen un listado sobre las secuencias de distintos elementos reguladores reportadas en varias especies. Se utilizó el programa Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) (www.fruitfly.org) para predecir, a partir de la región promotora, el inicio de la transcripción. Se utilizó también la herramienta informática presente en la página de la base del NCBI llamada ORFinder, que permite localizar los distintos marcos abiertos de lectura, el inicio y fin de la traducción, y los exones constituyentes del gen. De este modo, se confeccionó un esquema que resultó representativo de esta zona regulatoria.

3.24. Análisis estadístico de los datos

En todos los casos se realizó un análisis de varianza (ANAVA) de los datos usando el programa STATISTICA (Statsoft) y los datos fueron evaluados usando el Test de Tukey con un p value $< 0,05$. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los tratados respecto de los controles para un mismo día de análisis.

4. PARTE A: Caracterización de genes asociados a la vía de degradación de clorofilas

4.1. Introducción

La clorofila es el pigmento más abundante sobre la Tierra, indispensable para la captación de la energía lumínica durante la fotosíntesis. Llevó miles de millones de años de evolución desarrollar el complejo sistema fotosintético, y su importancia es tan relevante que tanto la vida de organismos heterótrofos como de autótrofos depende de este proceso.

La molécula de clorofila está formada por un anillo complejo similar al observado en la hemoglobina y citocromos, se trata de un anillo tetrapirrólico con un ión magnesio central. El anillo se encuentra unido a una cola de fitol hidrofóbica que posibilita el anclaje a las membranas.

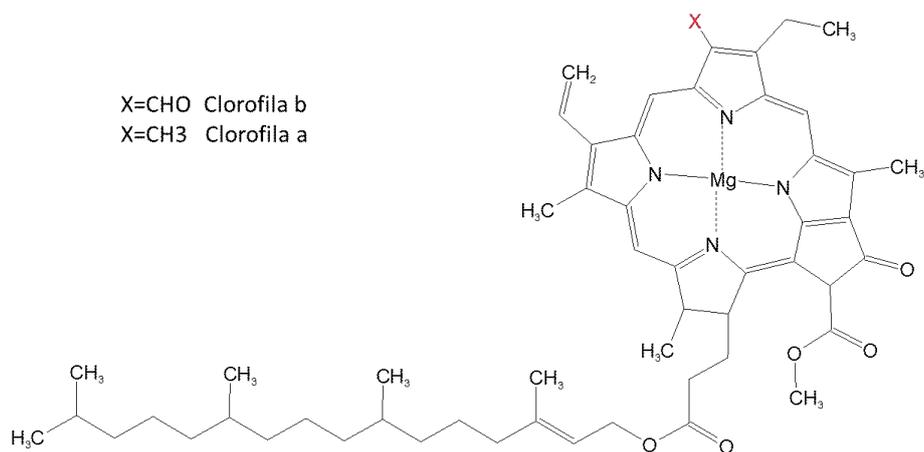


Figura 7: Estructura de la molécula de clorofila

En plantas superiores existen dos tipos de clorofila, clorofila a y clorofila b (Figura 7), con diferentes espectros de absorción. Durante el desarrollo de los tejidos, la clorofila es sintetizada activamente e incorporada a los distintos complejos clorofila-proteína de las membranas tilacoideas. La clorofila y sus precursores son altamente fotoactivos y pueden generar especies reactivas de oxígeno (“Reactive Oxygen Species”, ROS por sus siglas en inglés) por lo que se torna imprescindible la formación de complejos con las proteínas tilacoidales. En contraste, durante la senescencia estos complejos son desarmados y las clorofilas y apoproteínas son degradadas. Tanto la síntesis como la degradación de clorofilas están estrictamente reguladas. Un exceso en la concentración de clorofilas implica que no puedan ser complejadas por las proteínas y podría desencadenar daño oxidativo y hasta muerte celular.

La degradación de las clorofilas no ocurre solo durante etapas de senescencia de los órganos fotosintéticos sino también durante los períodos de estado estacionario y en

respuesta a estrés biótico y abiótico. La degradación de las clorofilas se encuentra regulada por diversos factores, tales como el estado redox de la célula, y hormonas como las citoquininas, etileno y jasmónico (Jia *et al.*, 2015; Jibrán *et al.*, 2013; Sade *et al.*, 2018). Este proceso se inicia con el dismantelamiento de los complejos captadores de luz, tal como se describe en la sección Senescencia.

A la fecha el modelo que mejor describe la etapa de degradación de clorofilas es la “vía PaO”. Esta vía lleva su nombre debido a una enzima principal, la feoforbido a oxigenasa (“pheophorbide a oxygenase”, PaO por sus siglas en inglés) que es la encargada de romper el anillo tetrapirrólico de la clorofila. Esta vía puede ser dividida en dos etapas: 1) reacciones con intermediarios coloreados que culmina en la formación del catabolito fluorescente primario (“primary fluorescent Chl catabolite”, pFCC por sus siglas en inglés) y 2) etapas de modificación del catabolito fluorescente primario hasta la obtención de los intermediarios no fluorescentes (“nonfluorescent Chl catabolites”, NCCs por sus siglas en inglés). Estas dos partes de la vía se suelen encontrar separadas espacialmente en la célula, la etapa 1 ocurre en los plástidos mientras que la etapa 2 ocurre en el citosol y vacuola (Hortensteiner, 2013).

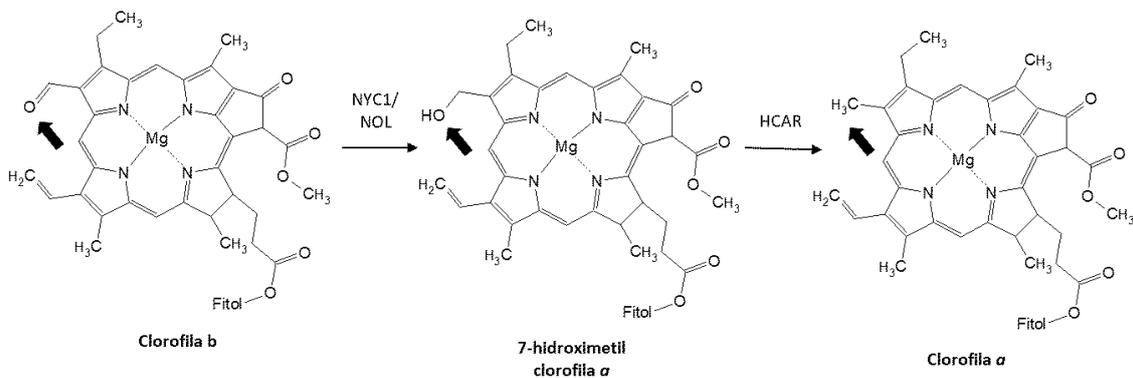


Figura 8: Etapas de conversión de clorofila b en clorofila a. Las flechas indican el grupo funcional que es reducido por acción de las enzimas.

La primera etapa de la vía de degradación se inicia con la conversión de la molécula de clorofila b en clorofila a, esto es así ya que los derivados de la clorofila b no son aceptados como sustrato para el resto de las enzimas de la vía. Este primer paso está a cargo de tres enzimas que catalizan la reducción en dos etapas, con la molécula de 7-hidroximetil clorofila a como intermediario (Figura 8). Estas enzimas están codificadas por los genes *NON-YELLOW COLORING 1 (NYC1)* y *NYC1 LIKE (NOL)* que catalizan la reducción de clorofila b a 7-hidroximetil clorofila a, se trata de dos parálogos de clorofila b reductasa dependientes de NADPH (Kusaba *et al.*, 2007). Luego la enzima *7-HIDROXIMETIL CLOROFILA A REDUCTASA (HCAR)* cataliza la reducción de 7-hidroximetil clorofila a en clorofila a, esta enzima depende de ferredoxina reducida como dador de electrones.

Posteriormente a su conversión a clorofila a, se remueve el magnesio central de la molécula. Esta etapa, se cree que podría estar a cargo de la proteína “Stay green” (SGR, por sus siglas en inglés), para dar feofitina a (Shimoda *et al.*, 2016). Molécula que luego sería tomada como sustrato por la feofitinasa (PPH, por sus siglas en inglés) para dar feoforbido a.

La molécula de feofórbido a sería oxidada por la enzima feofórbido a oxigenasa (PaO) a catabolito rojo de la clorofila (RCC, por sus siglas en inglés). En este paso se produce la apertura del anillo tetrapirrólico y con ello la pérdida de coloración característica de la molécula de clorofila. La apertura del anillo también provoca la pérdida de la fotoactividad de la clorofila y sus derivados. Es debido a la importancia de este paso que la vía lleva su nombre (Kuai *et al.*, 2018).

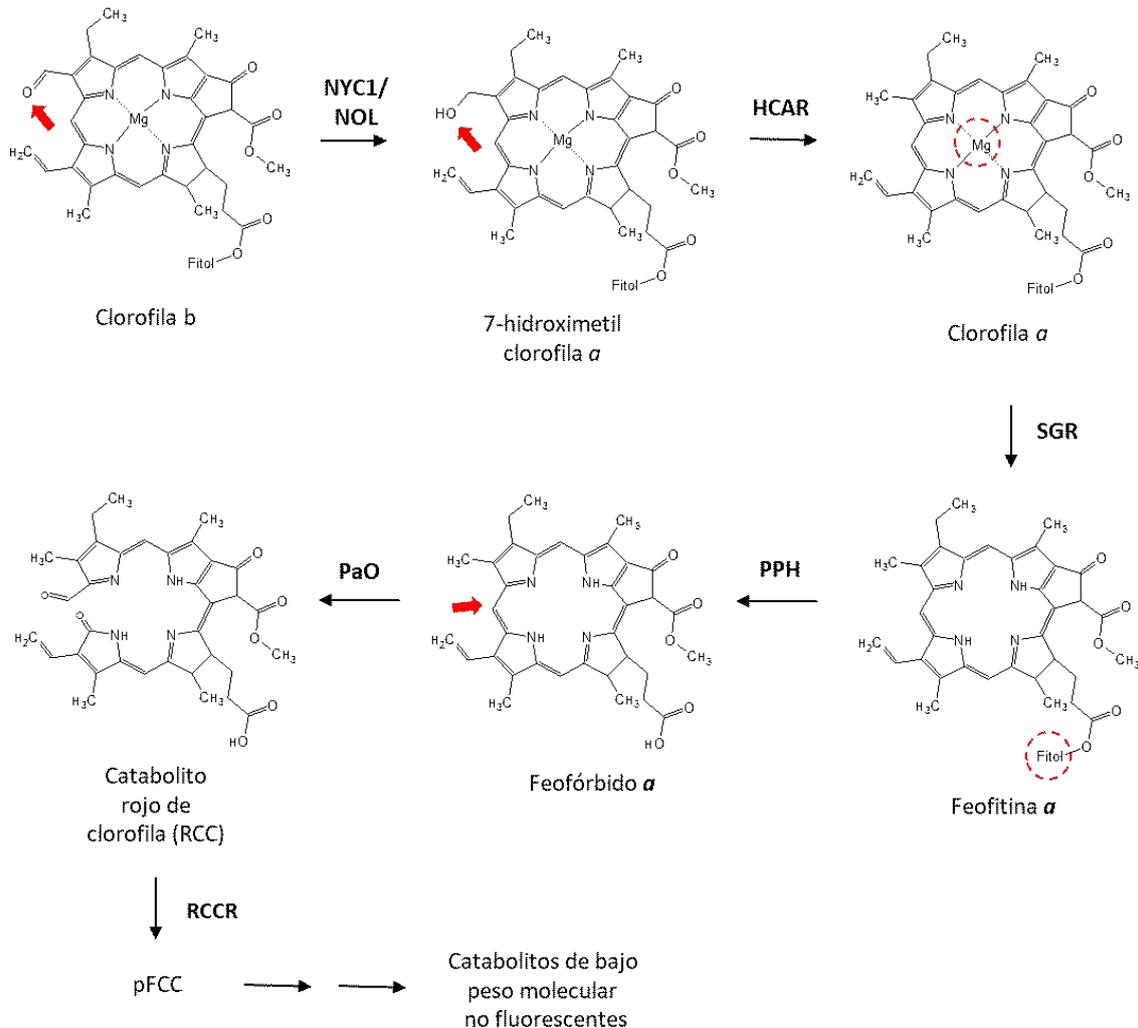


Figura 9: Esquema de la vía de degradación de la molécula de clorofila. En rojo se indica la región de la molécula que sufre cambios químicos

La molécula de RCC es luego convertida en catabolito fluorescente primario de la clorofila (pFCC, por sus siglas en inglés) por la RCC reductasa (RCCR). A partir de aquí la fototoxicidad de los derivados se reduce aún más, es por eso que tanto a PaO como a RCCR son consideradas enzimas claves de la vía de degradación puesto que cumplen con el objetivo por el cual la molécula de clorofila debe ser degradada. Las reacciones que siguen ocurren fuera de los cloroplastos, se trata de reacciones de tautomerización no enzimática que generan distintos tipos de catabolitos de bajo peso molecular no fluorescentes cuya composición es variable según la especie vegetal analizada (Figura 9).

Las 7 enzimas de la vía mencionadas, llamadas CCEs (“chlorophyll catabolic enzymes”) permiten eliminar la peligrosa fototoxicidad de la molécula de clorofila. La última enzima en ser establecida su función bioquímica en la vía fue la proteína SGR, aunque no se desconocía su importancia para la vía de degradación, puesto que los mutantes con proteína SGR inactiva presentan un fenotipo “siempre verde”. Esta proteína interacciona con muchas de las 6 CCEs formando complejos multiproteicos que aceleran la detoxificación de los distintos intermediarios de la molécula de clorofila en el cloroplasto senescente.

El primer paso hacia la conversión de clorofila b en clorofila a catalizado por las enzimas NYC1 y NOL fue primero estudiado en arroz (Kusaba *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2009). En el trabajo realizado por Kusaba *et al.* (2007) se observó que el mutante *nyc1* expresaba un fenotipo de tipo “siempre verde”. En esas plantas se conservó el contenido de clorofila b y se detectó un retraso la degradación de los complejos captadores de luz, manteniendo la integridad de sus proteínas y pigmentos accesorios. Esto derivó también en la conservación de la estructura de los cloroplastos, ya que aparentemente se trata de procesos secuenciales. Al realizar un análisis de su secuencia se observó que la proteína NYC1 tiene tres dominios transmembrana por lo cual se cree que se ubicaría en la membrana de los tilacoides. Se reportó también que se trata de un gen que se expresa fuertemente durante la etapa de senescencia en los tejidos verdes. Sin embargo, aún no fue posible detectar su actividad clorofila b reductasa *in vitro* (Kusaba *et al.*, 2007).

Por otro lado, en el trabajo de Sato *et al.* (2009) se analizó la proteína NOL, también en arroz, y se encontró que la misma se ubica en el estroma de los tilacoides ya que no presenta dominio transmembrana. Los mutantes *nol* expresaron un fenotipo similar a *nyc1*: “siempre verde”, conservando el contenido de clorofilas y estructura de los complejos captadores de luz. También se postuló la posibilidad de que se forme un complejo entre NYC1 y NOL, ya que se detectó interacción entre las proteínas *in vitro* (Sato *et al.*, 2009). Al realizar el doble mutante *nyc1 nol* en *Arabidopsis* se observó la supresión casi completa de la degradación de clorofila b, dando la pauta de que la reducción de clorofila b por NYC1 y NOL sería sino la única vía, la de mayor importancia (Horie *et al.*, 2009).

La enzima HCAR cataliza la conversión de 7-hidroximetilclorofila a (7-HMC a) en clorofila a y ha sido caracterizada en *Arabidopsis thaliana* y en arroz. Los mutantes *hcar* demostraron expresar un fenotipo de tipo “siempre verde” conservando el contenido de clorofilas y complejos proteicos. Este hecho demuestra la importancia de esta enzima para la vía de degradación. Extrañamente se vio también una muerte celular prematura en hojas adultas, al parecer por una creciente acumulación de ROS. Esta muerte celular sería dependiente de la intensidad de luz incidente. Esto último se cree que podría deberse al hecho de que las plantas *hcar* también acumulan el intermediario 7-HMC a que podría estar actuando como fotosensibilizador y generando ROS. Por otro lado también se ha descrito, por ensayos de doble híbrido, que la enzima HCAR interacciona con las otras 6 CCEs e incluso consigo misma, pudiendo actuar en forma de dímeros o trímeros (Piao *et al.*, 2017; Sakuraba *et al.*, 2013).

4.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta parte son:

- ❖ Caracterizar la expresión espacial (distintas secciones de la planta de brócoli) y temporal (durante la senescencia) de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* en brócoli, involucrados en las primeras etapas del catabolismo de clorofilas.
- ❖ Analizar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la expresión de dichos genes.
- ❖ Analizar el efecto de distintos tipos de tratamientos postcosecha sobre la expresión de dichos genes.
- ❖ Correlacionar la expresión de dichos genes con el color superficial y el contenido de clorofilas en brócoli.

4.3. Resultados y discusión

El principal signo de la pérdida de la calidad organoléptica en brócoli es el deverdizado, debido a la degradación de clorofilas y producto de la activación de la senescencia. Se han realizado y caracterizado numerosos tratamientos de tipo químico y físico que permiten modular el deverdizado y el amarillamiento. Sin embargo, son pocos los trabajos que describen cómo estos tratamientos afectan la expresión génica. En el caso del brócoli, debido a que estos tratamientos afectan la tasa de degradación de clorofilas, resulta de interés estudiar qué ocurre con la expresión de las enzimas involucradas en dicha vía.

Como se mencionó anteriormente, las enzimas NYC1, NOL y HCAR catalizan el primer paso de la vía de degradación de clorofilas, que es la conversión de clorofila b en clorofila a. Se ha reportado que los respectivos mutantes de estos genes generan un fenotipo “siempre verde” al inducir su senescencia, esto nos indica la importancia de estas enzimas en la regulación del contenido de clorofilas. Es por esto que, en base a estudios previos realizados por el grupo de trabajo sobre distintos tipos de tratamientos poscosecha aplicados a brócoli, se decidió estudiar el perfil de expresión de estos genes durante la senescencia y analizar el efecto de los distintos tratamientos.

4.3.1. Análisis de la región promotora

La enzima NYC1 se ha visto muy regulada a nivel de expresión, reportado tanto en la bibliografía como se desarrollará a continuación en este trabajo. Es por esto que se decidió realizar un análisis *in silico* de la región promotora. Se utilizaron las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI y los programas PantCARE y New PLACE disponibles en la web. En la Figura se muestra un esquema de los elementos más representativos encontrados durante el análisis.

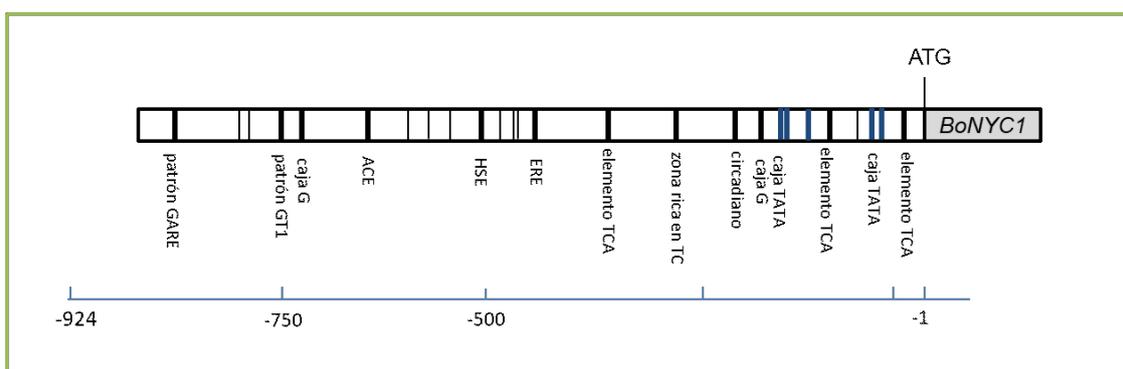


Figura 10: Esquema de los elementos de respuesta presentes en la región promotora del gen *BoNYC1*.

En la Tabla 4 se pueden observar los distintos elementos regulatorios, el organismo en el que fue reportado, su secuencia y la función que se le atribuye. Se puede notar que hay presentes muchos elementos de respuesta a luz, y respuesta a hormonas como el etileno,

giberelinas y ácido abscísico. También se encontró elementos de respuesta al estrés y aquellos presentes en el control circadiano.

Tabla 4: Elementos *cis*-regulatorios presentes en la región promotora del gen *BoNYC1*.

Elemento	Organismo	Secuencia	Función
caja TATA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TATA	centro de la región promotora
	<i>Brassica napus</i>	ATATAT	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	TTTTA	
caja G	<i>Pisum sativum</i>	CACGTT	respuesta a la luz
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CACGTG	
ACE	<i>Petroselinum crispum</i>	AAAACGTTTA	respuesta a la luz
TCA	<i>Brassica oleracea</i>	TCAGAAGAGG	respuesta al ácido salicílico
		GAGAAGAATA	
	<i>Nicotiana tabacum</i>	CCATCTTTT	
ERE	<i>Dianthus caryophyllus</i>	ATTTCAA	respuesta a etileno
HSE	<i>Brassica oleraceae</i>	AAAAAATTC	respuesta a estrés por calor
patrón GT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GGTAA	respuesta a luz
patrón GARE	<i>Brassica oleraceae</i>	TCTGTTG	respuesta a giberilina
circadiano	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CAANNNNATC	control circadiano
zona rica en TC	<i>Nicotiana tabacum</i>	ATTTTCTCA	respuesta al estrés y defensa

Si bien un análisis bioinformático como éste es apenas una pequeña parte al complejo sistema de regulación presente en un gen, permite realizar hipótesis acerca de la respuesta percibida frente a distintos estímulos.

4.3.2. Diseño de cebadores específicos

Se logró obtener cebadores específicos para los genes *BoNOL* y *BoHCAR*. Para ello, se recurrió a información disponible en la base de datos del NCBI y a partir de las secuencias específicas de los genes en *Arabidopsis thaliana* y en otras especies relacionadas como *Brassica rapa* ó *Brassica napus* se pudo obtener una secuencia consenso. A partir de esta secuencia se hizo el primer diseño de cebadores para PCR. Con el mismo juego de cebadores se amplificó un fragmento de aproximadamente 500 bp en brócoli, se mandó a secuenciar y a partir de esta información se realizó el diseño del segundo juego de cebadores, específicos para RT- qPCR, amplificando un fragmento de aproximadamente 100 bp. La información respecto de las secuencias se encuentra detallada en Materiales y Métodos. A continuación, en las Figuras 11 y 12, se pueden observar los alineamientos correspondientes. Como se mencionó anteriormente, para el gen *BoNYC1* se utilizó el juego de cebadores diseñados en el trabajo de Hasperué *et al.* (2013).

AtHCAR NM_100341 mRNA: cctgaagacagattatc**ccaagaccagtattagccaggacacctgaagaagtttggctgcaagagggtcaagc**
 BrHCAR XM_009121024 mRNA: cctgaagatagattgtc**ccaagaccagtattagccaggacacctgaagaagtttggcagcaagaggcgcaaac**

Fw →

caactctgtctcctaactctgaataactcttgaattaatcgaggcttccggagtgaaagcgtctctctgtttcggggtgggt
 caactctgtctcctaactctgaataactcttgaattaatcgagcttctggagtgaaacgtctctcttttgcgggtgggt

tgccaagtgaagcattgagatcagtgaggcagcatctgaatctggaaaagtgtatgtactaggccaattgtgt
 tgccaagtgaagcattgagagcagtgaggcagcatctgaatctgaaaagctatatgttctaggccaattgtgt

ggacaacggacaacagagatggactagacaagtttctgaaagcagctagtaagagccagagactgttctccattat
 ggacaatggacaacagggaagggtgacaagtttctcaaagcgctagtaaggagccagagactgttctccattat

gaatttatgcaagattacaaggtccaactcaaacacttggatggacacattgaagagggtccctatttctctcact
 gagtttatgcaagattacaaggtccaactcaaacacttggacggacacattgaagagggtccctatttctctcactca

gcaaacgatttagtagatgtcatagctccatcggttacagctgctttgattacacaaatgattagcggattgggtat
 gcaaacgatttagttgatgtcatagctccatctgttatagctgctttgattacacaaatgattagcggattgggtat

cggttacatgggtgtccgaagtattcaggtctgaacatgactgacctccacagatattacagtgagaaatgaac
 cggttatatgggtgtccaaagtactcaggtgtgaacatgactgacctccagctatattacagtgaggaaatgaac

gtgggaaagaaatgctcagcttggtagaaaacctttggagatcactccaacaatcagcagcgggtgatcggcgacc
 gtgggaaagaaatgctaagcttagtagaaaacctttggagatcactccaacaataagtagcgggtgatcggcgacc

ttttgtacagaaactgtaaggcagacgatctg**ctaagtttggtaaggct**ctgctcagccagcccaactatttgtt
 ttttgtacagagaccgtaaggcagacgatctg**ctaagtttggtaaggct**ctgctcagccagcccaactatttgtt

← **Rv**

Figura 11: Alineamiento para el diseño de los cebadores para PCR del gen *BoHCAR*

BnNOL XM_013868974 mRNA: ctgttctcagctctcttctctgcaatggctctcaagtggttccatatctctctctcttttctcaggcttctctctt
 BrNOL XM_009132599 mRNA: ctgttctcagctctcttctctgcaatggctcactcagtggttccatatctctctctcttttctcaggcttctctctt

Fw →

cctccgtcgcatacgccttcaacctcogtttctctctctt**taacggctgcttactagcaga**aagcttcgggtctcgca
 cctccgtcgcatacgcctcaacctcogtttctctccctt**taacggctgcttactagcaga**aagcttcgggtctcgca

actgtaactgtttcgcgcaaaaacctcctcggtttctccgctcgcgggtggtggaagctcgcacatccaggggaaaga
 actgtaactgtttcgcgcaaaaacctcctcggtttctccgctcgcgggtggtggaagctcgcacatccaggggaaaga

gaaccgatgacgcctcctataacgtcttgatcactggctcgaccaaaggtataggacatgcttagctagagagttt
 gagcogatgacgcctcctataacgtcttgatcactggctcgaccaaaggtataggacatgcttagctagagagttt

ctgaaagcaggagacaacgttgcataatgtccagatcagcggaaagctcagctctgttggtagagcttaagga
 ctgaaagcaggagacaacgttgcataatgtccagatcagctgaacaggtgagctctgttgaagcttaagga

agaatatggggagcatgtgtggggaactaagtgtgatgttagagaagggaaaggtatgagggagctttaggttat
 agaatatggggagcatgtgtggggaactaagtgtgatgttagagaagggaaaggtatgagggagctttaggttat

gtcagaataatcttaatacattgacatttgataaataatgctggatctaatacagctttaaactttgtctga
 gtcagaataatcttaatacattgatttggattaataatgctggatctaatacagctttaaactttgtctga

ggcctcggatgaggatcttattgaagttgtgaaacaacactctgggctgat**gttatgttccgagaggcaatga**
 ggcctcgtgatgaggatcttattgaagttgtgaaacaacactctgggctgat**gttatgttccgagaggcaatga**

← **Rv**

atatgatgtgactcaatctcggggtggtcatatcttcaatattgatggagctggctcagatgggagaccaacacca
 atatgatgtgacccaatctcggggtggtcatatcttcaatattgatggagctggctcagatgggagaccaacacca

Figura 12: Alineamiento para el diseño de los cebadores para PCR del gen *BoNOL*

4.3.3. Expresión durante la senescencia

Con el objetivo de evaluar el perfil de expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* durante la etapa de senescencia en postcosecha, se almacenaron cabezas de brócoli a 20 °C en oscuridad durante 5 días y se tomó muestra a los tiempos: 0 h, 72 h y 120 h.

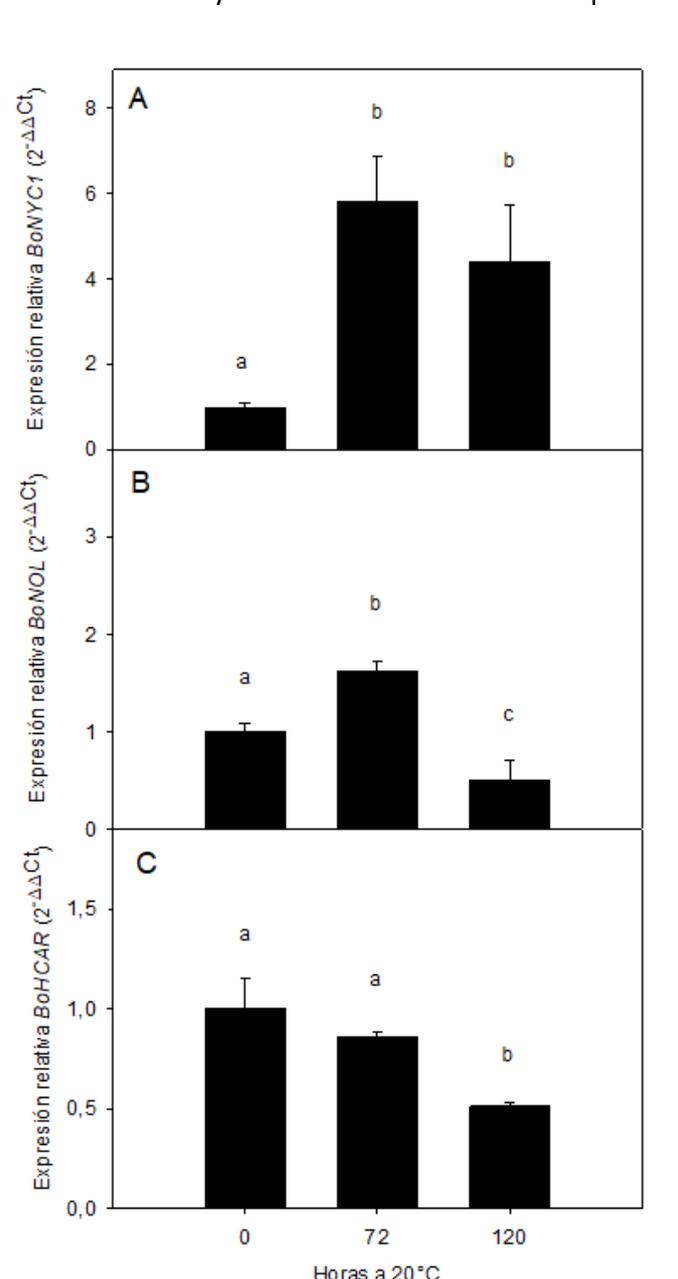


Figura 13: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en inflorescencia de brócoli almacenado durante 120 h a 20 °C. Las letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$)

Respecto a la expresión de *BoNYC1* (Figura 13 panel A), se puede observar que la misma aumenta durante la senescencia, mostrando un aumento de 5 veces la expresión respecto al valor inicial. Por otro lado, la expresión de *BoNOL* (panel B) presenta un pico leve a las 72 h y luego un descenso. Este aumento resultó mucho menos pronunciado que en el

caso de *BoNYC1*. Finalmente, la expresión de *BoHCAR* (panel C) disminuye durante el almacenamiento.

Se ha mencionado que durante la etapa de senescencia ocurre degradación de ácidos nucleicos, proteínas y, en el caso de tejidos verdes, clorofilas. Para que estos procesos se lleven a cabo debe ocurrir síntesis de enzimas específicas para cada uno de estos procesos. Es así que muchas de las enzimas y genes involucradas en la vía de degradación de clorofilas muestran un aumento de la actividad enzimática (Costa *et al.*, 2005a) y de la expresión (Gomez-Lobato *et al.*, 2012), siendo en muchos casos similar al observado en *BoNYC1*. Por otro lado, *BoNOL* presentó un aumento más leve y una disminución hacia las 120 h, mientras que la expresión de *BoHCAR* disminuye continuamente. En el trabajo de Sakuraba *et al.*, (2013) se describe un aumento de la expresión de *NYC1*, *SGR*, *PaO* y *PPH* durante la senescencia de hojas de *Arabidopsis*, mientras que los genes *NOL*, *HCAR* y *RCCR* muestran otro patrón, más bien de disminución. Por otro lado, en el trabajo de Jia *et al.* (2015) se reporta que *NOL* presenta una expresión constitutiva. En ambos casos se plantea que *NOL* podría cumplir algún otro rol distinto de *NYC1*. El caso de *HCAR* es distinto ya que en arroz se observa que el gen aumenta con la senescencia igual que las otras enzimas de la vía (Piao *et al.*, 2017), sugiriendo que la regulación de la expresión de este gen podría ser dependiente de la especie.

4.3.4. Estudio en las distintas secciones de brócoli

Con el objetivo de analizar la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* durante la senescencia en distintas partes de la planta de brócoli, se dividió la inflorescencia en secciones y se midió a los tiempos: 0 h y 120 h. Adicionalmente se analizó el proceso en hojas. El seguimiento de la senescencia se hizo a través de la determinación del contenido de clorofilas totales.

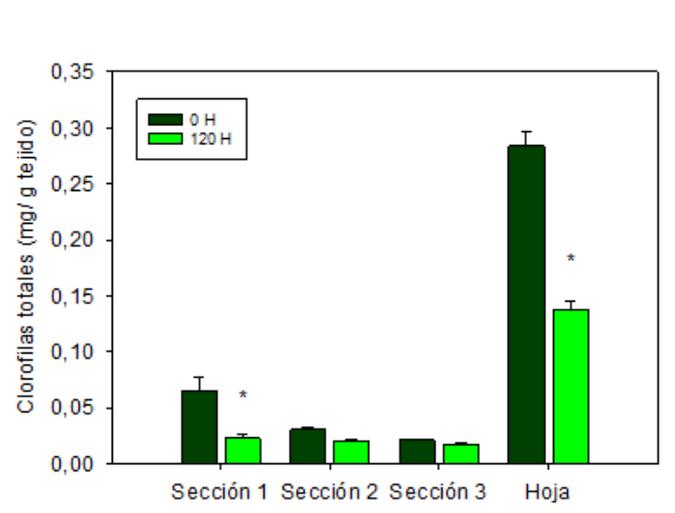


Figura 14: Contenido de clorofilas totales en las secciones 1 (inflorescencia), sección 2 (tallos secundarios), sección 3 (tallo central) y hoja. Los asteriscos indican diferencias significativas para una misma sección. ANOVA: Test de Tukey ($p < 0.05$).

En la Figura 14 notamos que el contenido de clorofilas totales disminuyó en la sección 1 y en hoja hacia el quinto día de inducción de la senescencia, manteniéndose sin cambios en las secciones 2 y 3.

Con respecto a la expresión génica, se puede observar que el gen *BoNYC1* (Figura 15 Panel A) muestra un aumento hacia las 120 h en las secciones 1, sección 2 y hoja, mientras que no varía en la sección 3. Por otro lado, en el panel B se observa que a las 120 h de incubación a 20 °C la expresión de *BoNOL* disminuyó en las inflorescencias mientras que aumentó en hoja y en la sección 3. Por último, en el panel C se observa que solo hubo variaciones en la expresión de *BoHCAR* en hoja, mostrándose una disminución.

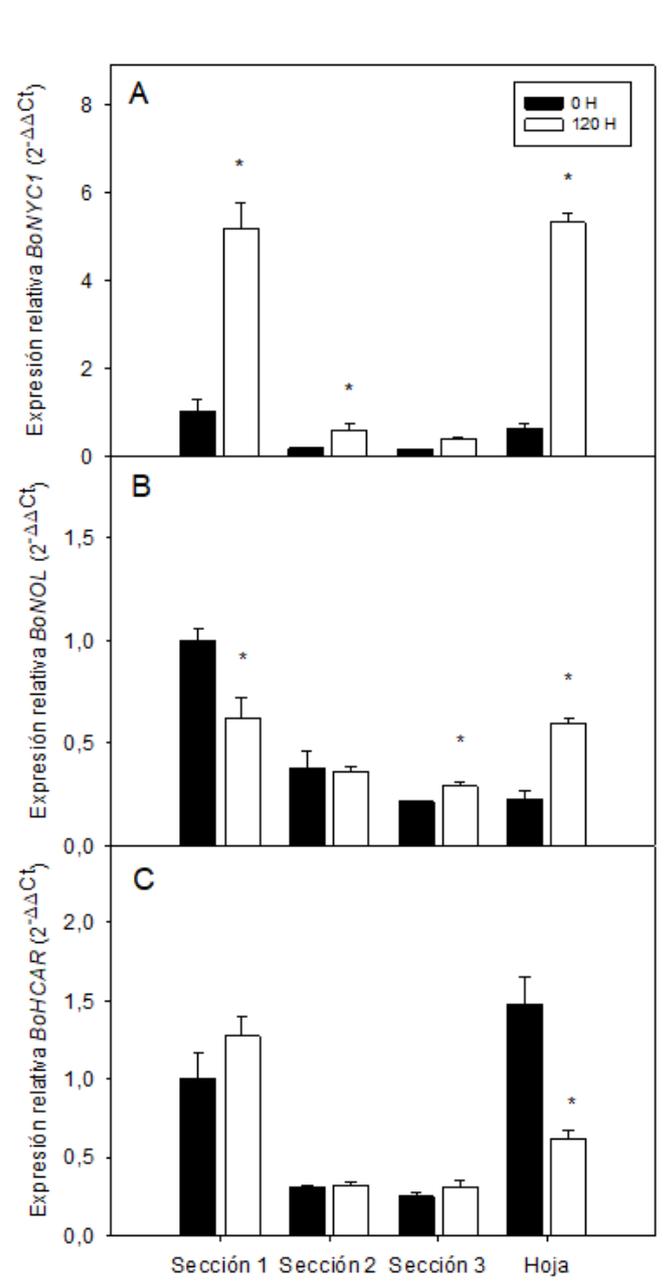


Figura 15: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en distintas secciones de brócoli almacenado durante 120 h a 20 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$) dentro de una misma sección.

Tanto la inflorescencia como las hojas son tejidos metabólicamente más activos que las ramas y el tallo, es por esto que se observa un mayor contenido de clorofilas y mayores variaciones en la expresión de los genes. Es de remarcar que la expresión de *BoNYC1* muestra cambios más pronunciados que los que expresan *BoNOL* y *BoHCAR*. El perfil de expresión de *BoNYC1* es semejante al que presentan otras enzimas de la vía de degradación de clorofilas, aumentando con la senescencia. Esto nos da indicio de su importancia durante esta etapa. Por otro lado, la expresión de *BoNOL* y *BoHCAR* mostraron una respuesta distinta en flores y en hoja con la senescencia, indicando una respuesta tejido específica. Por otro lado, en hoja, *BoNOL* mostró un aumento al igual que *BoNYC1*, mientras que *BoHCAR* disminuyó. Esto último es igual a lo reportado por Sakuraba *et al.* (2013) en hoja de *Arabidopsis*.

4.3.5. Tratamientos hormonales

Se realizaron ensayos exponiendo cabezas de brócoli a dos fitohormonas (etileno y citoquininas) de efecto antagonista frente a la senescencia, de modo de analizar el efecto de dichas hormonas sobre la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR*.

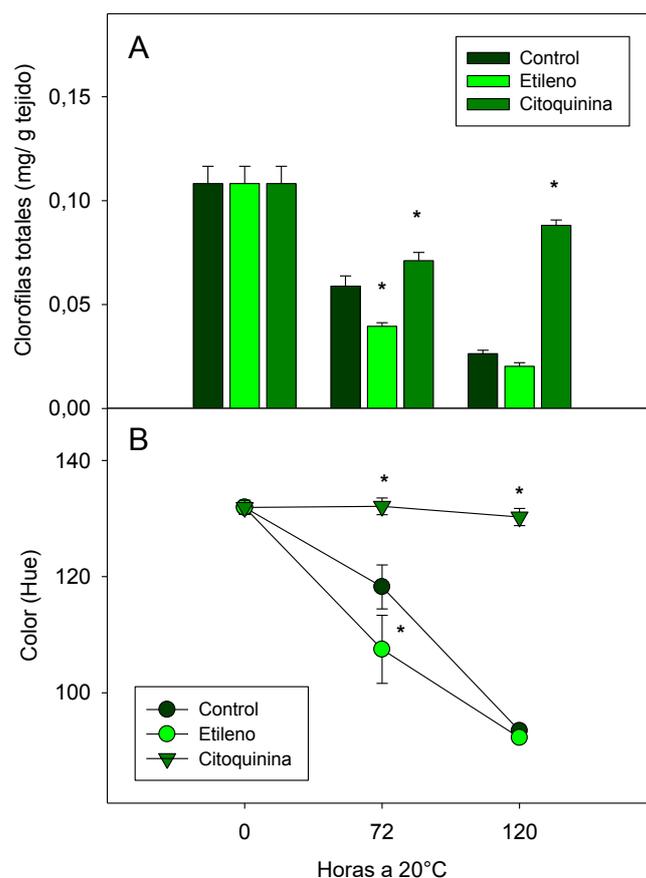


Figura 16: Contenido de clorofilas totales (A) y color superficial (B) en cabezas de brócoli tratadas con etileno y citoquininas. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (Tukey, $p < 0,05$)

El seguimiento de la senescencia se realizó mediante la medida de color superficial (Hue) y el contenido de clorofilas totales (Figura 16). Se puede observar que tanto el contenido de clorofilas totales como el Hue disminuyen en los controles durante el período de almacenamiento, en concordancia con el avance de la senescencia tal como se describió previamente. También podemos notar que las cabezas tratadas con etileno presentaron un menor contenido de clorofilas totales y menor Hue al día 3 respecto de los controles, siendo igual al control al día 5. Por otro lado, se observa que tanto el contenido de clorofilas totales como el color fue retenido en las muestras tratadas con citoquininas tanto al día 3 como al día 5.

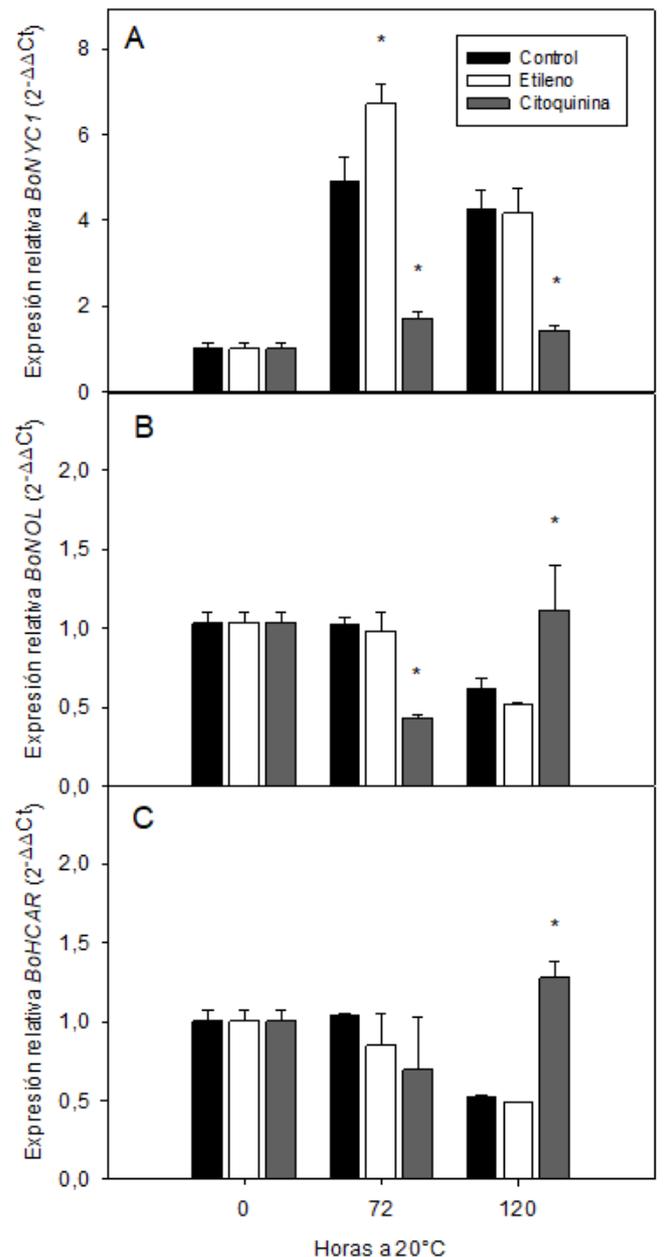


Figura 17: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en inflorescencias de brócoli tratadas con etileno y citoquinina, y almacenadas durante 120 h a 20 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (Test de Tukey, $p < 0,05$).

Respecto al análisis de los genes mencionados, se detectó una mayor expresión de *BoNYC1* (Figura 17 panel A) hacia el día 3 en las cabezas tratadas con etileno, y una menor expresión en las cabezas tratadas con citoquinina, tanto al día 3 como al día 5, respecto de las cabezas sin tratar. Por otro lado, el gen *BoNOL* (panel B) a pesar de estar también involucrado en el primer paso de la vía, no mostró el mismo comportamiento. No se observó variación con el tratamiento de etileno, mientras que sí se detectaron variaciones en el tratamiento con citoquininas, mostrando una disminución al 3er día y luego un aumento al 5to día. Por último, la expresión del gen *BoHCAR* tampoco mostró variaciones en las muestras tratadas respecto a los controles hacia el día 3, mientras que sí mostró un aumento significativo en el tratamiento con citoquininas hacia el 5to día respecto del control.

En base a estos resultados podemos decir que el tratamiento con etileno aceleró el proceso de senescencia, aumentando la tasa de degradación de clorofilas, la pérdida del color superficial, y aumentando la expresión de *BoNYC1*. Este último comportamiento se ha visto también en otros genes involucrados en la vía de degradación de clorofilas como *PaO* (Gomez-Lobato *et al.*, 2012), *SGR* (Gomez-Lobato *et al.*, 2014) y *PPH* (Büchert *et al.*, 2011). Sin embargo, ni *BoNOL* ni *BoHCAR* respondieron a etileno, lo que me indicaría que estos genes no serían regulados por dicha fitohormona. Por el contrario, en el tratamiento con 6-BAP (citoquinina sintética) se observó un retraso de la senescencia, reteniendo el contenido de clorofilas, retrasando la pérdida del color superficial y mostrando una menor expresión del gen *BoNYC1* respecto del control. Este comportamiento es similar al mostrado por otros genes involucrados en la vía, tales como como *PaO*, *SGR* y *PPH* (Büchert *et al.*, 2011; Gomez-Lobato *et al.*, 2012; Gomez-Lobato *et al.*, 2014).

Un comportamiento distinto se observó en la expresión de *BoNOL* y *BoHCAR*, mostrando ambos un aumento hacia las 120 h de almacenamiento en las muestras tratadas con citoquininas. En el trabajo de Talla *et al.* (2016) se reporta un comportamiento similar, por lo cual se cree que estarían cumpliendo un rol en el recambio de clorofilas, es decir no solo en su degradación sino también en su síntesis (Talla *et al.*, 2016). Esto último es confirmado también con un ensayo realizado en plántulas etioladas de *Arabidopsis*, donde al ser expuestas a la luz para inducir el proceso de adquisición de color verde, tanto *NOL* como *HCAR* aumentaron su expresión (Sakuraba *et al.*, 2013).

4.3.6. Tratamiento con 1-MCP

En base a trabajos previos que demostraron que el tratamiento con 1-MCP (inhibidor de los receptores de etileno) es efectivo en retrasar la senescencia de brócoli (Gong y Mattheis, 2002; Ma *et al.*, 2009; Gómez-Lobato *et al.*, 2012) y que el mismo también afecta la expresión de ciertos genes de la vía de degradación de clorofilas, se decidió estudiar el efecto de 1-MCP sobre la expresión de *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR*. El seguimiento de la senescencia se hizo por medida del color superficial y se determinó también el contenido de clorofilas totales.

En la Figura 18 se observa que tanto el contenido de clorofilas totales como el color superficial presentaron diferencias significativas en las muestras tratadas con 1-MCP respecto de los controles a las 72 h y 120 h de almacenamiento a 20 °C.

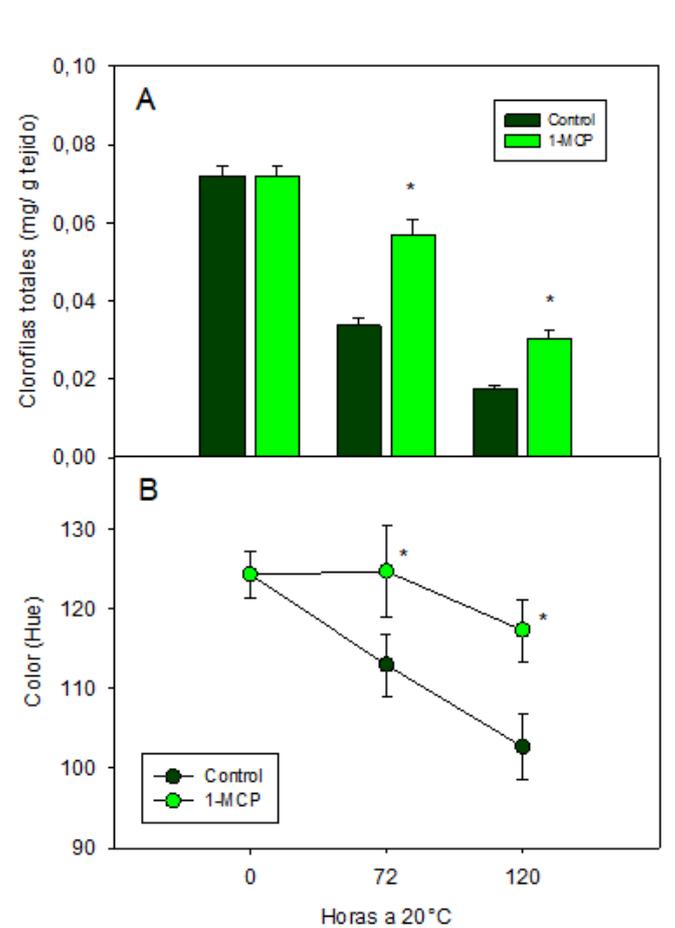


Figura 18: Contenido de clorofilas totales (A) y color superficial (B) en cabezas de brócoli tratadas con 1-MCP. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Tukey, $p < 0,05$)

Con respecto a las medidas de expresión de los genes, se puede observar en la Figura 19 que tanto la expresión de *BoNYC1* como *BoNOL* mostraron una disminución a las 72 h de almacenamiento, en las cabezas tratadas respecto de los controles. Esta expresión de los genes *BoNYC1* y *BoNOL* posteriormente decae hacia las 120 h de almacenamiento, al igual que los controles. Manteniéndose aún por arriba que el control para el caso de *BoNYC1*. Por otro lado, *BoHCAR* no mostró diferencias respecto de los controles a lo largo de la incubación.

Se sabe que uno de los factores que desencadena el proceso de senescencia durante la etapa de postcosecha del brócoli es la acción del etileno, liberado principalmente en la zona de corte en el tallo (Kato *et al.*, 2002). Al bloquear los receptores se impide que se desencadene la cascada de señales internas que da lugar, entre otros procesos, a la degradación de clorofilas y, en consecuencia, al amarillamiento. A partir de la Figura 18 podemos decir que el tratamiento con 1-MCP generó un leve retraso de la senescencia de

brócoli, que se ve reflejado en el mayor Hue, mayor retención de las clorofilas a las 120 h. El 1-MCP bloquea la acción de etileno impidiendo que el mismo se una a sus receptores y de esta manera también bloquea la inducción de la expresión de los genes codificantes de las enzimas ACS (ACC sintasa) y ACO (ACC oxidasa) involucradas en la vía de síntesis del etileno, a la vez que reduce la expresión de los receptores de etileno (Ma *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013).

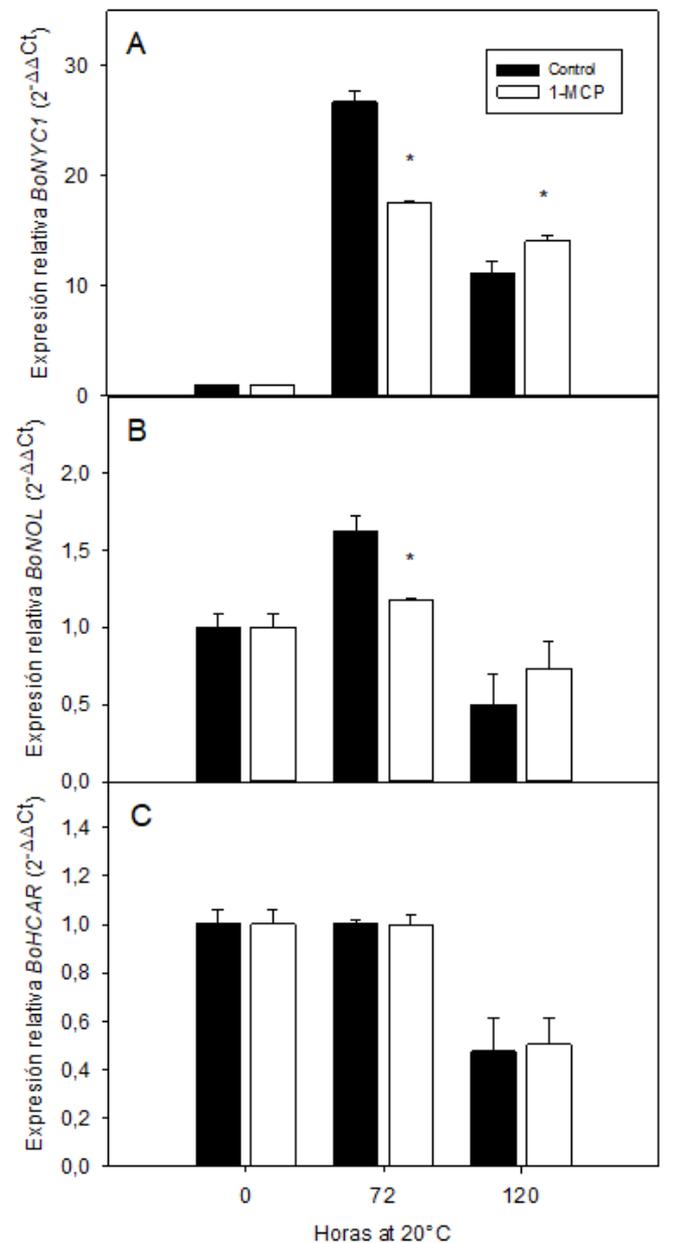


Figura 19: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en inflorescencias de brócoli tratado con 1-MCP, y almacenado durante 120 h a 20 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

El retraso en el aumento de la expresión de *BoNYC1* y *BoNOL* en las muestras tratadas con 1-MCP es similar al descrito en otros genes de la vía de degradación de clorofilas (Gómez-Lobato *et al.*, 2012, Charoenchongsuk *et al.*, 2018, Lv *et al.*, 2020). Efectos

similares han sido descritos en sistemas diferentes. Por ejemplo en el trabajo de Cheng *et al.* (2012) analizaron la microestructura de los cloroplastos y la expresión de genes clave de la vía en un tipo de pera china, demostrando que el tratamiento con 1-MCP mantiene la estructura de estos plástidos y disminuye la expresión de genes como *PaO*, *SGR*, *RCCR*, *NYC1* y *NOL*. La caída de la expresión a las 120 h de muchos genes podría ser una consecuencia de los procesos de degradación de ácidos nucleicos que ocurren hacia el final de la senescencia. Con respecto a la expresión de *BoHCAR*, teniendo en cuenta que no fue afectada por el tratamiento con etileno, puede pensarse que este gen no estaría regulado por esta hormona. En el trabajo de Kuai *et al.* (2018) se describe que este gen aparenta no ser influenciado por los principales factores que regulan la vía, como son la luz y fitohormonas como el ácido jasmónico, ácido abscísico y etileno.

4.3.7. Tratamiento con Atmósfera modificada

En base a trabajos previos que demostraron que tratamientos con atmósferas modificadas contribuyen al retraso de la senescencia en brócoli y conservación de sus propiedades nutraceuticas (Barth *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2009), como así en el retraso en la degradación de clorofilas y modificación de la expresión de genes relacionados (Büchert *et al.*, 2011; Gomez-Lobato *et al.*, 2012) se decidió evaluar la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* bajo este tipo de tratamiento. El seguimiento de la senescencia se hizo por determinaciones del color superficial y contenido de clorofilas totales.

En la Figura 20 puede observarse que el contenido de clorofilas decae con los días de almacenamiento a 20 °C en oscuridad tanto en los controles como en las muestras tratadas (Panel A) aunque en las cabezas que fueron sometidas al tratamiento con AM el contenido de clorofilas decae más lentamente que en los controles. Una respuesta similar se ve reflejada en el color superficial de las cabezas tratadas con AM (Panel B), donde no se observaron variaciones en el ángulo de Hue durante su almacenamiento.

Respecto al análisis de los genes en estudio, se observó que *BoNYC1* muestra un aumento de expresión mayor que los controles hacia las 72 h, y un descenso hacia las 120 h sin diferencias respecto al control. Por otro lado, *BoNOL* mostró una disminución de su expresión tanto al día 3 como el día 5 de su almacenamiento siendo esta significativamente menor que los controles. Por último, *BoHCAR* mostró un aumento de su expresión tanto a las 72 h como a las 120 h, respecto a los controles (Figura 21).

Los resultados de color superficial y contenido de clorofilas totales obtenidos permiten demostrar que los tratamientos con atmósfera modificada, en este caso, bolsas de polietileno sin perforar de 40 µm de grosor, son una buena estrategia para prolongar la vida útil de brócoli y conservar su color superficial. La composición atmosférica alcanzada con estos empaques permitió que se establezca un rango aceptable, para el producto en cuestión, de concentración de los gases O₂ y CO₂, ya que además no fueron detectados malos aromas al abrir las bolsas. Como ya se mencionó en la Introducción, los empaques de atmósfera modificada generan además de una menor tasa respiratoria, una menor

producción de etileno y disminución de la sensibilidad al mismo, lo cual retrasa la entrada en senescencia. Se han reportado retrasos en la degradación de clorofilas debido a los empaques de atmósfera modificada en espárragos (Tenorio *et al.*, 2004), espinaca (Kaur *et al.*, 2011) y chauchas (Watada *et al.*, 1987), entre otros.

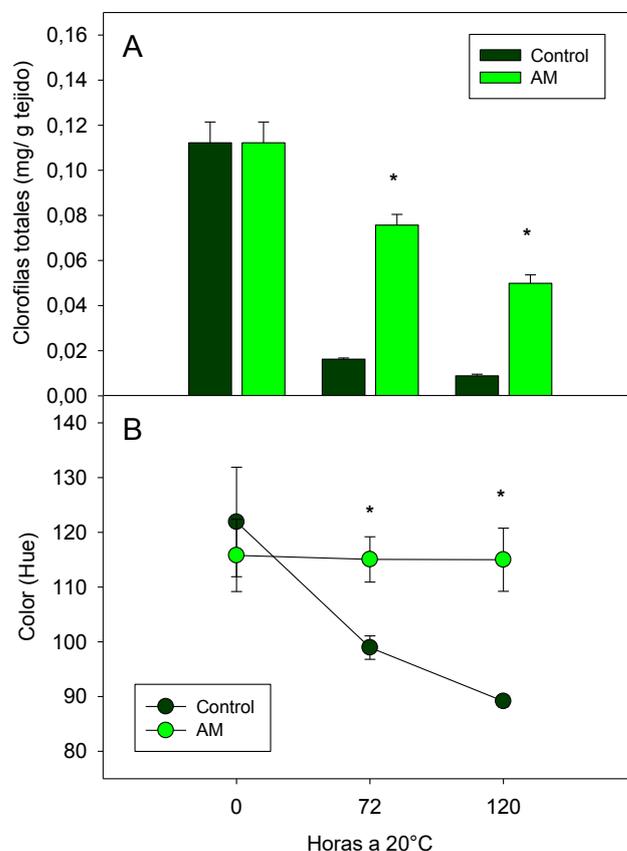


Figura 20: Contenido de clorofilas totales (A) y color superficial (B) en cabezas de brócoli tratadas con Atmósferas modificadas. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Tukey, $p < 0,05$)

Al analizar la variación en la expresión de los genes notamos un comportamiento diferencial entre ellos. *BoNOL* mostró un descenso en la expresión con respecto a los controles mientras que *BoNYC1* y *BoHCAR* muestran un aumento. El descenso observado en la expresión de *BoNOL* coincide con lo reportado para los genes *BoSGR* y *BoPaO* de la vía de degradación de clorofilas (Gomez-Lobato *et al.*, 2012; Gomez-Lobato *et al.*, 2014) y concuerda con una menor tasa de degradación de clorofilas de las cabezas tratadas. Mientras que *BoNYC1* y *BoHCAR* aumentaron su expresión con el tratamiento. Se ha reportado que durante almacenamientos a altas concentraciones de CO_2 y bajas de O_2 ocurre la inducción de muchos genes asociados con la respuesta al estrés (Eason *et al.*, 2007) así como la represión de genes asociados a la senescencia como proteasas. Se ha visto también que tratamientos con altas concentraciones de CO_2 en bananas retardan la degradación de clorofilas en la piel y la misma no correlaciona con la expresión de los genes de la vía de degradación de clorofilas como *NYC1* y *PaO* que aumentaron su expresión (Song

et al., 2015). Es posible que tanto *BoNYC1* como *BoHCAR* jueguen algún otro rol en la regulación de la vía bajo esas condiciones de estrés.

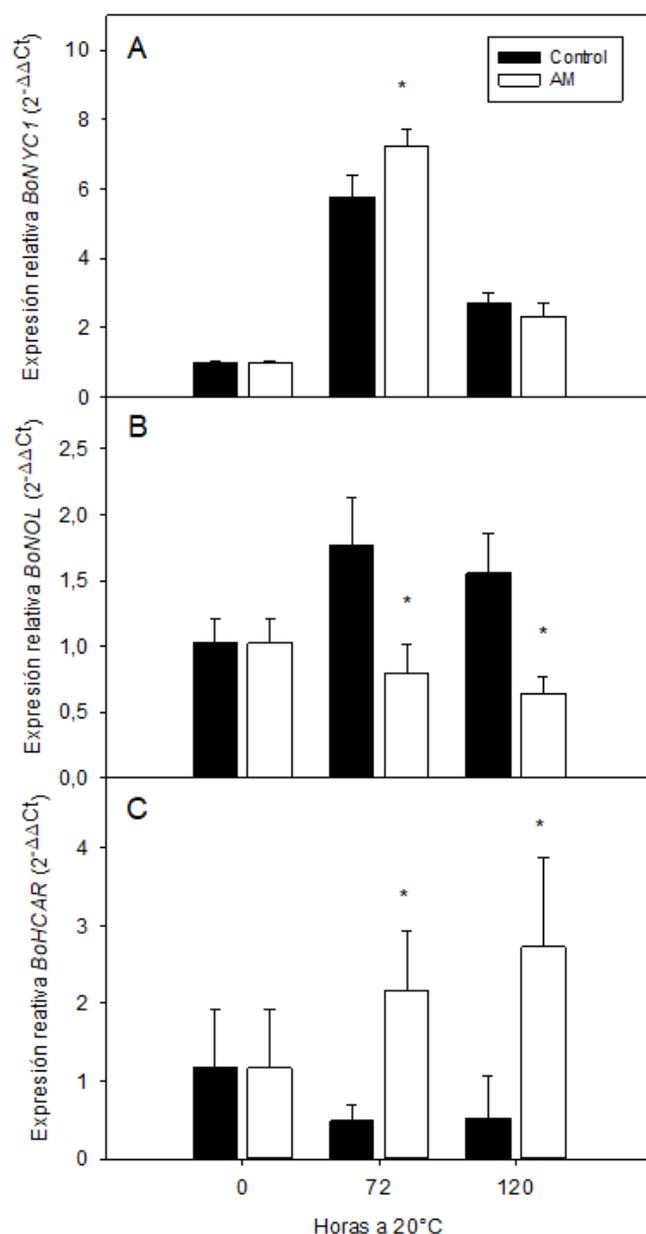


Figura 21: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en inflorescencias de brócoli tratado con Atmósfera Modificada (AM), y almacenado durante 120 h a 20 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

4.3.8. Tratamiento Térmico

Muchos trabajos han demostrado que tratamientos poscosecha que consisten en la exposición a altas temperaturas (39-55 °C) por un corto período de tiempo permiten prolongar la vida de frutas y hortalizas, como apio (Viña *et al.*, 2007), mango (Kumah *et al.*, 2011), durazno (Liu *et al.*, 2012), lima (Kaewsuksaeng *et al.*, 2015), y muchas más. En brócoli,

particularmente, se ha descrito que los tratamientos térmicos contribuyen a retrasar su senescencia y por consiguiente la degradación de clorofilas (Costa *et al.*, 2005b; Lemoine *et al.*, 2009; Duarte-sierra *et al.*, 2017). En base a estos resultados se buscó estudiar cómo varía la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* en un tratamiento térmico ya utilizado previamente por el grupo de trabajo.

Se realizaron medidas del color superficial y contenido de clorofilas totales a las 0 h, 72 h y 120 h de almacenamiento (Figura 22). Se puede observar que las muestras tratadas térmicamente (42 °C por 3 h) presentaron una mayor retención del contenido de clorofilas y conservación del color a las 72 h mientras que no se observaron diferencias a las 120 h en ambos parámetros.

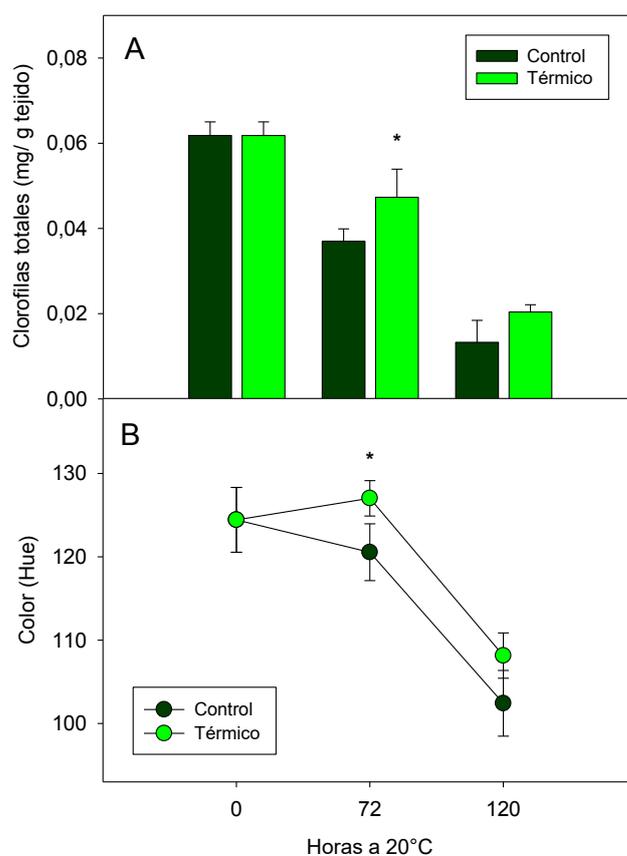


Figura 22: Contenido de clorofilas totales (A) y color superficial (B) en cabezas de brócoli tratadas con Tratamiento Térmico. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Tukey, $p < 0,05$)

Con respecto a la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR*, no se observaron diferencias significativas en los brócolis tratados respecto de los controles (Figura 23). Sugiriendo que el retraso en la degradación de clorofilas causada por el tratamiento se debería al efecto sobre otros genes más que sobre los estudiados.

En este sentido, se ha descrito que los tratamientos térmicos retrasan la degradación de clorofilas en sistemas muy diversos (Viña *et al.*, 2007; Lemoine *et al.*, 2009; Kaewsuksaeng *et al.*, 2015) y, en general, provocando cambios en la actividad enzimática u

expresión de genes de la vía de degradación de clorofilas. De hecho, en brócoli, en los trabajos de Funamoto *et al.*, (2002) y Costa *et al.*, (2006) se comprobó que el tratamiento térmico provoca una disminución en las actividades de la enzimas vinculadas a la degradación de clorofilas.

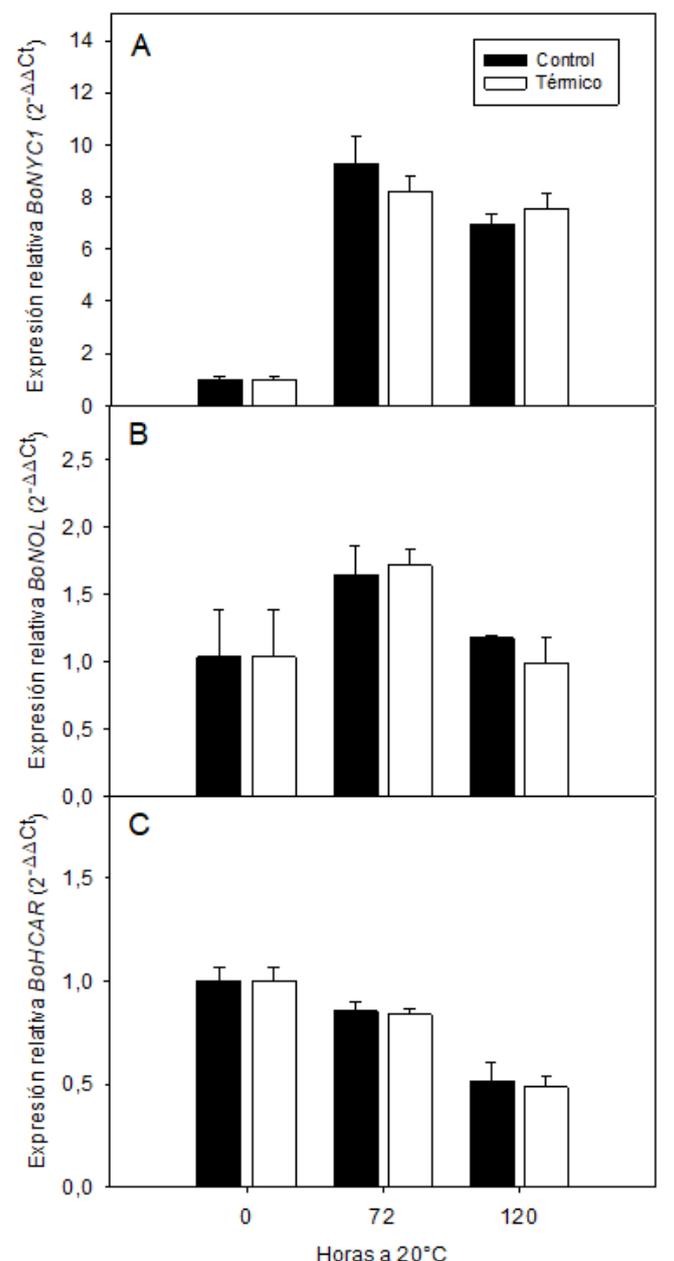


Figura 23: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en inflorescencias de brócoli tratado con Tratamiento Térmico, y almacenado durante 120 h a 20 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Además, se han reportado variaciones en la expresión de enzimas de la vía de degradación de clorofilas, como *PaO* (Gomez-Lobato *et al.*, 2012), *SGR* (Gomez-Lobato *et al.*, 2014) y *PPH* (Büchert *et al.*, 2011), donde se ha visto una disminución en su expresión en las muestras de brócoli tratadas con aire caliente. Estas proteínas junto con otras del

metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como proteínas del choque térmico (HSP) se han visto sobreexpresadas bajo tratamientos térmicos (Zhang *et al.*, 2011) y podrían ser parte de la explicación del mecanismo de acción al actuar como moléculas señal y desencadenar otras respuestas.

4.3.9. Tratamiento con Luz Blanca

Se sabe que la oscuridad induce la senescencia de los órganos verdes y que aún con un estado avanzado del proceso de senescencia, ésta puede ser revertida (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Asimismo, muchas de las hortalizas luego de ser cosechadas continúan siendo fotosintéticamente activas, es por todo esto que la luz puede tornarse en un factor muy influyente en la vida poscosecha de las frutas y hortalizas.

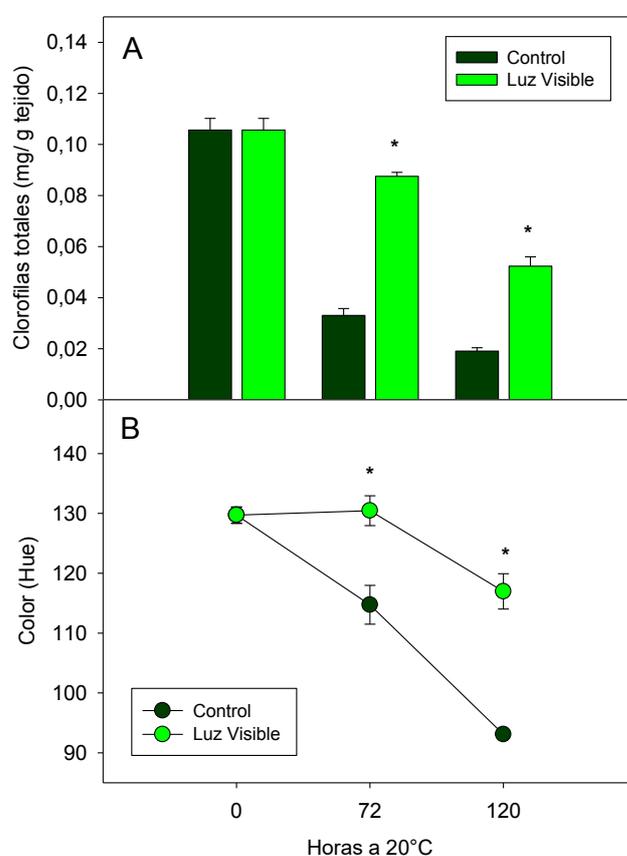


Figura 24: Contenido de clorofilas totales (A) y color superficial (B) en cabezas de brócoli tratadas con Luz Visible. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Tukey, $p < 0,05$)

Diversos estudios llevados a cabo en kale (Bárcena, Martínez and Costa, 2019), espinaca (Gergoff Grozeff, Chaves and Bartoli, 2013), albahaca (Costa *et al.*, 2013) y lechuga (Charles *et al.*, 2018), entre otros, demostraron un retraso en la senescencia y conservación del color verde debido a tratamientos con pulsos de luz visible. En base a estudios previos realizados por el grupo de trabajo en brócoli (Büchert *et al.*, 2010; Agustín M. Büchert, Civello and Martínez, 2011) donde se observaron además cambios en la expresión génica, se

decidió evaluar el efecto de un tratamiento con luz visible sobre la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* de la vía de degradación de clorofilas.

En el tratamiento con Luz Visible notamos que las cabezas conservaron su color a lo largo de los días de almacenamiento, mostrando diferencias significativas en el ángulo Hue tanto a las 72 h como 120 h respecto de los controles (Figura 24 panel B). Del mismo modo al realizar la determinación del contenido de clorofilas totales nos encontramos con una mayor concentración de estos pigmentos en las cabezas tratadas respecto de los controles (Figura 24 panel A). En la Figura 25 se observó, además, que tanto *BoNOL* como *BoHCAR* no mostraron cambios en su expresión con el tratamiento mientras que *BoNYC1* evidenció un aumento a las 72 h respecto del control, y ninguna diferencia a las 120 h.

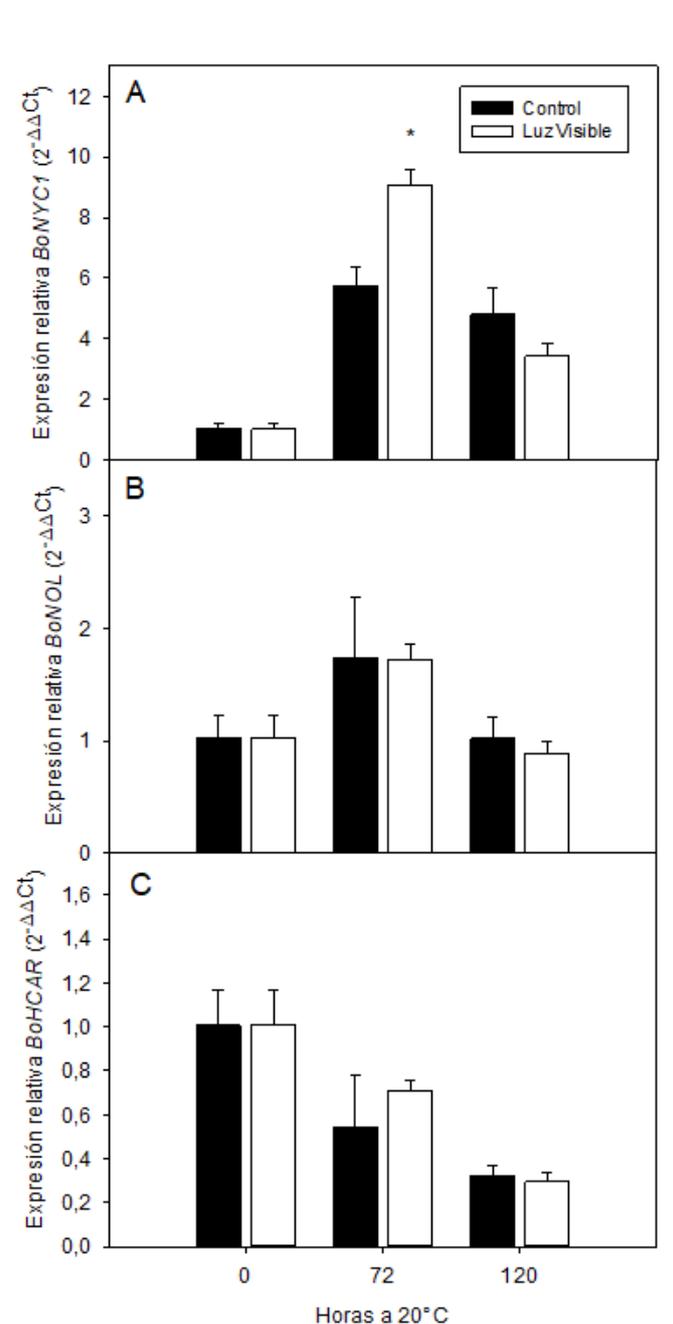


Figura 25: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en inflorescencias de brócoli tratado con Luz Visible, y almacenado durante 120 h a 20 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

A pesar de que los tratamientos con luz blanca demostraron un retraso en la degradación de las clorofilas en brócoli, lo descrito respecto al efecto de la luz visible en la expresión de los genes del catabolismo de clorofilas es variable. Por ejemplo, la expresión de clorofilasa (CHL2) y feofitinas (PPH) es reducida por la luz (Büchert *et al.* 2011), mientras que la proteína SGR incrementa su expresión (Gomez-Lobato *et al.*, 2014) y feofórbido a oxigenasa (PaO) no muestra variaciones (Gomez-Lobato *et al.*, 2012).

El aumento de expresión de *BoNYC1* nos llevó a plantear la realización de un análisis bioinformático de la región promotora mediante el programa PlantCARE. Se utilizó este software para evaluar los elementos cis regulatorios de la región aguas arriba del gen, secuencia disponible en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology information). El programa logró predecir distintos tipos de elementos regulatorios a lo largo del promotor, y los más frecuentes fueron los relacionados a la respuesta a la luz (Tabla), lo que podría explicar la respuesta de *BoNYC1* en brócoli almacenado bajo condiciones de luz continua.

Por otro lado, se reportó en *Arabidopsis* que tanto la expresión de *NYC1* como de su homólogo *NOL*, se incrementan marcadamente bajo condiciones de luz intensa, asociado a una disminución en el contenido de clorofila, lo que indicaría un aumento de la actividad de las algunas enzimas de la vía degradativa (Sato *et al.*, 2015).

4.3.10. Tratamiento con radiación UV-C

Se ha descrito ampliamente la utilización de dosis moderadas de UV-C como una metodología eficaz para prolongar la vida útil de distintas frutas y hortalizas, tales como mango (González-Aguilar *et al.*, 2007), tomate (Pinheiro *et al.*, 2015) y brócoli (Costa *et al.*, 2006), entre otros. Asimismo, en hortalizas verdes se reportó un retraso en la degradación de las clorofilas y variaciones en la expresión génica bajo el tratamiento con UV-C (Büchert *et al.*, 2011; Martínez-Sánchez *et al.*, 2019). Por tales razones, se buscó estudiar el efecto de este tipo de tratamientos en la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* de la vía de degradación de clorofilas en brócoli.

Se evaluó el contenido de clorofilas totales y color superficial durante 5 días de almacenamiento a 20 °C en oscuridad (Figura 26). Se puede observar que las muestras tratadas con luz UV-C mostraron una menor degradación de clorofilas, siendo significativo a las 72 h y 120 h. Correlacionando con esta medida, se observa también que el color superficial se mantuvo en las muestras tratadas, es decir, presentaron un menor amarillamiento.

En cuanto a la expresión relativa de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* (Figura 27), *BoNOL* y *BoHCAR* no mostraron diferencias en el perfil de expresión entre las muestras tratadas y los controles, mientras que el gen *BoNYC1* mostró una menor expresión a las 72 h respecto del control.

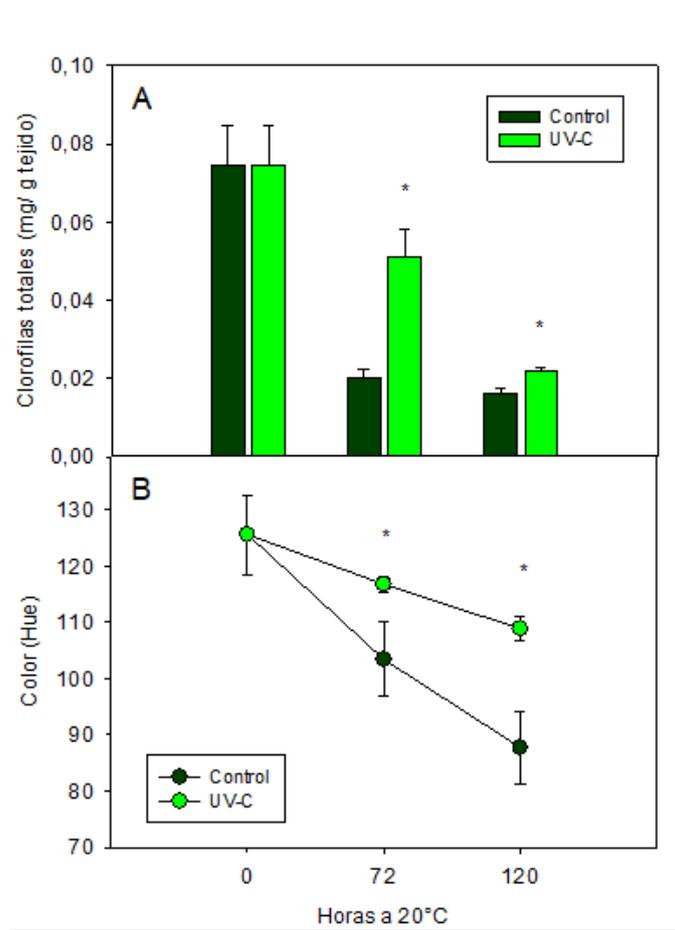


Figura 26: Contenido de clorofilas totales (A) y color superficial (B) en cabezas de brócoli tratadas con radiación UV-C. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Tukey, $p < 0,05$)

La menor expresión de *BoNYC1* registrada en las muestras tratadas concuerda por un lado con la retención del contenido de clorofilas totales medido en estas muestras y, por otro lado, es similar a la respuesta obtenida en la expresión de los genes: PPH (Büchert *et al.*, 2011), SGR (Gomez-Lobato *et al.*, 2014) y PaO (Gomez-Lobato *et al.*, 2012) que han reportado una disminución de su expresión tanto a las 72 h como 120 h luego del tratamiento.

Estos resultados estarían indicando que los tratamientos con luz UV-C ejercen parte de su efecto en prolongar la vida poscosecha de brócoli por modificación del perfil de expresión de genes de la vía de degradación de clorofilas. Además de esto, también se ha reportado una menor actividad de enzimas de la vía de degradación de clorofilas como son las clorofilasas, Mg-dequelatasa y clorofila peroxidasas, así como una disminución en la tasa respiratoria (Costa *et al.*, 2006).

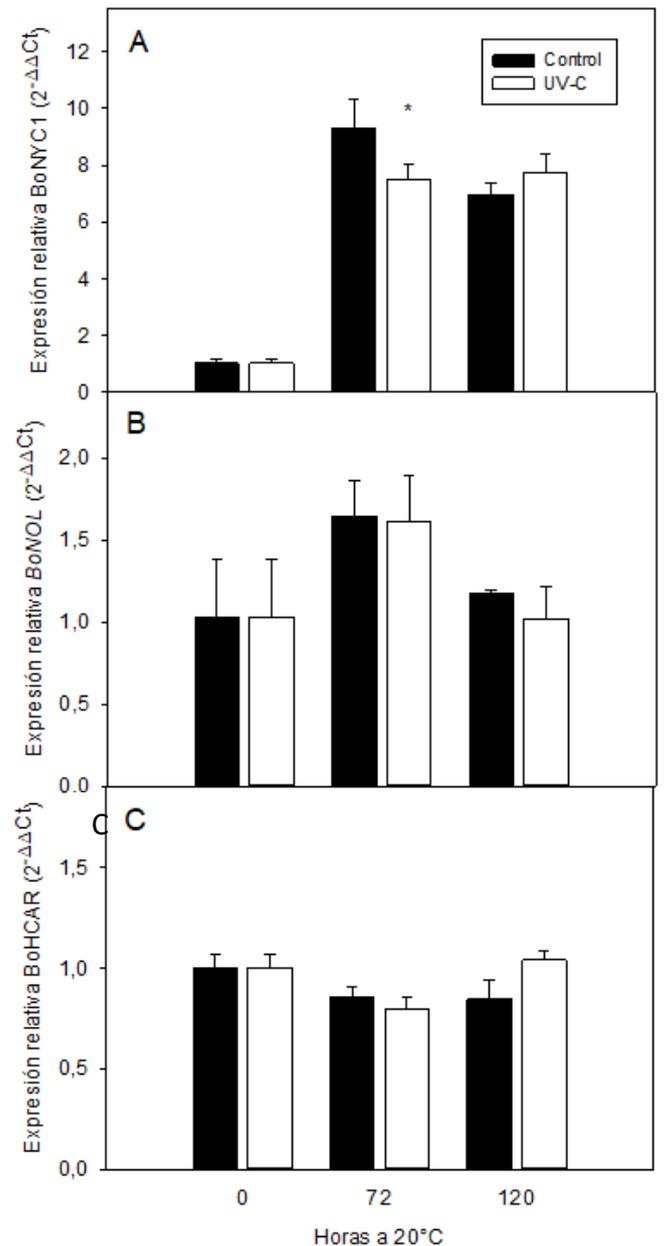


Figura 27: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en inflorescencias de brócoli tratado con radiación UV-C, y almacenado durante 120 h a 20 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

4.3.11. Ensayo de Tres Cosechas

Se ha descrito que la vida útil de frutas y hortalizas puede depender de diversos factores precosecha tales como el clima, el suelo, fertilización, estación del año, estrés vegetal y todo lo relacionado con el manejo del cultivo. En trabajos previos realizados por nuestro grupo se analizó el efecto que tiene realizar la cosecha de brócoli a diferentes horas del día (8 h, 13 h y 18 h) sobre su vida poscosecha (Hasperué *et al.*, 2011), diferentes

metabolitos y algunos de los genes de la vía de degradación de clorofilas (Hasperué *et al.*, 2013; Casajús *et al.*, 2019). En estos trabajos se detectaron importantes diferencias en el metabolismo de las cabezas de acuerdo al momento de cosecha, por lo que resultó de interés el estudio de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* en este tipo de ensayos.

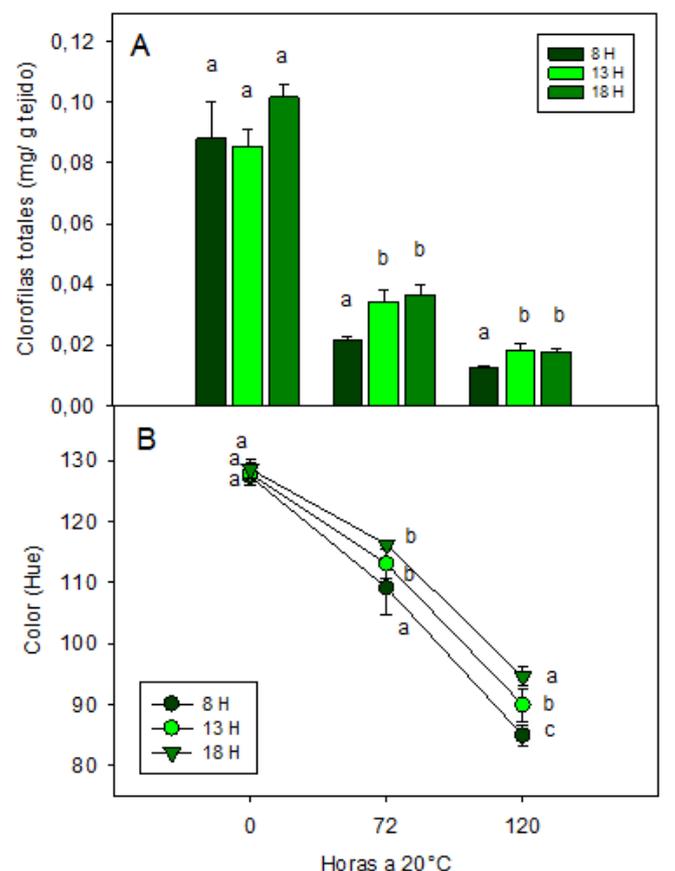


Figura 28: Contenido de clorofilas totales (A) y color superficial (B) en cabezas de brócoli sometidas al ensayo de Tres Cosechas. Las letras distintas representan diferencias significativas para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Tukey, $p < 0,05$)

Las cabezas de brócoli se cosecharon a diferentes horas del día y se almacenaron durante 5 días en oscuridad a 20 °C. Se realizó el seguimiento de la senescencia mediante la determinación del contenido de clorofilas totales y color superficial.

Se puede observar en la Figura 28 panel B que el ángulo Hue se mantuvo más elevado en las muestras cosechadas a las 13 h y 18 h al día 3 mientras que al día 5to se conservó superior el valor de Hue de las cabezas cosechadas a las 18 h y el menor valor se observó en las cabezas cosechadas a las 8 h. Por otro lado, con respecto al contenido de clorofilas (Figura 28 panel A) se observa que las mismas se mantuvieron en mayor concentración en las cabezas cosechadas a las 13 h y 18 h, tanto a las 72 h como a las 120 h. Podemos concluir hasta aquí que las cosechas a horas más tardías estarían conservando más el color y las clorofilas, siendo la cosecha de las 18 h la que mejor conservó ambas.

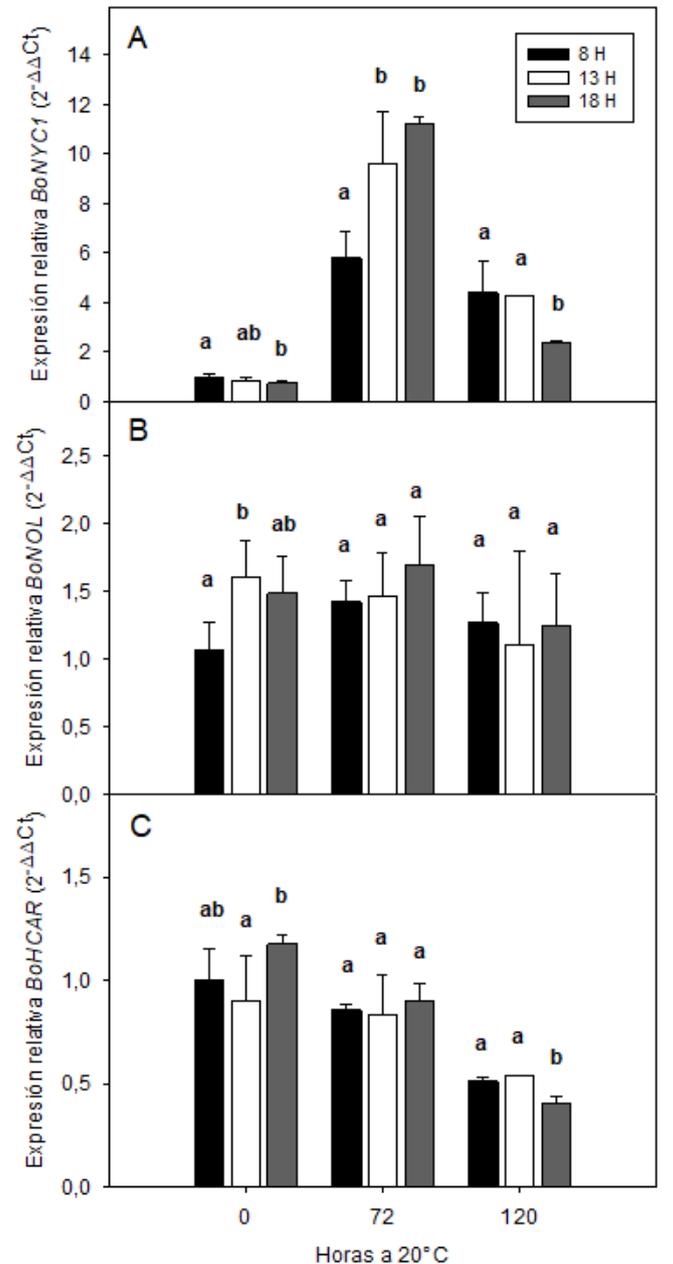


Figura 29: Expresión relativa de *BoNYC1* (A), *BoNOL* (B) y *BoHCAR* (C) en inflorescencias de brócoli de acuerdo al ensayo de Tres Cosechas, almacenado durante 120 h a 20 °C. Las letras distintas indican diferencias significativas para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Por último, se realizó el análisis de la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* (Figura 29). Se puede observar en el panel A que *BoNYC1* presenta el mismo perfil de expresión a las distintas horas de cosecha, presentando un pico a las 72 h y luego un descenso a las 120 h. Se puede apreciar también que a las 0 h (cosecha a las distintas horas del día) hay una menor expresión a las 18 h respecto de las 8 h. También se observa que luego de tres días de almacenamiento hay una mayor expresión en las cosechas de las 13 h y 18 h. Mientras que luego de cinco días la cosecha de las 18 h muestra una menor expresión de *BoNYC1*. Por otro lado, en el caso de *BoNOL* (panel B) no se detectaron variaciones en los

distintos horarios de cosecha, solo a las 0 h se puede apreciar que aumenta levemente su expresión a las 13 h respecto de las 8 h. Finalmente, la expresión de *HCAR* (panel C) disminuye con la senescencia a las distintas horas de cosecha. Se observa que a las 0 h presenta un pequeño aumento a las 18 h respecto de las 13 h, mientras que luego de cinco días, por el contrario, se observa una menor expresión en las muestras cosechadas a las 18 h, al igual que *BoNYC1*.

Lo que se observa en el color y contenido de clorofilas guarda algo de relación con la expresión de los genes, en el sentido que la cosecha de las 18 h mostró una mayor retención del contenido de clorofilas totales y conservación del color superficial, y es a esa hora de cosecha que se vio una menor expresión de los genes *BoNYC1* y *BoHCAR* al último día de observación (120 h). Resultado similar se observó en los genes *SGR*, *CHL2*, *PaO* y *PPH*, donde se observó que su expresión disminuía en la cosecha de las 18 h hacia las 96 h de almacenamiento a 20 °C en oscuridad respecto de su expresión en las muestras cosechadas en la primera hora (8 h) (Hasperué *et al.*, 2013). Sugiriendo que quizá la vía se encuentre menos activa en las cabezas cosechadas en la última hora del día.

Se han reportado que la cosecha hacia el final del día de lechuga y rúcula permite extender la vida útil de ambas hortalizas (Clarkson *et al.*, 2005). Asimismo, la cosecha de melisa en las últimas horas del día presenta un mayor contenido de aceites esenciales respecto de horas más tempranas (Simionatto *et al.*, 2009). Diferentemente, en soja se no se observan variaciones con respecto a la calidad nutricional (Santana *et al.*, 2012) y en espinaca no se detectan diferencias en la vida poscosecha (Garrido *et al.*, 2015) con la hora de cosecha.

Esto nos estaría indicando que la respuesta a la hora de cosecha depende de la especie, de su metabolismo y de cómo varía a lo largo del día. A pesar de estas observaciones, la práctica tradicional continúa recomendando cosechar en la primer hora de la mañana que es donde se obtiene el menor calor impreso en el producto cosechado y permite realizar los trabajos de empaque y distribución durante las horas de día.

4.4. Conclusiones parciales

Parte de los objetivos de ésta primer parte fueron realizar diversos análisis de la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* de brócoli bajo distintos reguladores del crecimiento, durante la senescencia, espacialmente y en distintos tratamientos postcosecha, con el fin de lograr una mayor comprensión respecto de cómo se ven influenciados estos genes de la vía de degradación de clorofilas durante los ensayos, bajo los distintos tipos de estrés sometidos.

De los resultados obtenidos se pueden elaborar una serie de conclusiones preliminares. Respecto de su expresión temporal, la expresión de los genes *BoNYC1* y *BoNOL* tiende a aumentar con la senescencia, al menos hasta las 72 h y luego *BoNOL* presenta un leve descenso hacia las 120 h. Esta observación es esperable ya que la vía de degradación de clorofilas es una vía que se activa durante esta etapa y por lo tanto muchas de las enzimas aumentan su expresión, como es el caso de *PPH*, *PaO* y *SGR*. Por otro lado, *BoHCAR* mostró siempre un descenso, y si comparamos lo que ocurre entre las 0 h y 120 h, tanto *BoNOL* como *BoHCAR* disminuyen. Este comportamiento hacia el último día de ensayo puede ser también esperable, ya que hacia el 5to día la senescencia es avanzada, y puede no ser necesaria mantener activa la vía de degradación de clorofilas. Se ha mencionado que tanto *NOL* como *HCAR* podrían llegar a cumplir algún otro rol vinculado con la biosíntesis de clorofilas, ya que se ha visto que aumentan su expresión en brotes etiolados al ser expuestos a la luz, algo que no ocurre con *NYC1* (Sakuraba *et al.*, 2013). También se postula que *HCAR* podría estar relacionado con un mecanismo de detoxificación de ROS en las células (Piao *et al.*, 2017), desde que se reportó una acumulación de éstos al acumularse el intermediario 7 HMC a. Con respecto a la expresión espacial, se puede concluir que tanto la sección 1 (flores) como las Hojas son los tejidos metabólicamente más activos en brócoli respecto de las otras dos secciones, sección 2 (ramas) y sección 3 (tallo). En estos tejidos se observó el mayor contenido de clorofilas y los mayores cambios en la expresión de los genes.

Al realizar el análisis de fitohormonas de efecto antagonista sobre la senescencia, como son las citoquininas y el etileno, se pudo comprobar que las primeras prolongaron la vida poscosecha en brócoli, mientras que las segundas la disminuyeron. Este hecho se ve reflejado en el contenido de clorofilas y el color superficial, de valores superiores en las cabezas tratadas con 6-BAP. Con respecto a la expresión de los genes, se observó que *BoNYC1* aumentó en el tratamiento con etefón y disminuyó en el tratamiento con 6-BAP, en coincidencia con lo observado en el contenido de clorofilas. Mientras que tanto *BoNOL* como *BoHCAR* no respondieron al tratamiento con etefón, mostrando que no serían regulados por dicha fitohormona. Por otro lado, se observó que ambos genes respondieron frente a 6-BAP aumentando su expresión en el último día de ensayo, indicando que cumplirían algún otro rol en el recambio y retención de clorofilas además de participar en su degradación. En relación con estos resultados, tenemos el tratamiento con 1-MCP (inhibidor de los receptores de etileno). Durante este tratamiento se observó la prolongación de la vida poscosecha debido a un retraso en la degradación de clorofilas y conservación del color superficial tal como se había reportado en trabajos previos. Con respecto al patrón de

expresión de *BoNYC1*, el mismo disminuye en los brócolis tratados, reforzando la idea de que se trata de un gen que responde a etileno. Por otro lado, contrariamente a lo observado en el tratamiento con etefón, la expresión de *BoNOL* también se vio afectada. La disminución en su expresión puede estar indicando que presenta algún grado de respuesta a etileno, solo que no fue detectado en el ensayo previo con etefón. No hay que olvidar que se trata de ensayos independientes y que hay un número de variables que no son manejadas que pueden haber modificado su sensibilidad. Por último, la expresión de *BoHCAR* no se vio afectada por el tratamiento con 1-MCP, en concordancia con lo observado previamente.

Por otro lado, tenemos los tratamientos físicos, en el tratamiento térmico se observó la conservación del contenido de clorofilas así como el color superficial, prolongando la vida poscosecha de brócoli. Con respecto a la expresión de los genes, los mismos no respondieron al tratamiento modificando su patrón de expresión, por lo que se postula que serían otros los genes de la vía afectados por el tratamiento para lograr el retraso en la degradación de clorofilas. En los tratamientos de irradiación con luz blanca y UV-C, se observó también que ambos permitieron retrasar la senescencia de brócoli conservando por más tiempo el contenido de clorofilas y color superficial al inducir su senescencia. Con respecto a la expresión de los genes, solo *BoNYC1* se vio afectado en los dos tratamientos, mostrando un aumento de su expresión con luz blanca y una disminución con luz UV-C. Se señaló que al realizar un análisis *in silico* de la región promotora de este gen, se encontraron varios elementos regulatorios de respuesta a luz. El hecho de responder de forma distinta indica que el mecanismo de acción no debe ser el mismo, y que puede que esta enzima cumpla algún rol no solo en la degradación de la clorofila sino también en su conservación.

Respecto del tratamiento con atmósfera modificada, se puede decir que fue uno de los más efectivos al prolongar la vida poscosecha en brócoli, ya que el color superficial no cambio en los 5 días de inducción de senescencia y el contenido de clorofilas apenas descendió un poco. La expresión de los genes estudiados se vio afectada por el tratamiento, aumentando la expresión en el caso de *BoNYC1* y *BoHCAR*, y disminuyendo para el caso de *BoNOL*. Se ha visto que bajo condiciones de alta concentración de CO₂ y bajo O₂ se expresan muchos genes asociados al estrés, puede que éste sea el caso de *BoNYC1* y *BoHCAR*. Mientras que *BoNOL* se comportó como los genes *BoPaO* y *BoSGR* bajo el mismo tratamiento, disminuyendo su expresión, indicando que la vía podría estar frenada bajo estas condiciones.

Por último, en el ensayo de cosecha a distintas horas del día se detectó que las cabezas de brócoli cosechadas en la última hora del día permanecieron verdes por más tiempo, es decir, mayor contenido de clorofilas y menor caída del color superficial. Con respecto a la expresión de los genes, no se observaron grandes variaciones a lo largo del día (día 0). *BoNOL* no mostró variaciones en su patrón de expresión con las distintas horas de cosecha, mientras que *BoNYC1* aumentó su expresión a las 72 h en todas las muestras. A este tiempo se detectó mayor expresión en las muestras cosechadas a las 13 h y 18 h. Probablemente el máximo de expresión de las muestras cosechadas a las 8 h haya ocurrido antes de las 72 h dado que estas muestras senescen a una tasa mayor. Siendo así, a las 72 h la expresión de *BoNYC1* ya estaría descendiendo, mientras que las de las muestras

cosechadas a las 13 h y 18 h aún se mantienen elevadas por tener una tasa de senescencia menor. Algo similar fue observado en otros genes de la vía de degradación como *PaO*, *SGR* y *PPH* (Hasperué *et al.*, 2013), indicando que la vía estaría levemente reprimida en las cabezas cosechadas a las 18 h respecto de aquellas cosechadas a las 8 h.

5. PARTE B: Caracterización de genes asociados a la vía de síntesis de compuestos flavonoides

5.1. Introducción

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los principales grupos de metabolitos secundarios. Poseen diversos tipos de estructuras y son responsables de las principales características organolépticas de los alimentos y bebidas derivadas de las plantas, en particular su color y sabor, y contribuyen también a las propiedades nutricionales de las frutas y vegetales. Entre los compuestos fenólicos se destacan los **flavonoides**, que representan uno de los grupos de compuestos más ubicuos en las plantas. Tanto es así que se han identificado a la fecha alrededor de 8.000 clases distintas de flavonoides (Tapas *et al.*, 2008). De estos, unos de los grupos de compuestos flavonoides más conocidos son las antocianinas debido a sus colores rojo, azul y violeta presentes en flores y frutos. Los mismos cumplen un rol muy importante durante la polinización, para la atracción de insectos, y para la dispersión de las semillas (Winkel-shirley, 2002).

Se cree que uno de los principales roles de los flavonoides en las plantas, además de la recién mencionada, es la fotoprotección, esto lo realizarían neutralizando los radicales libres y demás ROS que puedan generarse debido a diversas causas: naturalmente como parte del metabolismo, debido una sobreexcitación de la cadena de transporte electrónico por una intensa radiación de luz, por algún otro tipo de estrés o factor ambiental. La localización de los mismos estaría reforzando esta idea ya que se lo localiza mayormente en la pared celular y vacuola de las células epidérmicas y en órganos con superficies expuestas al exterior como los tricomas (Agati *et al.*, 2013). Otros procesos en los que intervienen estos compuestos son la germinación del tubo polínico y la defensa contra patógenos, actuando como fitoalexinas (Cabrera y Mach, 2012). Recientemente se ha demostrado que pueden ser protectores del fotosistema II en condiciones de estrés oxidativo (Samson *et al.*, 2020). Los **flavonoles**, otro gran grupo dentro de los compuestos flavonoides, serían los principales responsables de la protección de las superficies expuestas. Se trata de los compuestos más antiguos y dispersos por el reino vegetal, presentes incluso en musgos y helechos, y presentan un amplio rango de actividades fisiológicas (Winkel-shirley, 2002).

En mamíferos, la presencia de radicales libres y ROS están asociadas con numerosos tipos de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer (Panth *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2017; Prasad *et al.*, 2017) entre otras. Diversos estudios han demostrado que el consumo de compuestos antioxidantes previene el desarrollo de muchas de estas enfermedades. Agudo *et al.* (2008) describe que un alto consumo de frutas y hortalizas ricas en antioxidantes es asociado con una menor mortalidad. Por otro lado, en un ensayo clínico realizado en el trabajo de Han *et al.* (2013) se reporta una menor incidencia en el desarrollo de cáncer de páncreas en pacientes que llevan una dieta rica en antioxidantes. En otro

ensayo clínico se detectó una correlación opuesta entre el desarrollo de cáncer de pulmón con una dieta rica en compuestos antioxidantes (Wright *et al.*, 2004).

Entre las principales acciones de los compuestos flavonoides en el organismo se encuentran la actividad quelante de metales y antioxidante, pero también se reportan actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antimicrobianas, antitrombóticas, hepatoprotectoras, antivirales y anticarcinogénicas (Tapas *et al.*, 2008; Cabrera y Mach, 2012). Dentro de la lista de flavonoides estudiados que reportan estas actividades, se encuentran la **quercetina** y el **kaempferol**, principales flavonoides en brócoli. Parte de las propiedades que se le atribuyen al brócoli en relación a la salud, se debe a la presencia de estos compuestos (Gawlik-Dziki *et al.*, 2014; Hwang y Lim, 2015; Ninh Le *et al.*, 2019).

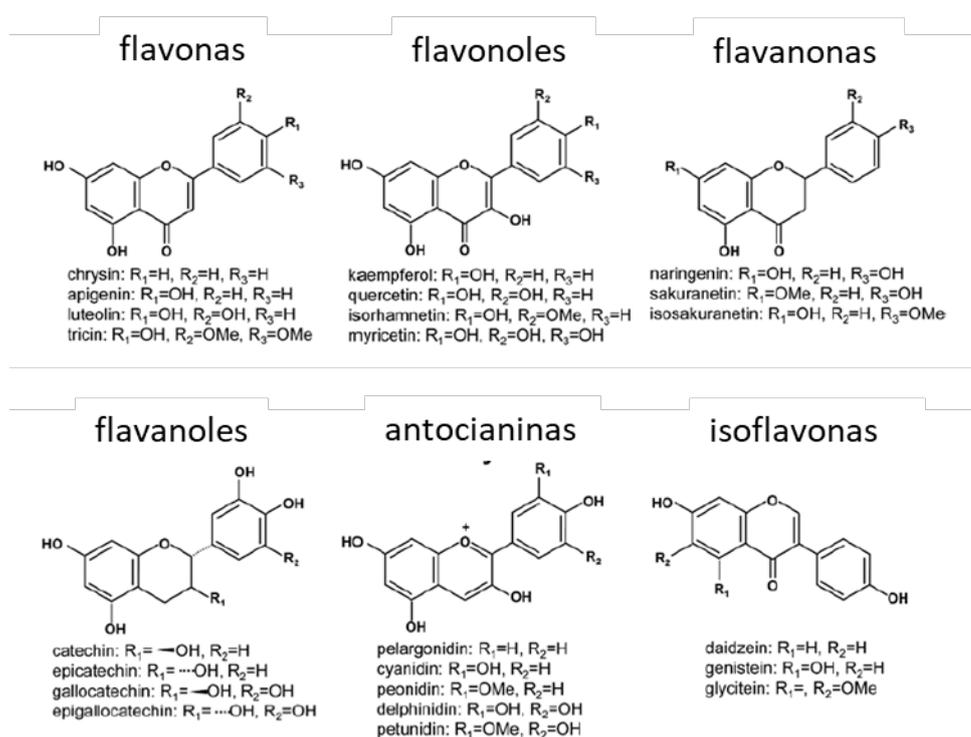


Figura 30: Estructura de los distintos grupos de compuestos flavonoides.

(Fuente: Tohge, T., De Souza, L. P. and Fernie, A. R. (2017) "Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants")

Es debido a las diversas actividades detectadas en estos flavonoides que ha sido de interés estudiar qué ocurre con el metabolismo de estos compuestos en cabezas de brócoli sometidas a tratamientos poscosecha que habitualmente se utilizan para retrasar la senescencia. En muchos trabajos se ha buscado exacerbar la acumulación de estos compuestos fenólicos así como de glucosinolatos en brócoli, por distintos métodos y utilizarlos como biofábricas (Pérez-Balibrea *et al.*, 2011; Jacobo-velázquez, 2016; Natella *et al.*, 2016). Se ha reportado, por ejemplo, que muchos tratamientos con pulsos de luz suelen generar en brócoli, además de un retraso en su senescencia, un incremento de compuestos flavonoides (Darré *et al.*, 2017; Loi *et al.*, 2019). Estas inducciones suelen ocurrir a nivel de la

vía de síntesis de los compuestos flavonoides, en la actividad y/o expresión de las enzimas involucradas.

Los flavonoides más abundantes pueden ser clasificados en 6 grupos: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas. Todos estos compuestos presentan un esqueleto en común, que comprenden tres anillos bencénicos unidos, y difieren en el tipo y cantidad de hidroxilaciones, así como la presencia de otros grupos funcionales (Figura 30). Tanto quercetina como kaempferol se encuentran dentro de los flavonoles. La biosíntesis de estos metabolitos secundarios comprende una serie de reacciones acopladas, donde el sustrato inicial es el aminoácido fenilalanina. En la siguiente figura se presenta un esquema general de la vía y las enzimas involucradas en la síntesis de los flavonoides mayoritarios en brócoli, así como otros compuestos de importancia derivados de la vía.

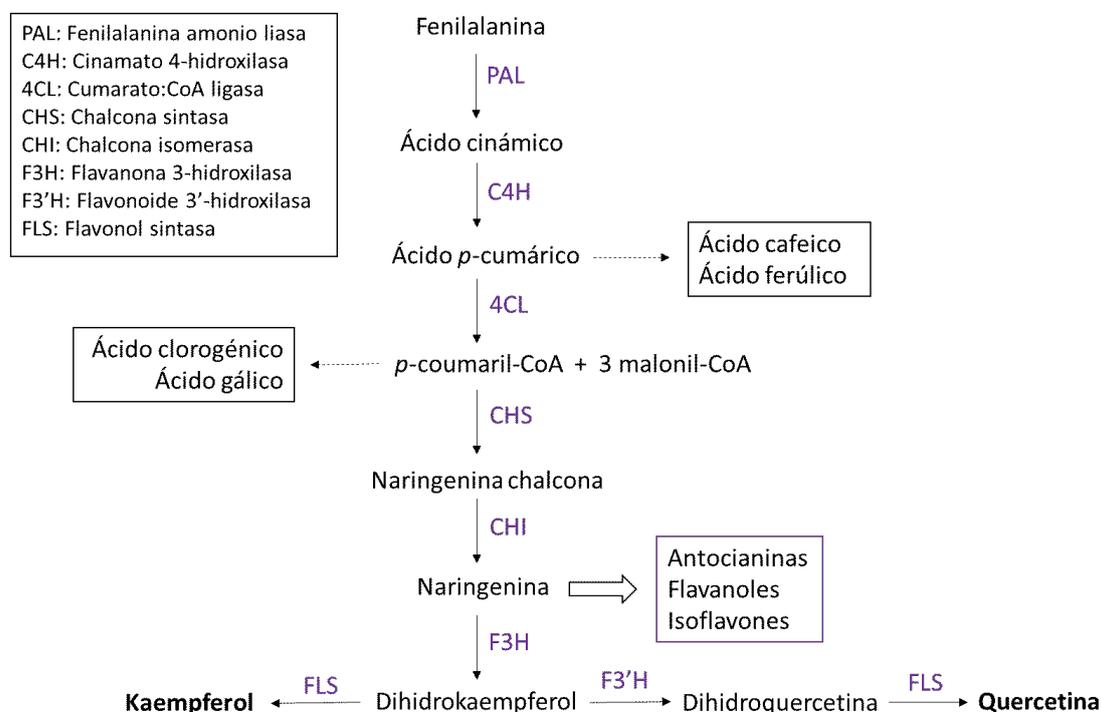


Figura 31: Esquema general de la vía de biosíntesis de compuestos flavonoides.

En estudios previos realizados por el grupo de trabajo se analizó la expresión de un gen codificante de la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa), primer enzima de la vía y responsable de catalizar la conversión de fenilalanina en ácido cinámico, en distintos tratamientos poscosecha realizados en brócoli (Gómez-Lobato *et al.* 2014b). Como una continuación de los estudios realizados en PAL, se decidió realizar el análisis de la expresión de genes codificantes de las enzimas CHS (Chalcona sintasa) y CHI (Chalcona isomerasa), enzimas involucradas en la formación del esqueleto primario anillado en base al cual se sintetizan los compuestos flavonoides. En la Figura 32 se puede observar las reacciones llevadas a cabo por estas enzimas y la estructura de los intermediarios.

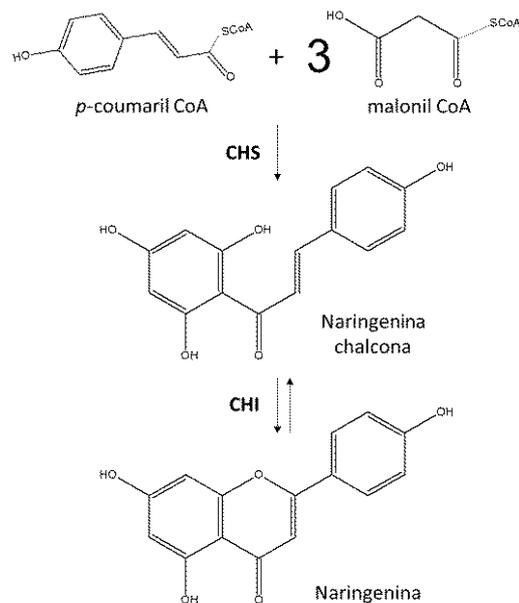


Figura 32: Reacciones que llevan a la formación de naringenina. Rol de chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI).

La enzima Chalcona sintasa es la enzima responsable de la reacción de condensación entre una molécula de *p*-coumaril CoA y tres moléculas de malonil-CoA para formar naringenina chalcona, primer molécula que actúa como la estructura base para la síntesis de los distintos flavonoides (Durbin *et al.*, 2000). Esta enzima se cree que actúa como homodímero y demostró no tener un único sustrato *in vitro*, por tanto podría participar de otras vías paralelas disminuyendo la eficiencia en la síntesis de compuestos flavonoides (Martin, 1993). Esta promiscuidad catalítica, que ya se ha registrado en otras enzimas, es parte de mecanismos adaptativos de los vegetales al medioambiente.

En muchas especies CHS se comporta como una gran familia de genes, presentando hasta ocho copias en soja (Matsumura *et al.*, 2005) y petunia (Koes *et al.*, 1989) y seis copias en la flor "Morning Glory" (o gloria de la mañana) (Fukada-Tanaka *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha registrado hasta la fecha una sola copia en *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2007). Se ha comprobado en diversos trabajos que los mutantes de este gen ocasionan un fenotipo sin pigmentación en flores (Durbin *et al.*, 2000) y un menor contenido de compuestos flavonoides (O'Neill *et al.*, 1990; Meldgaard, 1992). Estos resultados estarían indicando la importancia de esta enzima para la vía.

La enzima Chalcona isomerasa cataliza la reacción que convierte la molécula de naringenina chalcona en naringenina. Al igual que chalcona sintasa también presentan copias múltiples en algunas especies, por ejemplo se encontraron hasta cinco copias de *CHI* en soja (Ralston *et al.*, 2005) pero hay reportada la presencia de una única copia en *Arabidopsis* (Kuittinen y Aguadé, 2000). Se ha informado que una sobreexpresión de esta enzima en tomate, genera un mayor contenido de compuestos fenólicos (Muir *et al.*, 2001). Por otro lado, se reporta en flores de tabaco que la supresión de este gen ocasiona una

menor pigmentación y menor acumulación de compuestos flavonoides (Nishihara *et al.*, 2005). CHI es por tanto una enzima clave de la vía. Por último, se postula CHS, CHI y alguna enzima más de la vía como F3H podrían formar complejos catalíticos, de modo de maximizar la eficacia en la biosíntesis y poder dar respuesta de forma más rápida a variaciones medioambientales (Ralston *et al.*, 2005).

5.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta parte son:

- ❖ Caracterizar la expresión espacial y temporal (durante la senescencia) de los genes *BoCHS* y *BoCHI*.
- ❖ Analizar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la expresión de dichos genes.
- ❖ Analizar el efecto de distintos tipos de tratamientos postcosecha sobre la expresión de dichos genes.
- ❖ Correlacionar la expresión de dichos genes con los contenidos de flavonoides y fenoles totales.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Diseño de cebadores específicos

Se lograron obtener cebadores específicos para los genes *BoCHS* y *BoCHI*, recurriendo a información disponible en la base de datos del NCBI. A partir de las secuencias específicas de los genes ortólogos en *Arabidopsis thaliana* y en otras especies relacionadas se pudo obtener una secuencia consenso. A partir de esta secuencia se hizo el primer diseño de cebadores para PCR. Con el mismo juego de cebadores se amplificó un fragmento de aproximadamente 500 bp en brócoli, se envió a secuenciar y a partir de esta información se realizó el diseño del segundo juego de cebadores, específicos para RT-qPCR, amplificando un fragmento de aproximadamente 100 bp. La información respecto de las secuencias se encuentra detallada en Materiales y Métodos. A continuación, en las Figuras 33 y 34 se muestran los respectivos alineamientos.



Figura 33: Alineamiento para el diseño de los cebadores para PCR del gen *BoCHS*

Otros estudios también han descrito un aumento del contenido de flavonoides durante la senescencia poscosecha (Costa *et al.*, 2006; Casajús *et al.*, 2019), en este sentido es de esperar que enzimas involucradas en su biosíntesis aumenten su expresión y/o actividad. Y es lo que se reporta en el trabajo de Lemoine *et al.* (2010) donde se observa que la actividad de PAL (fenilalanina amonio liasa) aumenta con la senescencia en brócoli (Lemoine *et al.*, 2010). Mientras que lo que respecta a la expresión génica de esta enzima, la misma no pareciera modificarse mucho dentro de los dos días de poscosecha en brócoli (Guo *et al.*, 2011).

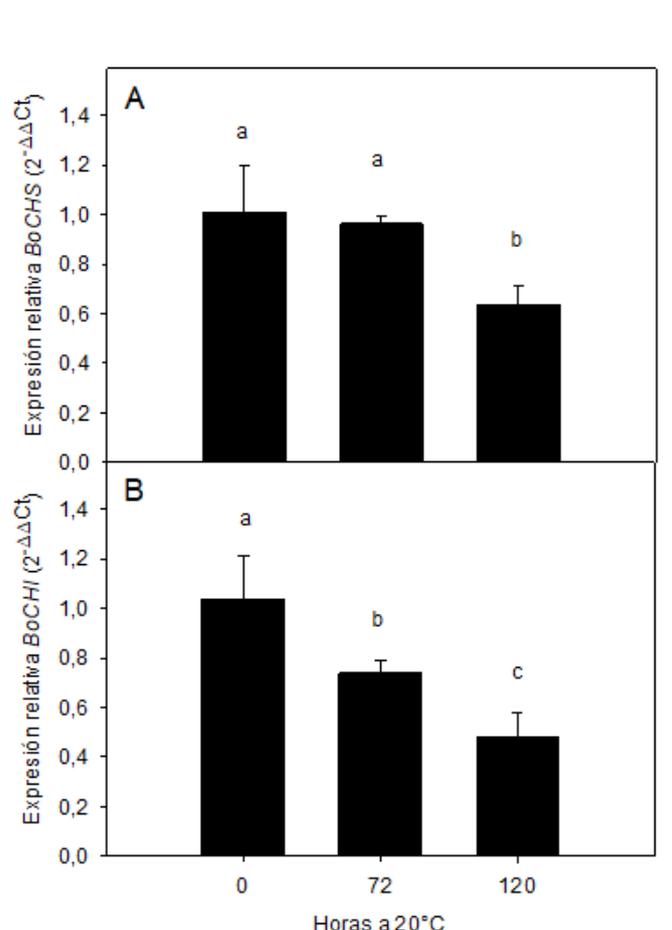


Figura 36: Expresión relativa de *BoCHS* (A) y *BoCHI* (B) en inflorescencia de brócoli almacenado durante 120 h a 20 °C en oscuridad. Las letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Podemos notar que no habría una correlación entre el perfil de expresión de los genes *BoCHS* y *BoCHI*, y el contenido de flavonoides durante la poscosecha en brócoli. Lo que podría sugerir que no se requiere de la activación de la expresión de estos genes para lograr el incremento en la concentración de flavonoides. De todas maneras, como se describe más adelante, los perfiles de expresión de *BoCHS* y *BoCHI* pueden ser variables.

5.3.3. Estudio en las distintas secciones de brócoli

Se buscó analizar la expresión de los genes *BoCHS* y *BoCHI* en las distintas secciones de brócoli a lo largo de su almacenamiento a 20 °C en oscuridad. También se determinó el

contenido de fenoles totales y flavonoides para analizar si hay presente alguna correlación entre la expresión y el contenido de estos metabolitos secundarios. Las distintas partes estudiadas son: sección 1 (flores), sección 2 (tallos secundarios), sección 3 (tallo principal) y hojas.

Se puede observar en la Figura 37 que el contenido de fenoles como de flavonoides se incrementó desde el día 0 de la cosecha a las 120 h (día 5) de inducción de la senescencia, en las distintas partes del brócoli. El contenido de flavonoides en las frutas y hortalizas es variable, su abundancia depende del tipo de tejido que se trate y por tanto su comportamiento durante la etapa poscosecha también puede variar. Se puede observar en algunos un incremento, como en brócoli, frutillas y durazno, y en otros, como en hortalizas de hoja, más bien un descenso (DuPont *et al.*, 2000; Mudau *et al.*, 2019).

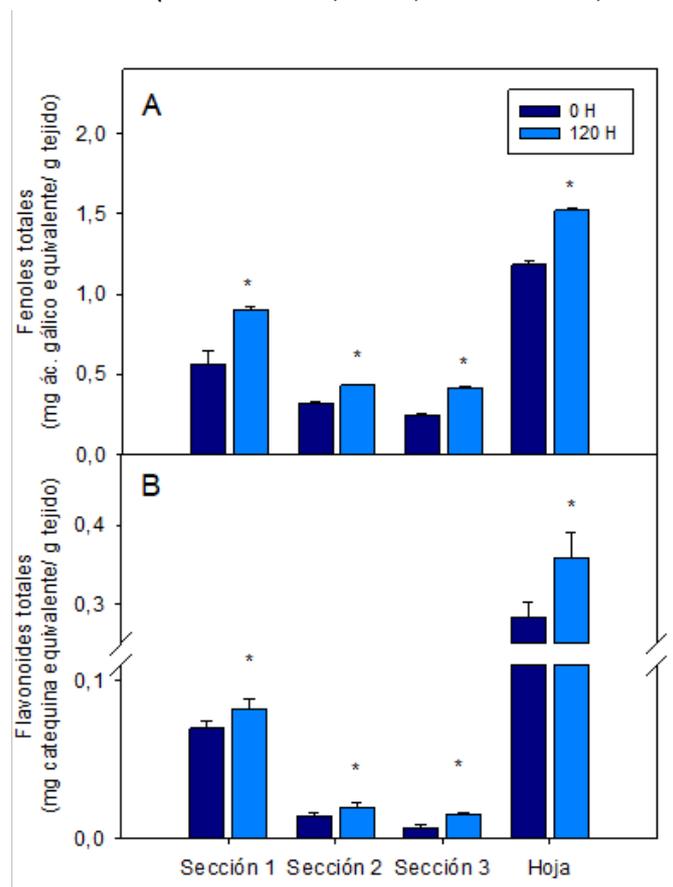


Figura 37: Contenido de fenoles totales (A) y flavonoides (B) en las distintas secciones de brócoli. Los asteriscos indican diferencias significativas para una misma sección (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Por otro lado, en la Figura 38 se muestra la expresión de los genes de estudio en las distintas secciones. Se puede observar en el panel A que *BoCHS* mostró una disminución de su expresión en hoja y en flores durante su incubación a 120 h en oscuridad, caso contrario ocurrió con la sección 2 y sección 3 donde la expresión de este gen aumentó hacia las 120 h. Por otro lado, en el panel B el gráfico de *BoCHI* muestra que la expresión de este gen disminuye en flores hacia las 120 h al igual que en las ramas secundarias, pero aumenta 8 veces su expresión en hoja hacia el quinto día en oscuridad.

La expresión que se muestra en las flores (sección 1) es semejante al perfil ya presentado, de descenso hacia las 120 h tanto en *BoCHS* como en *BoCHI*. Dado lo que se observó en la Figura 37, es posible que alguna otra enzima de la vía aumente su expresión con la senescencia y/o modifique su actividad para dar como producto este aumento en el contenido de fenoles en las flores. Por otro lado, sí se observó un incremento en la expresión del gen *BoCHI* en hoja con la senescencia, y *BoCHS* en los tallos que puede interpretarse como una activación de la vía de biosíntesis de estos compuestos. En aquellas secciones donde no se detectó un aumento, puede esperarse que alguna otra enzima de la vía se vea activada durante la etapa de senescencia, como se mencionó a la enzima PAL. También podemos decir que ambas enzimas presentarían diferente regulación en el tejido que se trate, ya que por ejemplo en hoja, donde la expresión de un gen aumenta hacia las 120 h, mientras que la expresión del otro disminuye.

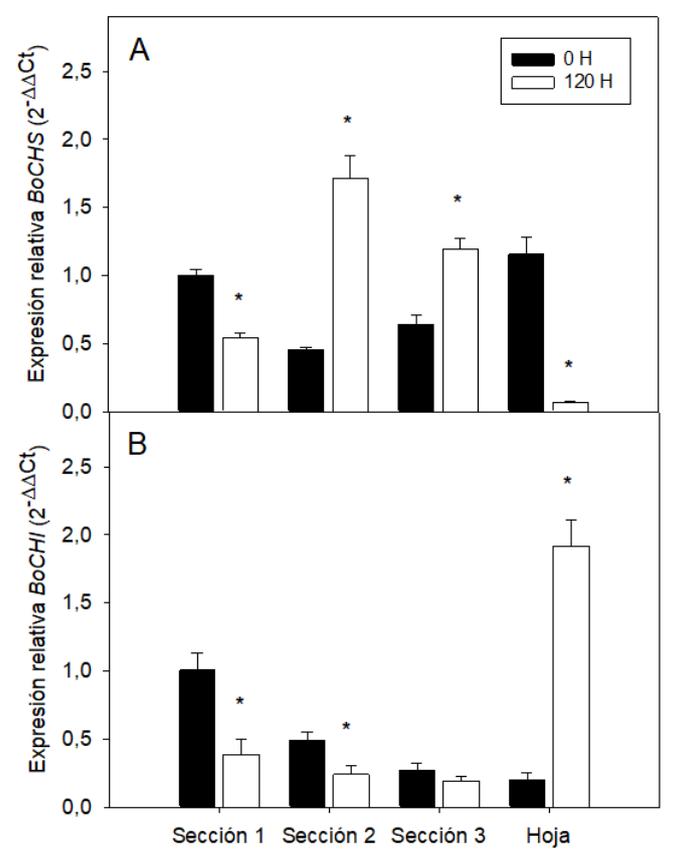


Figura 38: Expresión relativa de *BoCHS* (A) y *BoCHI* (B) en distintas secciones de brócoli almacenado durante 120 h a 20 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas dentro de una misma sección (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

5.3.4. Tratamientos hormonales

Se evaluó la respuesta de dos fitohormonas de efecto antagónico en la senescencia sobre el metabolismo de los flavonoides en brócoli, para ello se realizó el ensayo con etefón, como agente liberador de etileno, y 6-BAP, como citoquinina sintética. Las cabezas de brócoli recién cosechadas, se limpiaron y seleccionaron como se describe en Materiales y

Métodos, y se almacenaron por 120 h a 20 °C en oscuridad para la inducción de su senescencia. Se analizó la expresión de los genes *BoCHS* y *BoCHI*, y su contenido de fenoles totales y flavonoides.

En la Figura 39 se puede observar que tanto el contenido de fenoles como el contenido de flavonoides aumentaron en los controles durante el almacenamiento, mostrando diferencias significativas (análisis no mostrado). El tratamiento con etefón no modificó sustancialmente el aumento de fenoles, pero provocó un adelantamiento del aumento de flavonoides. Finalmente, el tratamiento con citoquininas causó un importante retraso en el aumento del contenido flavonoides.

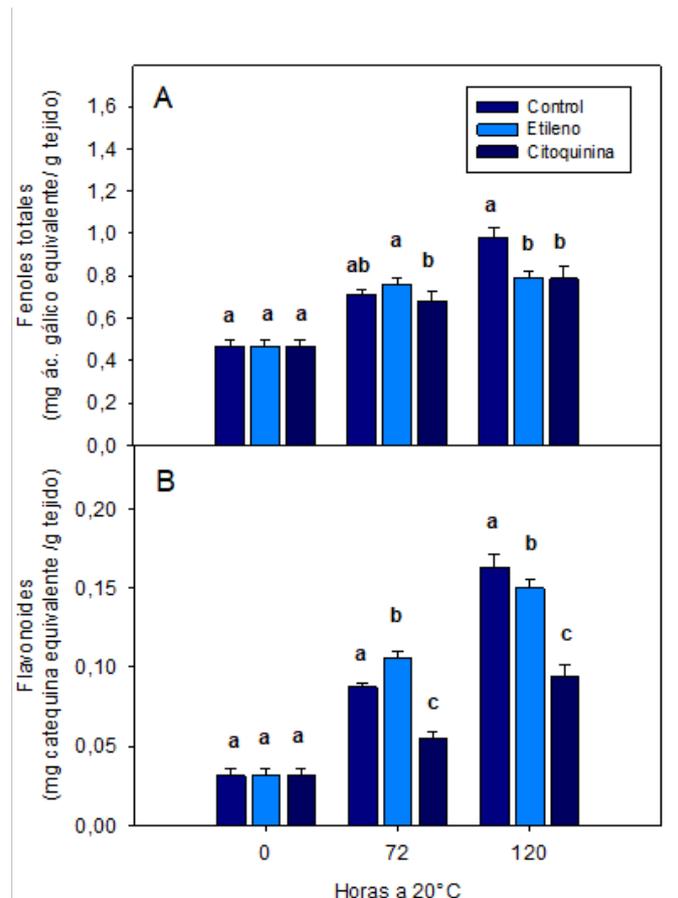


Figura 39: Contenido de fenoles totales (A) y flavonoides (B) en función de las horas de incubación a 20 °C y oscuridad para las cabezas tratadas con etefón, 6-BAP y controles. Las distintas letras indican diferencias significativas para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Se analizó además la expresión de los genes *BoCHS* y *BoCHI* de la vía de síntesis de compuestos flavonoides bajo los efectos de estas dos fitohormonas. Las medidas de expresión de este ensayo se muestran en la Figura 40. Se puede observar que el tratamiento con etileno disminuyó la expresión de *BoCHS* a las 72 h de almacenamiento respecto al control, no observando diferencias a las 120 h. Por otro lado, la expresión de *BoCHI* no varió respecto del control, tanto a las 72 h como 120 h. El tratamiento con citoquininas, por el contrario, causó una mayor expresión de *BoCHS* como *BoCHI* a las 120 h de almacenamiento, no observando diferencias a las 72 h respecto del control.

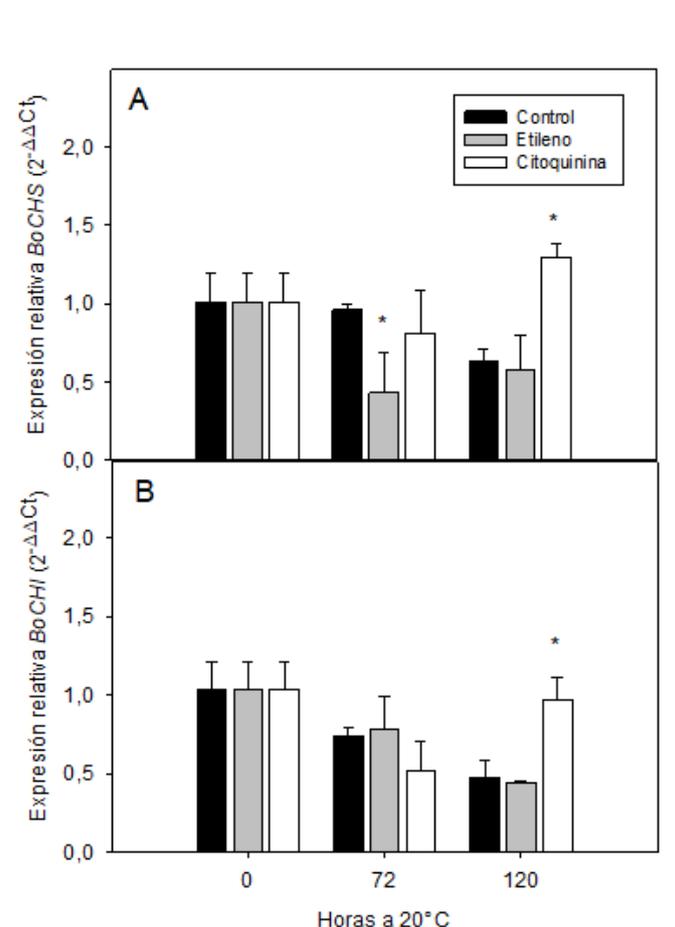


Figura 40: Expresión relativa de *BoCHS* (A) y *BoCHI* (B) bajo los tratamientos con etefón y 6-BAP, en función de las horas de almacenamiento a 20 °C en oscuridad. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

En diversos trabajos se ha reportado que tratamientos con etileno provocan una menor acumulación en el contenido de fenoles y flavonoides, así como otros compuestos antioxidantes, durante la maduración y senescencia (Hodges, 2000; Park *et al.*, 2006). Por otro lado, otros trabajos reportan una respuesta opuesta, de exacerbación del contenido de compuestos fenólicos (Awad y De Jager, 2002; Rodrigues *et al.*, 2010). Se podría concluir entonces que la variación que se presente respecto de la acumulación o no de estos metabolitos dependerá de la especie estudiada.

Se sabe que el etileno afecta la expresión de genes, y puede modificar la actividad de enzimas, es así que existe la posibilidad de que este tratamiento afecte la vía de biosíntesis de compuestos fenólicos a nivel de expresión génica. En el trabajo de Chaudhary *et al.* (2017) se analizó el contenido de compuestos fenólicos y la expresión de enzimas involucradas, bajo la influencia de etileno para el deverdizado de pomelo. Se reportó una menor expresión de los genes *CHS*, *CHI* y *PAL* durante el almacenamiento posterior al tratamiento, así como un menor contenido de compuestos fenólicos (Chaudhary *et al.*, 2017). Este resultado coincidiría con la menor expresión observada en *BoCHS* en el tratamiento con etileno (Figura panel A) así como la menor acumulación de estos

metabolitos. Por otro lado, en vista que *BoCHI* no mostró variaciones respecto del control, se puede postular que este gen podría no estar regulado por etileno en brócoli.

En el tratamiento con citoquininas se observa una menor acumulación de flavonoides durante el almacenamiento (Figura 39). Sin embargo, la expresión de los genes *BoCHS* y *BoCHI* no desciende hacia el quinto día del ensayo (Figura 40). Se ha reportado en *Arabidopsis* que tratamientos con citoquininas producen un aumento en el contenido de antocianinas y aumento de la expresión de genes de la vía como *PAL* y *CHS* (Deikman y Hammer, 1995). Esta respuesta coincide con lo observado en *BoCHS* y *BoCHI* bajo el tratamiento con citoquininas, pero no correlaciona con lo observado respecto al contenido de flavonoides. Estos resultados sugieren que podría estar siendo afectada otra enzima de la vía, como por ejemplo *PAL*. En este sentido, trabajos realizados previamente en nuestro grupo de trabajo mostraron que la expresión de un gen codificante de *PAL* disminuye marcadamente bajo tratamientos con citoquininas hacia el quinto día de almacenamiento (información no publicada), coincidiendo con el contenido de compuestos fenólicos reportado. Por otro lado, en otro cultivar de brócoli se reportó un incremento del contenido de compuestos fenólicos en tratamiento con citoquininas (Xu *et al.*, 2012). Se podría pensar que el cultivar representa otra variable para la respuesta en el metabolismo secundario bajo este tipo de tratamiento.

5.3.5. Tratamiento con 1-MCP

Se buscó estudiar la respuesta al tratamiento con 1-MCP en el metabolismo de los compuestos fenólicos. Para ello se midió el contenido de fenoles totales y flavonoides, y se estudió la expresión de los genes *BoCHS* y *BoCHI*.

Se puede observar en la Figura 41 panel A que el contenido de fenoles aumentó a lo largo de la incubación en los controles. Mientras que las cabezas tratadas con 1-MCP no mostraron diferencias significativas respecto de los controles. Por el contrario, el contenido de flavonoides sí se vio afectado por el tratamiento, mostrando un aumento gradual con los días de almacenamiento. Las muestras control presentan un aumento del contenido de flavonoides a las 72 h mientras que las muestras tratadas con 1-MCP presentan un retraso en este incremento (120 h).

Respecto a los perfiles de expresión, podemos observar en la Figura 42 panel B que la expresión de *BoCHI* disminuyó en los controles con los días de almacenamiento, y no mostró diferencias significativas respecto de las muestras tratadas con 1-MCP. Este resultado coincide con lo observado en el tratamiento con etileno, donde tampoco se observaron diferencias, por lo que podríamos afirmar que este gen no estaría siendo regulado por etileno. Por otro lado, en la Figura 42 panel A podemos observar que la expresión de *BoCHS* no mostró cambios significativos en los controles durante el almacenamiento. Asimismo, se detectó un aumento significativo de la expresión de *BoCHS* en las muestras tratadas respecto de los controles a las 72 h, sin observar diferencias a las 120 h. Este aumento podría relacionarse con el aumento observado en el contenido de flavonoides y denota que

se trata del fenómeno opuesto al observado en el tratamiento con etileno. Estos resultados me estarían confirmando que el gen *BoCHS* está muy probablemente regulado por etileno.

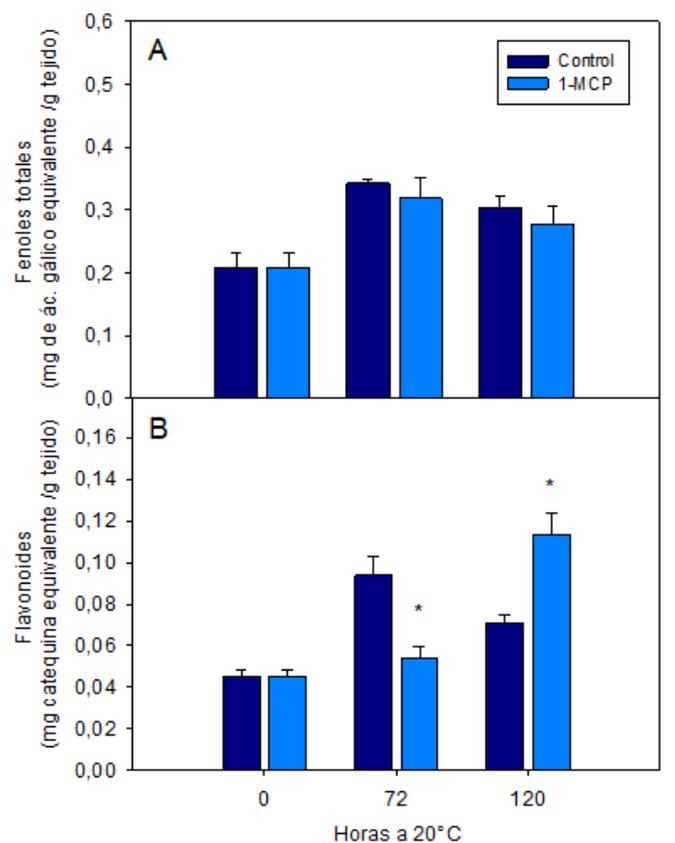


Figura 41: Contenido de fenoles totales (A) y flavonoides (B) en función de las horas de incubación a 20 °C y oscuridad para las cabezas tratadas con 1-MCP y controles. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Se ha reportado en manzana que tratamientos con 1-MCP provocan una leve retención del contenido de flavonoides y pocas variaciones en el contenido de compuestos fenólicos (MacLean *et al.*, 2006). Algo similar se reporta en el fruto del níspero (Cao *et al.*, 2011), mayor contenido de flavonoides y fenoles durante el almacenamiento posterior al tratamiento.

Similarmente, en kale (Sun *et al.*, 2012) también se informa un mayor contenido de actividad antioxidante por el tratamiento con 1-MCP. Por otro lado en otros frutos, como frutilla y durazno se reporta que tratamientos con 1-MCP disminuyen la acumulación de compuestos fenólicos y derivados de la vía, como antocianinas y se lo atribuyen a una menor actividad de la enzima PAL (Jiang *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2015). Se puede concluir que el 1-MCP presenta un efecto sobre el metabolismo de fenoles y flavonoides que probablemente sea dependiente de la especie tratada, de forma similar a lo observado con etileno.

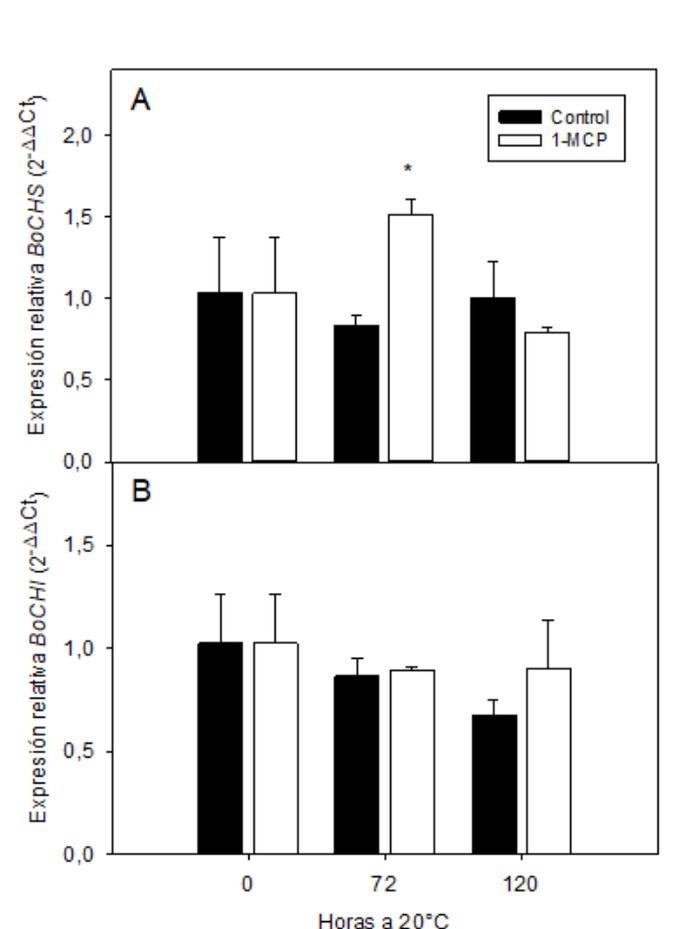


Figura 42: Expresión relativa de BoCHS (A) y BoCHI(B) bajo los tratamientos con etileno y 6-BAP como citoquinina, en función de las horas de almacenamiento a 20°C en oscuridad. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (Test de Tukey, $p < 0,05$).

5.3.6. Tratamiento con atmósfera modificada

Se realizó un tratamiento con atmósfera modificada como se describió en Materiales y Métodos y se realizaron determinaciones del contenido de fenoles totales y flavonoides y se analizó la expresión relativa de *BoCHS* y *BoCHI*.

El contenido de fenoles y de flavonoides aumentó en los controles durante el almacenamiento, en coincidencia con lo reportado en los otros tratamientos. Las muestras tratadas con atmósfera modificada presentaron un mayor aumento en el contenido de fenoles a las 72 h de almacenamiento, sin mostrar variaciones a las 120 h. A su vez, el contenido de flavonoides fue menor a las 120 h en las muestras tratadas respecto del control. Dado que los flavonoides son solo uno de los tipos de compuestos fenólicos que están presentes en brócoli, no debe haber siempre una correlación entre fenoles totales y flavonoides.

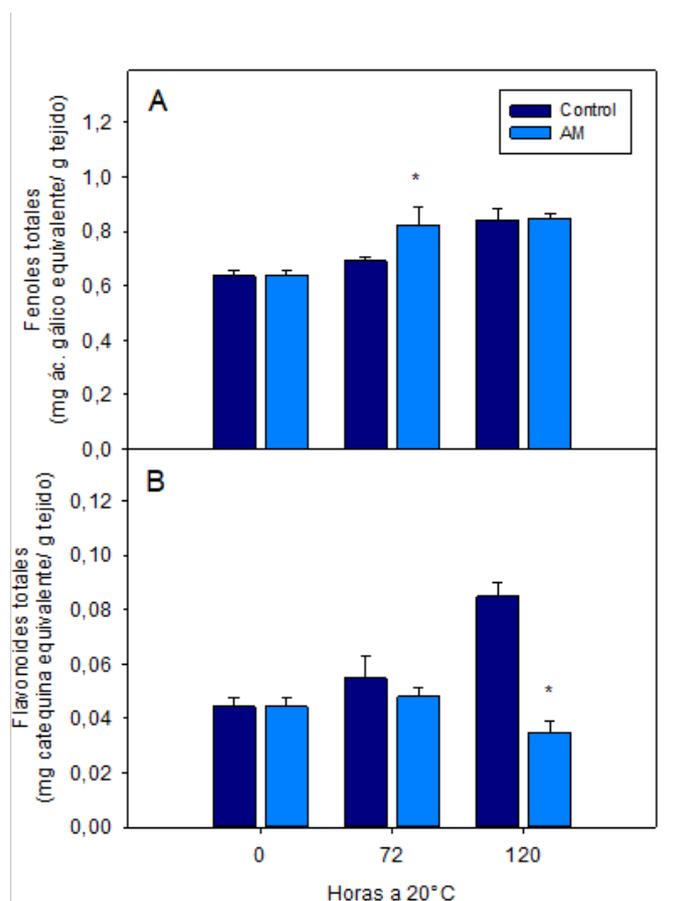


Figura 43: Contenido de fenoles totales (A) y flavonoides (B) en función de las horas de incubación a 20 °C y oscuridad para las cabezas en atmósfera modificada (AM) y controles. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Se analizó la expresión relativa de los genes *BoCHS* y *BoCHI* en las muestras brócoli tratadas con atmósferas modificadas y sus controles. Los resultados se pueden observar en la Figura 44. La expresión de *BoCHS* en los controles no mostró cambios significativos con el almacenamiento, pero se observa un aumento en la expresión de *BoCHS* en las muestras tratadas tanto a las 72 h como a las 120 h respecto del control. Respecto de la expresión de *BoCHI*, la misma mostró una disminución durante el almacenamiento en los controles, y esta disminución fue más marcada en las muestras tratadas hacia las 120 h.

Se ha descrito que en brócoli que tratamientos con atmósfera modificada permiten conservar e incluso incrementar el contenido de compuestos fenólicos durante el almacenamiento (Serrano *et al.*, 2006; Sabir, 2012). En hortalizas de hoja como la espinaca (Gil *et al.*, 1999; Mudau *et al.*, 2018) y en arándanos (Gunes *et al.*, 2002) se ha mostrado que el contenido de flavonoides permanece constante en muestras tratadas con atmósferas modificadas. Por otro lado, en un trabajo realizado en rúcula se informa un incremento en el contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante bajo distintos tipos de atmósfera modificada (Martínez-Sánchez *et al.*, 2006).

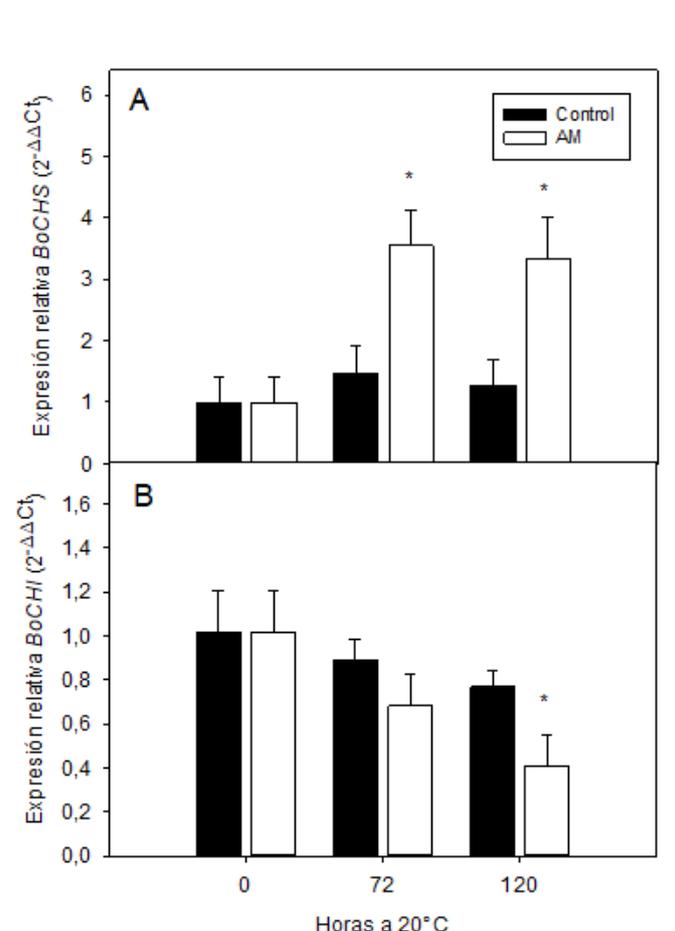


Figura 44: Expresión relativa de *BoCHS* (A) y *BoCHI* (B) bajo el tratamiento de atmósfera modificada (AM) en función de las horas de almacenamiento a 20 °C en oscuridad. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Por el contrario, en el fruto granada se reporta una disminución en el contenido de fenoles y antocianinas bajo tratamientos con atmósfera modificada (Selcuk y Erkan, 2014). Estas diferentes respuestas estarían indicando que tratamientos con bajas concentraciones de oxígeno y altas de dióxido de carbono podrían estar regulando de manera diferencial (dependiente de la especie, variedad y otras variables) la expresión y/o actividad de enzimas de la vía de biosíntesis de compuestos fenólicos. De hecho, se observa en el aumento de la expresión de *BoCHS* y en la disminución de *BoCHI* reportado en este trabajo en brócoli. Análisis realizados por el grupo de trabajo indican que la expresión de PAL disminuye de forma marcada en consecuencia al tratamiento (Gómez-lobato *et al.*, 2014). El hecho de que estas enzimas tengan respuestas opuestas al tratamiento demostraría que presentan diferente regulación y que podrían cumplir diferentes roles en la vía.

5.3.7. Tratamiento Térmico

Se buscó evaluar el metabolismo de los compuestos fenólicos en brócoli sometido a un tratamiento poscosecha con aire caliente, de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos.

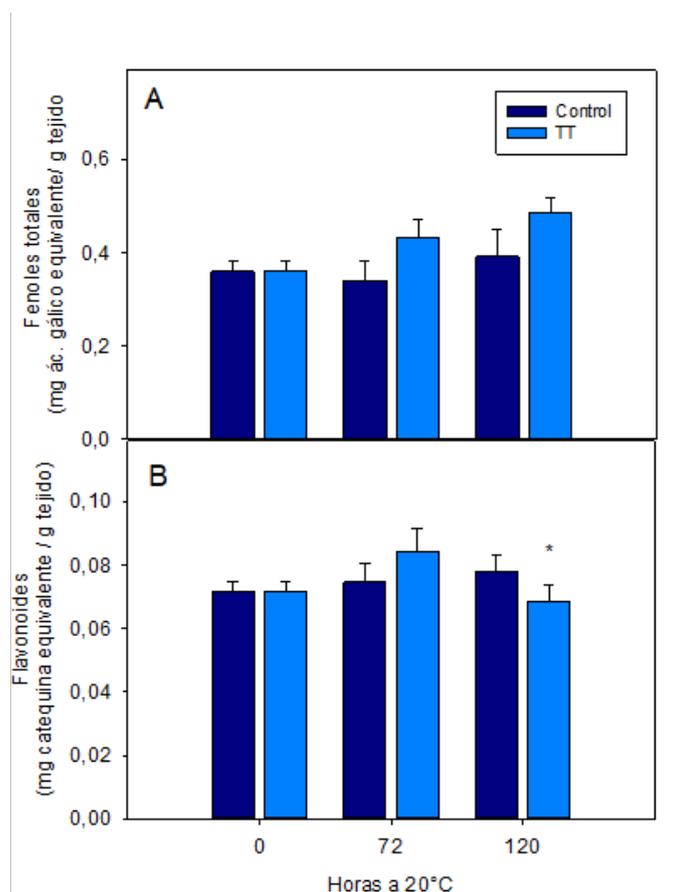


Figura 45: Contenido de fenoles totales (A) y flavonoides (B) en función de las horas de incubación a 20 °C y oscuridad para las cabezas bajo tratamiento térmico (TT) y controles. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Se puede observar en la Figura 45 que tanto el contenido de fenoles como flavonoides medido en las muestras control no presentaron variaciones a lo largo del almacenamiento. En el panel A, el contenido de fenoles totales fue conservado en las muestras tratadas con aire caliente, y no presentó variaciones. Por otro lado, en el panel B se observa que el contenido de flavonoides presenta una ligera disminución a las 120 h de almacenamiento.

Se estudió la respuesta a nivel transcripcional de *BoCHS* y *BoCHI*, durante el almacenamiento posterior al tratamiento térmico. Los resultados se muestran en la Figura 46. La expresión de ambos genes disminuye con el almacenamiento en los controles hacia las 120 h respecto de las 0 h. Este descenso es menor en las muestras tratadas por lo que hacia las 120 h la expresión en las muestras tratadas es mayor que en los controles.

Un trabajo previo llevado a cabo en brócoli (Duarte-Sierra *et al.*, 2017) describe que tratamientos térmicos a 41 °C durante 180 min y 47 °C durante 12 min permiten conservar el contenido de fenoles y flavonoides, de manera similar a lo detectado en nuestro caso. En ese mismo trabajo, también se reporta un aumento en la expresión de los genes codificantes de PAL, CHS y Flavanone 3 hidroxilasa (F3H), enzimas de la vía de biosíntesis de flavonoides (Duarte-Sierra *et al.*, 2017).

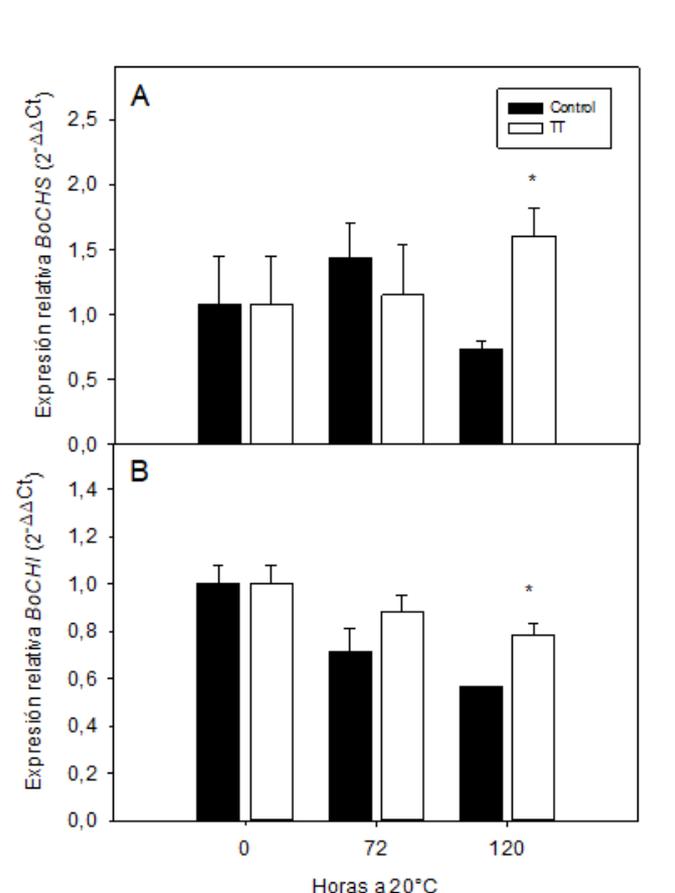


Figura 46: Expresión relativa de *BoCHS* (A) y *BoCHI* (B) bajo tratamiento térmico (TT) en función de las horas de almacenamiento a 20 °C en oscuridad. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

En otro trabajo, un tratamiento térmico realizado sobre el tallo de brócoli mostró un incremento en el contenido de fenoles en el momento inmediatamente posterior al tratamiento, detectándose luego una disminución durante el almacenamiento (Perini *et al.*, 2017). Se encontró también que tratamientos térmicos por inmersión causan el aumento de la expresión y la actividad enzimática de PAL en durazno y banana (Chen *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012), pero muestras de frutilla bajo tratamiento térmico presentaron un menor contenido de fenoles (Pan *et al.*, 2004). Nuevamente nos encontramos con que similares tratamientos presentan distintas respuestas según la especie tratada. En coincidencia con lo reportado por Duarte-Sierra *et al.* (2017), la expresión de *BoCHS* se incrementó hacia el último día de almacenamiento junto con *BoCHI*, pero a diferencia de lo reportado en ese trabajo la expresión de PAL fue menor en las muestras tratadas con tratamiento térmico en ensayos realizados por nuestro grupo de trabajo (Gómez-lobato *et al.*, 2014). Es posible que esta disminución en una enzima clave, justifique lo observado en el contenido de flavonoides. Por otro lado, el aumento de *BoCHS* y *BoCHI* podrían indicar la participación de estas enzimas en vías paralelas, hacia la síntesis de algún otro metabolito secundario.

5.3.8. Tratamiento con Luz Blanca

Se estudió el efecto de un tratamiento de irradiación con luz blanca en cabezas de brócoli, y se analizó su impacto en el metabolismo de los flavonoides.

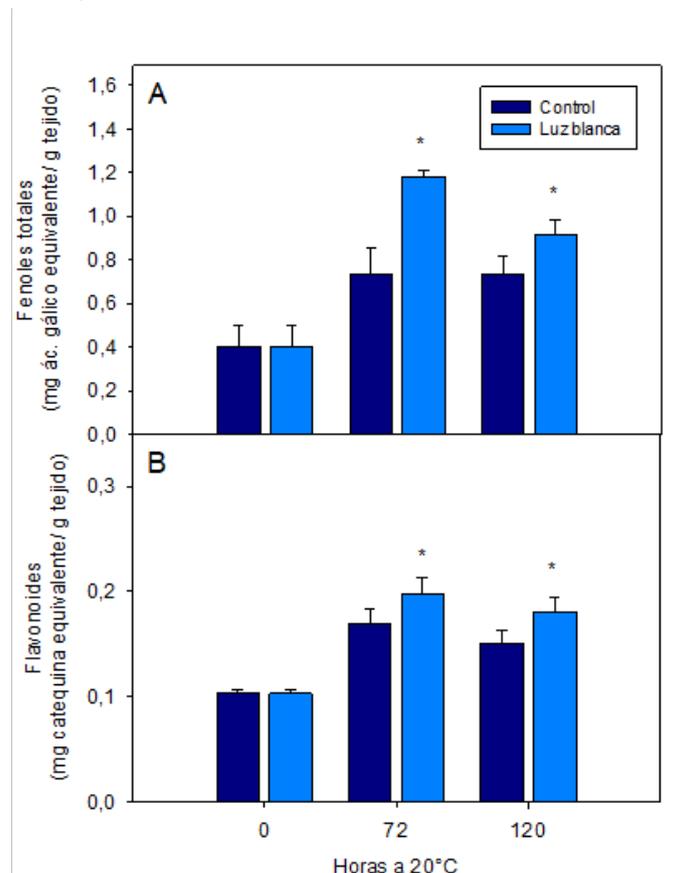


Figura 47: Contenido de fenoles totales (A) y flavonoides (B) en función de las horas de incubación a 20 °C y oscuridad para las cabezas bajo tratamiento de luz blanca. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Se detectó un aumento en el contenido de fenoles de un 60 % a las 72 h, y un 25 % a las 120 h en las muestras tratadas respecto del control (panel A). Por otro lado, el contenido de flavonoides presentó a su vez un leve aumento tanto a las 72 h como 120 h en las muestras tratadas respecto de los controles (panel B).

En la Figura 48 puede observarse la expresión relativa de los genes de interés. Se puede notar que ambos genes presentaron un perfil de disminución con el almacenamiento en los controles. La expresión de *BoCHS* presentó una disminución significativa a las 72 h en las muestras tratadas, mientras que a las 120 h no se vieron diferencias. Por otro lado, la expresión de *BoCHI* presentó un aumento a las 120 h de almacenamiento, mientras que no hubo diferencias a las 72 h.

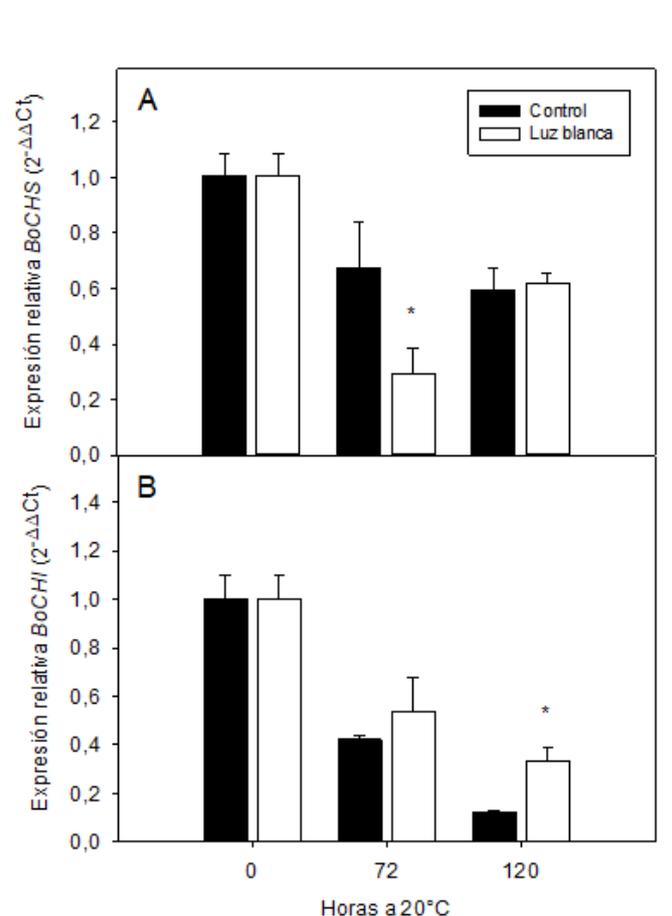


Figura 48: Expresión relativa de *BoCHS* (A) y *BoCHI* (B) bajo el tratamiento con luz blanca en función de las horas de almacenamiento a 20 °C en oscuridad. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Numerosos trabajos han reportado que la vía de biosíntesis de los compuestos flavonoides es activada tanto a nivel transcripcional como en la actividad de las enzimas involucradas en tratamientos con luz blanca (Azuma *et al.*, 2012; Zoratti *et al.*, 2014), resultando en una mayor acumulación de compuestos fenólicos en las frutas y hortalizas tratadas. En brócoli, hay registros de aumentos leves a moderados en el contenido de estos metabolitos secundarios como consecuencia de distintos tratamientos con luz visible (Büchert *et al.*, 2010; Favre *et al.*, 2018; Loi *et al.*, 2019). Asimismo, se reporta en kale la conservación del contenido de fenoles y un aumento en el contenido de antocianinas en un tratamiento con luz blanca (Bárcena *et al.*, 2019). En trigo también se observó que pulsos con luz blanca provocan un incremento en la expresión de enzimas de la vía como PAL, CHS y CHI y aumento del contenido de fenoles (Cuong *et al.*, 2019).

El aumento registrado en el contenido de compuestos fenólicos correlaciona con un aumento en la expresión de *BoPAL* determinada en brócoli por el grupo de trabajo (Gómez-lobato *et al.*, 2014) durante el almacenamiento posterior al tratamiento. Por otro lado, la expresión de *BoCHS*, a diferencia de lo que se reporta en otros trabajos (Schulze-Lefert *et al.*, 1989; Dao *et al.*, 2011) y de lo observado en *BoPAL*, no presentó un aumento en su expresión bajo el tratamiento con luz blanca. Ya se ha visto en otras oportunidades que la

respuesta distinta en la expresión génica, puede deberse a que la enzima en cuestión participe en vías paralelas, es decir, que no tenga un sustrato específico (Waki *et al.*, 2020).

5.3.9. Tratamiento con radiación UV-C

Se ha visto que tratamientos con UV-C retardan la senescencia en brócoli (Costa *et al.*, 2006). En esta sección se estudiará la repercusión de ese tratamiento tipo de tratamientos en el metabolismo de los flavonoides, determinando el contenido de fenoles y flavonoides, y midiendo la expresión de *BoCHS* y *BoCHI*.

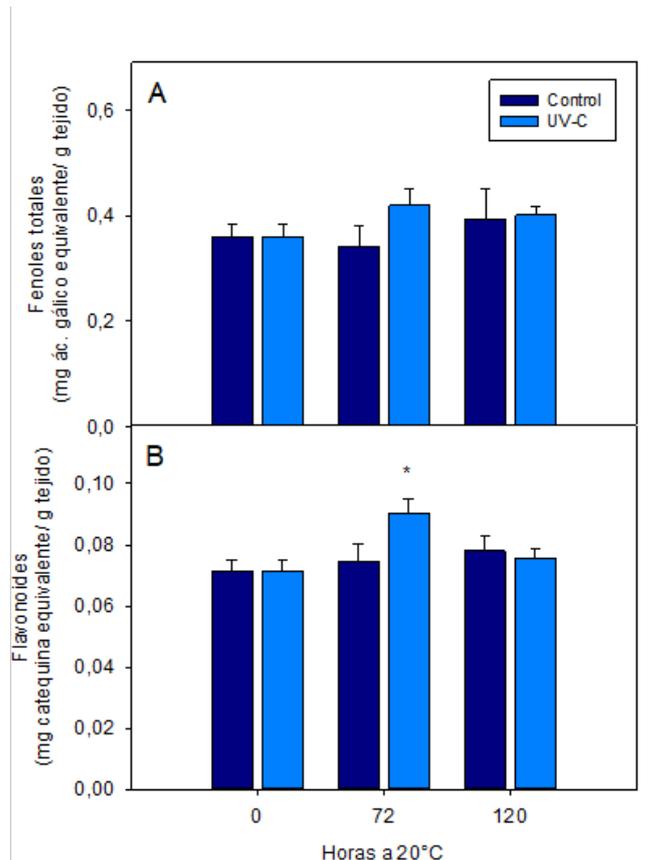


Figura 49: Contenido de fenoles totales (A) y flavonoides (B) en función de las horas de incubación a 20 °C y oscuridad para las cabezas bajo tratamiento con luz UV-C. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

El contenido de fenoles y de flavonoides no presentó grandes variaciones en los controles a lo largo de los días de ensayo (Figura 49). En las muestras tratadas con UV-C, el contenido de fenoles no presentó diferencias respecto de los controles. Sin embargo, el contenido de flavonoides presentó un leve aumento a las 72 h respecto de los controles.

El perfil de expresión de *BoCHS* no mostró variaciones durante el almacenamiento en las muestras control (Figura 50) y se detectó un 50 % de aumento en la expresión de *BoCHS* en las muestras tratadas respecto de los controles a las 72 h, sin notar diferencias a las 120 h. Por otro lado, la expresión de *BoCHI* disminuyó a lo largo del almacenamiento en los

controles, y no presentó variaciones significativas en las muestras tratadas respecto de los controles.

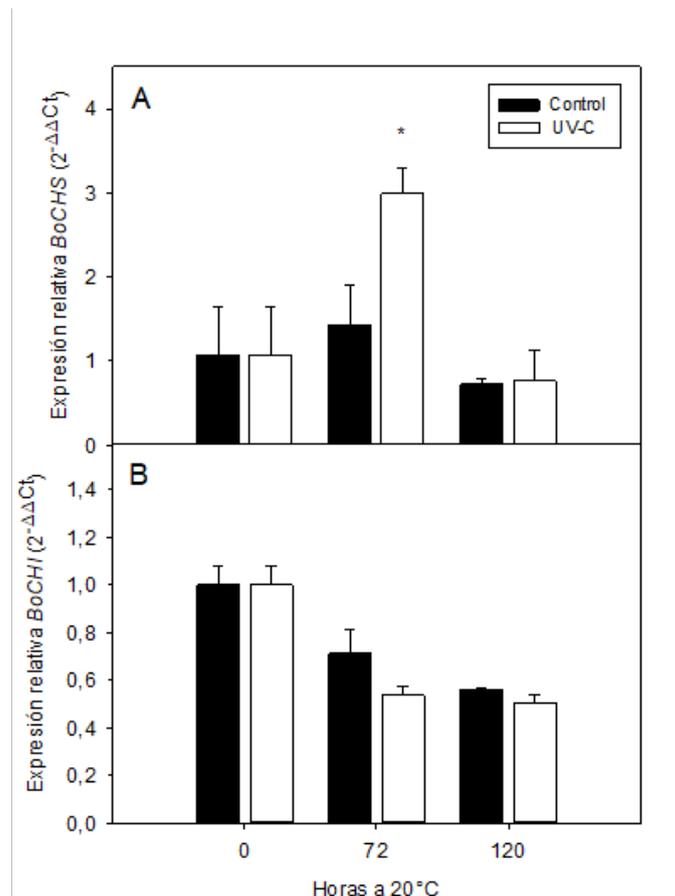


Figura 50: Expresión relativa de *BoCHS* (A) y *BoCHI* (B) bajo el tratamiento con luz UV-C en función de las horas de almacenamiento a 20°C en oscuridad. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control para un mismo tiempo (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

De forma similar a lo reportado en el tratamiento con luz blanca, existe mucha bibliografía que indica que pulsos de radiación UV-C inducen la acumulación de compuestos fenólicos, al igual que activa la expresión de genes de la vía de biosíntesis de compuestos flavonoides.

Se ha descrito que tomates tratados con radiación UV-C presentaron un mayor contenido de compuestos fenólicos (Jagadeesh *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2015). Asimismo, un trabajo realizado en mango informa un incremento en el contenido de fenoles y flavonoides, así como un aumento de la actividad PAL (González-Aguilar *et al.*, 2007). De forma similar tratamientos realizados en frutilla y durazno reportaron un aumento tanto en la actividad como en la expresión de PAL (El Ghaouth, Wilson and Callahan, 2003; Pombo *et al.*, 2011). Coincidiendo con lo reportado, la expresión de PAL en brócoli medida por nuestro grupo de trabajo, presentó un aumento hacia el último día de almacenamiento respecto del control (Gómez- Lobato *et al.*, 2014b). En este trabajo informamos que la expresión de *BoCHS* se incrementó como consecuencia del tratamiento, por lo que podríamos afirmar que el tratamiento provocó una activación de la vía, incrementando levemente el contenido de flavonoides.

Por otro lado, en brócoli, en el trabajo de Costa *et al.*, (2006) se describe una disminución en el contenido de fenoles y flavonoides en las muestras tratadas con luz UV-C. Mientras que en el trabajo de Martínez-Hernández *et al.*, (2013) se describe que el contenido de fenoles en brócoli es conservado en las muestras tratadas, sin presentar variaciones significativas respecto del control. Si bien numerosos estudios han comprobado la inducción de la biosíntesis de estos metabolitos con UV-C, puede ocurrir que el tiempo de exposición no haya resultado suficiente para ello o haya otras variables que influyen en la respuesta, como el estado de madurez o desarrollo del tejido.

5.3.10. Ensayo de Tres Cosechas

En este ensayo se buscó evaluar las variaciones en el contenido de fenoles y flavonoides, así como en la expresión de *BoCHS* y *BoCHI* en los distintos tiempos de cosecha realizados durante el día, y durante el almacenamiento postcosecha.

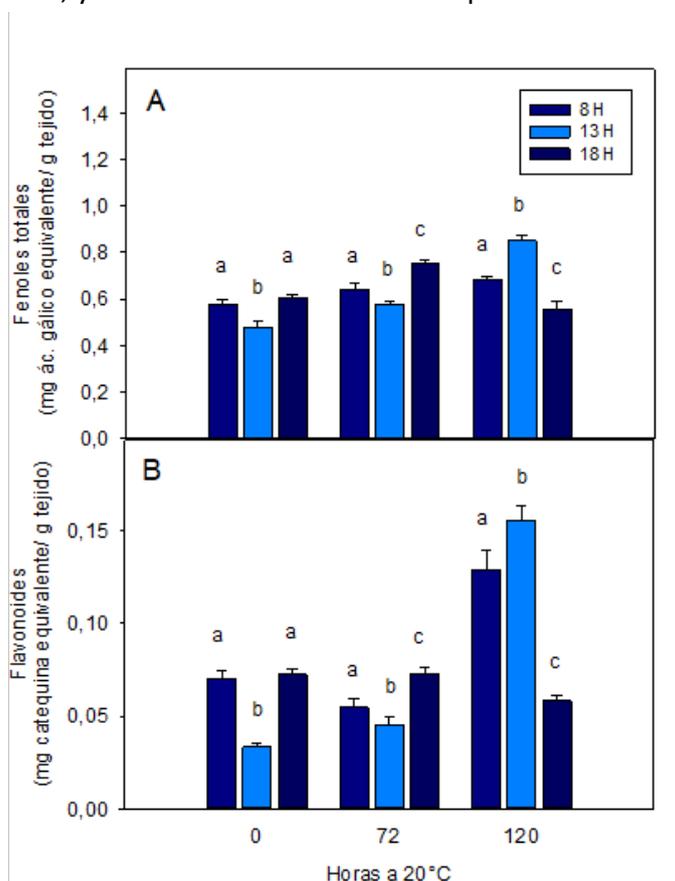


Figura 51: Contenido de fenoles totales (A) y flavonoides (B) en inflorescencias de brócoli bajo el ensayo de Tres Cosechas, y almacenado durante 120 h a 20 °C. Las letras distintas indican diferencias significativas para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

El contenido de fenoles y flavonoides presentó variaciones a lo largo del día de acuerdo al momento de cosecha. Notamos que el horario de las 13 h presentó el menor contenido de fenoles y flavonoides respecto de los otros dos horarios de cosecha. Por otro lado, tanto la cosecha realizada a las 8 h como a las 13 h mostraron un aumento en el

contenido de fenoles y flavonoides durante el almacenamiento. Por el contrario, la cosecha de las 18 h no mostró grandes variaciones a lo largo de los días, presentando un menor contenido de fenoles y flavonoides a las 120 h respecto de los otros dos horarios de cosecha (Figura 51).

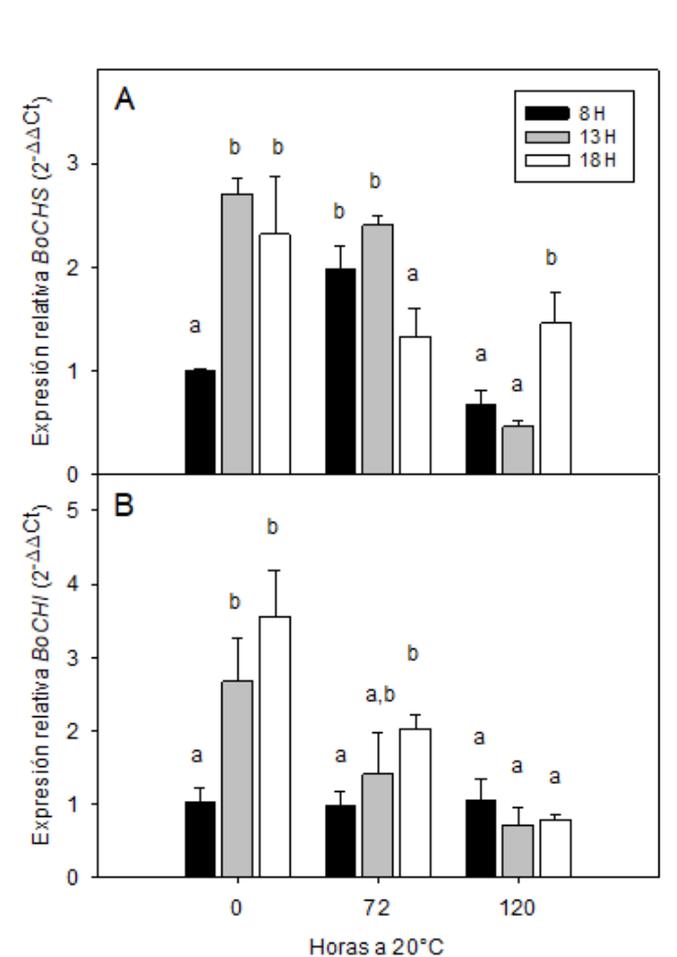


Figura 52: Expresión relativa de BoCHS (A) y BoCHI (B) en inflorescencias de brócoli bajo el ensayo de Tres Cosechas, y almacenado durante 120 h a 20°C. Las letras distintas indican diferencias significativas para un mismo tiempo de almacenamiento (ANOVA: Test de Tukey, $p < 0,05$).

Respecto al análisis de la expresión de genes (Figura 52), se detectó un aumento de la expresión tanto de *BoCHS* como *BoCHI* al avanzar las horas del día, siendo mayor a las 13 h y 18 h respecto de las 8 h (tiempo 0). Por otro lado, la expresión de *BoCHS* mostró un perfil de disminución con los días de almacenamiento en las muestras cosechadas a las 13 h y 18 h. Mientras que las muestras cosechadas a las 8 h presentaron un pico de expresión a las 72 h y luego un descenso hacia las 120 h. La expresión de *BoCHI*, de modo similar, presentó un patrón de disminución con los días de almacenamiento en las muestras cosechadas a las 13 h y 18 h, mientras que no mostró variaciones en las muestras cosechadas a las 8 h.

Contenido de fenoles y flavonoides en muestras cosechadas a diferentes horas del día. Con respecto a las diferencias observadas al momento de cosecha, no se encuentran muchos estudios que informen acerca del contenido de estos compuestos durante el día. Uno de ellos es el trabajo de Soengas *et al.* (2018) donde se reporta que tanto el contenido

de fenoles como actividad antioxidante disminuyen hacia el final del día, en brócoli y repollo, sugiriendo que podría existir un probable ciclo de acumulación y degradación en estos metabolitos.

Cambios en el contenido de fenoles y flavonoides durante la senescencia poscosecha. En la Parte A de este trabajo se discutió acerca del menor desarrollo de la senescencia en las cabezas de brócoli cosechadas a las 18 h. Se observa que en general tanto el contenido de fenoles como flavonoides aumenta con los días de almacenamiento, es decir, con la inducción de la senescencia. Entonces es esperable que las muestras cosechadas en la última hora de día presenten la menor acumulación en el contenido de compuestos fenólicos.

Expresión de genes en muestras cosechadas a diferentes horas del día. La expresión de *BoCHS* y *BoCHI* crece en las muestras cosechadas al mediodía o a la tarde, sugiriendo un posible rol de la luz solar, que podría estar afectando su expresión. En los trabajos de Deikman y Hammer (1995) y Thain *et al.* (2002) se discuten dichas variaciones en la expresión de *CHS* a lo largo del día en *Arabidopsis thaliana* y se demuestran que se trata de un gen que presenta un ciclo circadiano. De igual modo, este patrón también lo presentarían otras enzimas de la vía de biosíntesis de flavonoides como PAL, CHI y DFR (Deikman y Hammer, 1995).

Expresión de genes durante la senescencia poscosecha. Los perfiles de expresión de *BoCHS* y *BoCHI* durante la senescencia fueron distintos según la hora en que fueron cosechadas las muestras. Comparando este ensayo (cosecha en diferentes momentos del día) con los tratamientos realizados previamente (3.4. y 3.5) donde las cosechas se realizan entre las 7:00 y 8:00 de la mañana, se pueden detectar diferencias en los cambios de expresión durante el almacenamiento. En general, en las muestras cosechadas a la mañana se observa un mantenimiento de la expresión o un descenso leve. Sin embargo, en el ensayo de tres cosechas se detectó un aumento de la expresión de *BoCHS* a las 72 hs en las muestras cosechadas a la mañana, con un posterior descenso. La variabilidad observada en la expresión de *BoCHS* y *BoCHI* sugeriría que las mismas podrían ser muy dependientes de diversos factores ambientales y fisiológicos, y que su expresión durante la postcosecha podría depender fuertemente del estado fisiológico de la cabeza en el momento de la cosecha. Por otro lado, en el trabajo de Guo *et al.* (2011) se muestra que *CHS* y *CHI* presentan un pico de expresión a las 24 h luego de la cosecha. Podría plantearse la posibilidad de que este pico de expresión no sea observado debido a las tomas de muestra planteadas por este trabajo, o que este pico se vea retrasado en cabezas en otro estadio de desarrollo y pueda visualizarse en otro momento del almacenamiento postcosecha.

5.4. Conclusiones parciales

En esta segunda parte de la tesis se planteó como objetivo realizar un análisis de la expresión relativa de los genes *BoCHS* y *BoCHI* durante la senescencia postcosecha de brócoli, analizando además el efecto de distintos reguladores del crecimiento y de diferentes tratamientos postcosecha previamente estudiados por nuestro grupo. Se buscó conocer cuál era el impacto de los tratamientos a nivel nutricional evaluando el contenido de fenoles y flavonoides, compuestos con comprobado beneficio en la salud, y se analizó su correlación con las variaciones en la expresión de estos genes. De los resultados obtenidos se pueden elaborar una serie de conclusiones preliminares.

Con respecto a la expresión temporal de los genes *BoCHS* y *BoCHI*, en general muestran un patrón de disminución con los días de almacenamiento. Este resultado no correlaciona con el contenido de fenoles y flavonoides que aumentó durante la senescencia, pero sí coincide con un aumento en otra enzima clave de la vía, como es PAL. En algunos de los tratamientos, *BoCHS* no mostró el mismo patrón de expresión con la senescencia, esto podría deberse a un número de variables que no pudieron mantenerse constantes durante los ensayos, como el estadio de madurez de las cabezas, el riego, la temperatura e incidencia solar al momento de la cosecha, entre otras. En este contexto es esperable que en todos los ensayos los controles no presentaran el mismo patrón de expresión, motivo por el cual siempre se evaluó cada tratamiento como un ensayo independiente.

Analizando el contenido de fenoles y flavonoides en las distintas secciones de brócoli, se observó que fue mayor en hoja, luego en las flores (sección 1) y mucho menor en los tallos (secciones 2 y 3). En todas se registró un aumento del contenido con la senescencia. Muchos trabajos han estudiado el aprovechamiento de esta característica de las hojas de brócoli, que además también contienen alto contenido de glucosinolatos. Es así que se ha buscado su uso como complemento en la alimentación animal, en la formulación de extractos con valor nutracéutico, y con ello disminuir los residuos agrícolas (Bernal *et al.*, 2014; Aires *et al.*, 2017) ya que las hojas comprenden el 70 % del peso de la planta. Con respecto a la expresión de *BoCHS* y *BoCHI* reportada en este trabajo, se puede mencionar que, a diferencia de lo que ocurría con las enzimas de la vía de degradación de clorofilas, estas enzimas se expresan de forma similar en todas las secciones de la planta de brócoli, siendo *BoCHI* más importante en hoja hacia el final de la senescencia y *BoCHS* en sección 2 y 3 hacia las 120 h.

En los tratamientos hormonales con etefón y 6-BAP se observó que aquel tratamiento que generó un retraso en la senescencia de brócoli presentó un menor contenido de compuestos fenólicos, como es el caso de las citoquininas. Este comportamiento coincide con una menor expresión de la enzima PAL y se contrapone con el aumento en la expresión de *BoCHS* y *BoCHI* a las 120 h. Ambos genes presentarían una regulación positiva por citoquininas. Por otro lado, la exposición a un agente liberador de etileno que provoca la aceleración de la senescencia en brócoli presentó pequeñas variaciones en su contenido de fenoles y flavonoides, y una menor expresión de *BoCHS* a las 72 h, mientras que la enzima PAL mostró un aumento con la exposición a etileno. Se puede

concluir que las distintas enzimas de la vía presentan diferente regulación frente a los mismos estímulos hormonales. Respondiendo tanto *BoCHS* como *BoCHI* a citoquininas y solo *BoCHS* a etileno. En el tratamiento con 1-MCP (inhibidor de los receptores de etileno) no hubo variaciones en el contenido de fenoles, pero sí un leve aumento en los flavonoides hacia las 120 h. Observando la expresión de los genes, se corrobora el comportamiento registrado en el ensayo con etileno, *BoCHS* presentó un aumento en su expresión, lo que estaría confirmando una regulación negativa por parte del etileno en este gen. Por otro lado, *BoCHI* no modificó su expresión, confirmando que este gen no sería regulado por etileno.

Con respecto a los tratamientos físicos, tanto en el ensayo con atmósfera modificada como en el tratamiento térmico el contenido de fenoles totales no presentó grandes diferencias respecto de los controles. Mientras que en ambos tratamientos se observó una leve disminución en el contenido de flavonoides a las 120 h. Bajo ambos estímulos, atmósfera rica en CO₂ y baja en O₂, e incubación a alta temperatura, la expresión de *BoCHS* aumentó. Mientras que la expresión de *BoCHI* mostró una leve disminución en AM y un leve aumento en TT. Por otro lado, en ambos tratamientos se reporta que la enzima PAL disminuye su expresión en coincidencia con el menor contenido de flavonoides registrado. Se ha mencionado que la enzima CHS no presenta un único sustrato y que podría catalizar otras reacciones secundarias (Waki *et al.*, 2020). Estas reacciones podrían dar lugar a metabolitos que ayuden a sobrellevar el estrés que este tipo de tratamiento postcosecha genera en la cabeza de brócoli. En ese caso, podría participar también CHI, ya que se ha mencionado que ambas enzimas estarían interaccionando entre sí formando un complejo. De todas maneras, son necesarios estudios adicionales para confirmar esta última hipótesis.

Los tratamientos poscosecha con pulsos de luz, el ensayo con radiación UV-C y luz blanca, han verificado un incremento en la acumulación de compuestos fenólicos. Este aumento resultó más notorio en el tratamiento con luz blanca. La expresión de *BoCHS*, presentó un aumento en el tratamiento con luz UV-C y, por otro lado, una disminución en el tratamiento con luz blanca, ambos a las 72 h de almacenamiento. La expresión de *BoCHI* por el contrario, aumentó con luz blanca y no mostró variaciones con la exposición a luz UV-C. Cabe mencionar que la expresión de PAL aumentó bajo ambos tratamientos, siendo más marcado en el ensayo de luz visible, y justificando en parte el incremento en el contenido de compuestos fenólicos. Se han reportado trabajos que verifican que la vía de biosíntesis es activada bajo estímulos luminosos, aunque dependiente de la intensidad y calidad de la luz incidente. Esto último implica que no todas las enzimas responden de igual forma al mismo estímulo luminoso, como probablemente lo está sugiriendo la expresión de los dos genes estudiados.

Por último, en el ensayo de Tres Cosechas se observó que la cosecha de las 18 h no presentó el aumento característico en el contenido de compuestos fenólicos con la senescencia. Este resultado es coincidente con el hecho de que las cabezas de brócoli cosechadas en la última hora de día presentaron un menor avance de la senescencia, y por lo tanto menor acumulación de fenoles. Por otro lado, también se vieron oscilaciones en el contenido de fenoles y flavonoides a lo largo del día, siendo menor a las 13 h. Hay escasos trabajos que estudian las variaciones en el contenido de flavonoides o fenoles con las horas

del día. Sin embargo, se ha reportado que los genes codificantes de enzimas de la vía de biosíntesis presentan un ritmo circadiano, por tanto, podría existir algún tipo de ciclo entre la síntesis y degradación de estos metabolitos. Con respecto a la expresión de *BoCHS* y *BoCHI*, se detectó un aumento con el transcurso del día, siendo mayor a las 13 h y 18 h respecto de las 8 h en el día 0 de cosecha. Este resultado concuerda con lo recién mencionado acerca del ciclo circadiano reportado en estos genes, así como en PAL y en F3H (flavanona 3-hidroxilasa). Cabe mencionar que, en el quinto día de ensayo, la expresión de *BoCHS* permaneció más elevada en la cosecha de las 18 h respecto de las muestras cosechadas a las 13 h y 8 h, mientras que *BoCHI* no mostró variaciones.

6. Conclusiones Generales

Aproximadamente un tercio de las frutas y hortalizas producidas a nivel mundial se desperdicia. Estas pérdidas obedecen distintas causas, tales como daños mecánicos en la cosecha, mal manejo poscosecha, precarios almacenamientos, daños durante el transporte y finalmente pérdidas a nivel del consumidor final. En este panorama, los tratamientos poscosecha buscan minimizar estas pérdidas prolongando la vida de frutas y hortalizas, permitiendo que conserven su calidad organoléptica y valor nutricional por más tiempo. La mayoría de estos estudios se focalizan en las propiedades cualitativas del producto, pero son escasos los que realizan análisis de los cambios a nivel molecular que imparten estos ensayos.

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado durante varios años distintos tratamientos poscosecha que buscaron retrasar la senescencia de brócoli, un alimento con un alto consumo a nivel mundial y buenas propiedades nutritivas y nutracéuticas, pero altamente perecedero. Fue objeto de la presente Tesis realizar un análisis de la expresión de los genes *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR* de la vía de degradación de clorofilas, y la expresión de los genes *BoCHS* y *BoCHI* de la vía de síntesis de compuestos flavonoides durante estos tratamientos. La importancia de este estudio radica en tener una mejor comprensión de cómo factores externos como un cambio de temperatura, un pulso de luz o la hora del día de cosecha afectan la expresión de genes de vías metabólicas relevantes tanto para la calidad organoléptica como nutricional de brócoli.

Respecto de los genes de la vía de degradación de clorofilas (Parte A de la Tesis), se encontró que *BoNYC1* es un gen que presenta una elevada regulación, similar a la detectada previamente en *BoPaO*, *BoPPH* y *BoSGR*. Este gen respondió en casi todos los tratamientos modificando su expresión, por lo que se lo considera muy sensible frente a factores medioambientales. Estas variaciones permitirían lograr una adecuada adaptación al estrés ocasionado. Por otro lado, los perfiles de expresión tanto de *BoNOL* como de *BoHCAR* no se vieron perturbados en la mayoría de los tratamientos, demostrando que serían genes menos regulados de la vía. Este hecho también fue reportado en el trabajo de Kuai *et al.* (2018) donde se hace una revisión de los distintos factores que influyen la expresión de los genes de la vía de degradación de clorofilas.

Tratamientos químicos. Los tratamientos con etileno y 1-MCP permitieron establecer que *BoNYC1* es regulado positivamente por etileno, mientras que *BoHCAR* no es regulado por etileno. En el caso de *BoNOL* la dependencia con etileno no fue concluyente ya que presentó una disminución frente al ensayo con 1-MCP, pero no varió con la aplicación de etefón. Por otro lado, *BoNYC1* resultó ser regulado negativamente por citoquininas al igual que lo reportado para *BoPaO*, *BoSGR* y *BoPPH*. La expresión de *BoNOL*, por otro lado, disminuyó hacia el tercer día de ensayo y posteriormente, presentó un aumento importante hacia el quinto día, al igual que *BoHCAR*. Este comportamiento se asocia con una participación en el proceso de biosíntesis de clorofilas, estimulado por las citoquininas (Talla *et al.*, 2016).

Tratamientos físicos. El tratamiento térmico no modificó significativamente la expresión de ninguno de los genes estudiados, podemos decir que el retraso en la degradación de clorofilas causado por el tratamiento se debe a una disminución en la expresión de genes aguas abajo en la vía, como se reportó para *BoPaO*, *BoSGR* y *BoPPH* (Büchert *et al.*, 2011; Gomez-Lobato *et al.*, 2012; Gomez-Lobato *et al.*, 2014). En el tratamiento con atmósferas modificadas, *BoNOL* disminuyó su expresión, así como otras enzimas de la vía, correlacionando con la retención en el contenido de clorofilas; mientras que *BoNYC1* y *BoHCAR* aumentaron su expresión. Se postula que estas dos enzimas podrían participar en la regulación de la vía bajo esas condiciones de estrés. Con respecto a los tratamientos de luz, ni el perfil de expresión de *BoNOL* ni *BoHCAR* se vieron influenciados, sugiriendo que estos dos genes no serían regulados por estas radiaciones. Por otro lado, la expresión de *BoNYC1* sí respondió a estos ensayos, presentando un aumento con el tratamiento de luz blanca y una disminución en el ensayo con radiación UV-C. Un análisis *in silico* permitió conocer que este gen presenta muchos elementos de respuesta a luz sobre la región promotora, lo que explicaría las respuestas frente a estos estímulos. La disminución en la expresión de *BoNYC1* en el tratamiento con UV-C coincide con lo reportado por otras enzimas de la vía, justificando la conservación del contenido de clorofilas. Por otro lado, el tratamiento con luz blanca continua causa un retraso en la degradación de clorofilas, pero *BoNYC1* aumenta su expresión al igual que *BoSGR* (Gomez-Lobato *et al.*, 2014), mientras que la expresión de otro gen clave de la vía, *BoPaO*, no se ve alterada (Gomez-Lobato *et al.*, 2012) y solo *BoPPH* presenta una expresión disminuida con este tratamiento (Büchert *et al.*, 2011).

Tres Cosechas. Se verificó que la cosecha de las 18 h presentó el mayor retraso en la senescencia de brócoli. Con respecto a la expresión de los genes en el momento de la cosecha, no se observaron grandes variaciones con la hora. Luego de 72 h de almacenamiento se detectó una mayor expresión de *BoNYC1* en las cosechas de las 13 h y 18 h. Como se mencionó previamente, esto podría estar asociado a la mayor tasa de senescencia de las muestras cosechadas a las 8 h, en las cuales la expresión de *BoNYC1* ya estaría descendiendo a las 72 h mientras que la correspondiente a las otras muestras aún estaría en su máximo. Por último, se observó que la expresión a las 120 h fue menor en la cosecha de las 18 h tanto en *BoNYC1* y *BoHCAR*. Esto último también se observó en otros genes de la vía de degradación como *BoPaO*, *BoSGR* y *BoPPH*, indicando que la activación de la vía estaría retrasada en las cabezas cosechadas a las 18 h respecto de aquellas cosechadas a las 8 h y 13 h.

Con respecto a la expresión de los genes vinculados a la vía de biosíntesis de compuestos flavonoides (Parte B de la Tesis) se encontró una correlación entre el retraso en la senescencia y un aumento de la expresión de *BoCHS*. Dado que muchos tratamientos pueden conllevar un incremento de ROS debido al estrés ocasionado, y que uno de los mecanismos de las plantas para combatirlos sea con una producción de flavonoides, es un planteo probable. Sin embargo, el contenido de flavonoides en los tratamientos no siempre correlacionó con la expresión de estos genes. Se entiende que son varias las enzimas

involucradas en esta vía que pueden estar siendo influenciadas bajo la acción de los tratamientos. Por otro lado, *BoCHI* demostró ser una enzima menos regulada de la vía.

Tratamientos químicos. En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el etileno regula negativamente la expresión de *BoCHS*, dado que en el ensayo con etefón disminuyó su expresión mientras que el tratamiento con 1-MCP causó un aumento. Por otro lado, la expresión de *BoCHI* no se vio influenciada por el etileno. El tratamiento con 6-BAP provocó el incremento en la expresión de ambos genes, indicando que serían reguladas positivamente por esta fitohormona. Con respecto al contenido de fenoles y flavonoides, podemos decir que no hubo grandes variaciones respecto del control en el tratamiento con etefón. Se observó una disminución en el contenido de fenoles y flavonoides en el ensayo con citoquininas correlacionando con lo reportado en la expresión de *BoPAL* (Gómez-Lobato *et al.*, 2014b), enzima aguas arriba en la vía. Por último, en el ensayo de 1-MCP se observó una disminución hacia las 72 h y luego un aumento hacia las 120 h en el contenido de flavonoides.

Tratamientos físicos. Durante el tratamiento térmico se observó un leve aumento en la expresión de ambos genes, mientras que no hubo grandes variaciones en el contenido de fenoles y flavonoides. Por otro lado, en el ensayo con atmósferas modificadas se vio un aumento en la expresión de *BoCHS*, y una disminución de *BoCHI* hacia las 120 h. Se informó que el contenido de fenoles aumentó durante el ensayo mientras que disminuyó el contenido de flavonoides. Los ensayos de radiación, luz blanca y UV-C, ocasionaron la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides, al igual que se reporta en muchos trabajos y en concordancia con el aumento en la expresión y actividad de PAL (Ghaouth *et al.*, 2003; González-Aguilar *et al.*, 2007). En el ensayo con luz UV-C se vio también un aumento en la expresión de *BoCHS*, sin mostrar cambios en la expresión de *BoCHI*. Mientras que, en el ensayo con luz blanca, *BoCHS* disminuyó su expresión y *BoCHI* la aumentó. Podemos notar que la expresión de ambas enzimas se vio influenciada por los distintos tipos de estrés que implicó cada tratamiento. También hubo cambios en el contenido de fenoles y flavonoides, los cuales en la mayoría de los casos no correlacionó con estas variaciones de la expresión de los genes estudiados. Luego del estudio y análisis de estos resultados podemos concluir que se trata de una vía metabólica de rápida respuesta frente a los distintos estímulos, que se entienden al conocer el rol de los flavonoides, productos de esta vía de síntesis.

Tres Cosechas. Se pudo comprobar que ambas enzimas aumentan su expresión a lo largo del día. La posibilidad de que tanto *BoCHS* como *BoCHI* presenten un ciclo circadiano se describe en los trabajos de Deikman (1995) y Thain *et al.* (2002). Se pudo notar también que el contenido de fenoles y flavonoides varió durante el día, y no se descarta la posibilidad de que exista algún tipo de ciclo entre la síntesis y degradación de estos metabolitos durante el día. Con respecto a los perfiles de expresión con la senescencia, se puede decir que se obtuvo un perfil distinto en ambos genes según la hora en que fue cosechado el brócoli. En cuanto al contenido de fenoles y flavonoides, se observó que el mismo fue menor a las 120 h en las muestras cosechadas a las 18 h. Puesto que el contenido de estos metabolitos suele

aumentar con la senescencia y que esta hora de cosecha mostró un menor avance de la senescencia, estos resultados son concordantes.

Se puede concluir que los tratamientos analizados, no solo modifican la expresión de *BoNYC1*, *BoNOL* y *BoHCAR*, genes de la vía de degradación de clorofilas, sino que también repercuten sobre la expresión de *BoCHS* y *BoCHI*, genes de la vía de síntesis de compuestos flavonoides. Así como influyen en la retención de clorofilas y en la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides, permitiendo que conserven no solo propiedades organolépticas como el color, sino también calidad nutricional. En muchos trabajos se ha buscado distintas estrategias para promover la acumulación de estos compuestos nutraceuticos en vegetales (Villarreal-García *et al.*, 2016). En este sentido, se rescata el efecto de los tratamientos con luz, donde se verifico el retraso en la senescencia de brócoli y además se observó un incremento marcado en estos compuestos bioactivos.

7. Bibliografía

- Agati, G. *et al.* (2013) 'Plant Physiology and Biochemistry Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past', *Plant Physiology et Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 72, pp. 35–45. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.03.014.
- Agudo, A., Cabrera, L. and Amiano, P. (2008) 'Erratum: Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: Findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain) (American Journal of Clinical Nutrition)', *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(4), p. 1181. doi: 10.1093/ajcn/88.4.1181.
- Ahmad, W. *et al.* (2017) 'Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: Mechanisms behind ROS/RNS generation', *Journal of Biomedical Science*. Journal of Biomedical Science, 24(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12929-017-0379-z.
- Aires, A., Carvalho, R. and Saavedra, M. J. (2017) 'Reuse potential of vegetable wastes (broccoli, green bean and tomato) for the recovery of antioxidant phenolic acids and flavonoids', *International Journal of Food Science and Technology*, 52(1), pp. 98–107. doi: 10.1111/ijfs.13256.
- Amorim, T. *et al.* (2017) 'Gibberellin and polyamines in plant growth, development, and postharvest senescence of ornamental plants – a review', *Amazonian Journal of Plant Research*, 1(1), pp. 1–13. doi: 10.26545/b00000x.
- Awad, M. A. and De Jager, A. (2002) 'Formation of flavonoids, especially anthocyanin and chlorogenic acid in "Jonagold" apple skin: Influences of growth regulators and fruit maturity', *Scientia Horticulturae*, 93(3–4), pp. 257–266. doi: 10.1016/S0304-4238(01)00333-8.
- Ayele, M. *et al.* (2005) 'Whole genome shotgun sequencing of Brassica oleracea and its application to gene discovery and annotation in Arabidopsis', pp. 487–495. doi: 10.1101/gr.3176505.2.
- Azuma, A. *et al.* (2012) 'Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions', *Planta*, 236(4), pp. 1067–1080. doi: 10.1007/s00425-012-1650-x.
- Bárcena, A., Martínez, G. and Costa, L. (2019) 'Low intensity light treatment improves purple kale (Brassica oleracea var. sabellica) postharvest preservation at room temperature', *Heliyon*, 5(9). doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02467.
- BARTH, M. M. *et al.* (1993) 'Modified Atmosphere Packaging Affects Ascorbic Acid, Enzyme Activity and Market Quality of Broccoli', *Journal of Food Science*, 58(1), pp. 140–143. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb03230.x.
- Bernal, J. *et al.* (2014) 'Optimized extraction, separation and quantification of twelve intact glucosinolates in broccoli leaves', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 152, pp. 66–74. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.125.
- Birben, E. *et al.* (2012) 'Oxidative stress and antioxidant defense', *World Allergy Organization Journal*, 5, pp. 9–19. doi: 10.1016/j.cnd.2009.09.001.
- Biswal, B., Mohapatra, P. K. and Biswal, U. C. (2012) 'Leaf Senescence and Transformation of Chloroplasts to Gerontoplasts', in *Photosynthesis. Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation.*, pp. 217–230. doi: 10.1007/978-94-007-1579-0.
- Biwell, R. G. S. (1993) *Plant Physiology*. México, D. F.: A. G. T. Editor.
- Blankenship, S. M. and Dole, J. M. (2003) '1-Methylcyclopropene: A review', *Postharvest Biology and Technology*, 28(1), pp. 1–25. doi: 10.1016/S0925-5214(02)00246-6.
- Brecht, J. K. (2019) 'Ethylene Technology', *Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities*, pp. 481–497. doi: 10.1016/b978-0-12-813276-0.00014-6.
- Broekgaarden, C. *et al.* (2015) 'Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense', 11281(269072). doi: 10.1104/pp.15.01020.
- Buchanan-Wollaston, V. *et al.* (2003) 'The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach', *Plant Biotechnology Journal*, 1(1), pp. 3–22. doi: 10.1046/j.1467-7652.2003.00004.x.

- Büchert, A. M. *et al.* (2010) 'Effect of visible light treatments on postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.)', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(September), pp. 355–361. doi: 10.1002/jsfa.4193.
- Büchert, Agustín M., Civello, P. M. and Martínez, G. a. (2011) 'Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytilation during senescence of broccoli', *Journal of Plant Physiology*, 168, pp. 337–343. doi: 10.1016/j.jplph.2010.07.011.
- Büchert, Agustín M., Civello, P. M. and Martínez, G. A. (2011) 'Effect of hot air, UV-C, white light and modified atmosphere treatments on expression of chlorophyll degrading genes in postharvest broccoli (*Brassica oleracea* L.) florets', *Scientia Horticulturae*, 127, pp. 214–219. doi: 10.1016/j.scienta.2010.11.001.
- Butnariu, M. and Butu, A. (2015) *Chemical Composition of Vegetables and Their Products, Handbook of Food Chemistry*. doi: 10.1007/978-3-642-36605-5.
- Cabrera, A. and Mach, N. (2012) 'Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón', *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*. Elsevier, 16(4), pp. 143–153. doi: 10.1016/S2173-1292(12)70089-3.
- Cao, S., Zheng, Y. and Yang, Z. (2011) 'Effect of 1-MCP treatment on nutritive and functional properties of loquat fruit during cold storage', *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 39(1), pp. 61–70. doi: 10.1080/01140671.2010.526621.
- Casajús, V., Reyes Jara, A., *et al.* (2019) 'The time of the day to harvest affects the degreening, antioxidant compounds, and protein content during postharvest storage of broccoli', *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), pp. 1–9. doi: 10.1111/jfbc.12904.
- Casajús, V., Reyes, A., *et al.* (2019) 'The time of the day to harvest affects the degreening , antioxidant compounds , and protein content during postharvest storage of broccoli', (March), pp. 1–9. doi: 10.1111/jfbc.12904.
- Charles, F. *et al.* (2018) 'Visible light as a new tool to maintain fresh-cut lettuce post-harvest quality', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 135(August 2017), pp. 51–56. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.08.024.
- Charoenchongsuk, N. *et al.* (2018) 'Ripening characteristics and pigment changes in russeted pear fruit in response to ethylene and 1-MCP', *Horticulturae*, 4(3), pp. 1–14. doi: 10.3390/horticulturae4030022.
- Chaudhary, P. R. *et al.* (2017) 'Effect of ethylene degreening on flavonoid pathway gene expression and phytochemicals in Rio Red grapefruit (*Citrus paradisi* Macf)', *Phytochemistry Letters*. Elsevier, 22(September), pp. 270–279. doi: 10.1016/j.phytol.2017.09.016.
- Chen, B. and Yang, H. (2013) '6-Benzylaminopurine alleviates chilling injury of postharvest cucumber fruit through modulating antioxidant system and energy status', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(8), pp. 1915–1921. doi: 10.1002/jsfa.5990.
- Chen, J. Y. *et al.* (2008) 'Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit', *Physiologia Plantarum*, 132(3), pp. 318–328. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.01013.x.
- Cheng, Y. *et al.* (2012) 'Effects of 1-MCP on chlorophyll degradation pathway-associated genes expression and chloroplast ultrastructure during the peel yellowing of Chinese pear fruits in storage', *FOOD CHEMISTRY*. Elsevier Ltd, 135(2), pp. 415–422. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.017.
- Clarkson, G. J. J., Rothwell, S. D. and Taylor, G. (2005) 'End of Day Harvest Extends Shelf Life', *Hort Science*, 40(5), pp. 1431–1435.
- Costa, L. *et al.* (2005a) 'Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °C', *Postharvest Biology and Technology*, 35, pp. 191–199. doi: 10.1016/j.postharvbio.2004.07.007.
- Costa, L. *et al.* (2005b) 'Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*Brassica oleracea* L var *Italica*) heads', 1160(November 2004), pp. 1154–1160. doi: 10.1002/jsfa.2081.
- Costa, L. *et al.* (2006) 'UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets', *Postharvest*

- Biology and Technology*, 39(2), pp. 204–210. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.10.012.
- Costa, L. *et al.* (2013) 'Application of low intensity light pulses to delay postharvest senescence of *Ocimum basilicum* leaves', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 86, pp. 181–191. doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.06.017.
- Costa, M. L. *et al.* (2006) 'Hot air treatment decreases chlorophyll catabolism during postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) heads', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1131(April), pp. 1125–1131. doi: 10.1002/jsfa.
- Cuong, D. M. *et al.* (2019) 'Effects of LED lights on expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthesis and accumulation of phenylpropanoids in wheat sprout', *Agronomy*, 9(6). doi: 10.3390/agronomy9060307.
- Dao, T. T. H. H., Linthorst, H. J. M. M. and Verpoorte, R. (2011) 'Chalcone synthase and its functions in plant resistance', *Phytochemistry Reviews*, 10(3), pp. 397–412. doi: 10.1007/s11101-011-9211-7.
- Darré, M. *et al.* (2017) 'Role of UV-B irradiation dose and intensity on color retention and antioxidant elicitation in broccoli florets (*Brassica oleracea* var. *italica*)', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 128, pp. 76–82. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.02.003.
- Deikman, J. and Hammer, P. E. (1995) 'Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Physiology*, 108, pp. 47–57.
- Díaz D, C. A. and Jaramillo N, J. E. (2006) 'El Cultivo de las Crucíferas', *Manual técnico 20. CORPOICA. Colombia*, pp. 1–176.
- Duarte-sierra, A. *et al.* (2017) 'Influence of hormetic heat treatment on quality and phytochemical compounds of broccoli florets during storage', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 128, pp. 44–53. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.01.017.
- Duarte-Sierra, A. *et al.* (2017) 'Influence of hormetic heat treatment on quality and phytochemical compounds of broccoli florets during storage', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 128, pp. 44–53. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.01.017.
- DuPont, M. S. *et al.* (2000) 'Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce endive', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), pp. 3957–3964. doi: 10.1021/jf0002387.
- Durbin, M. L., McCaig, B. and Clegg, M. T. (2000) 'Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome', *Plant Molecular Biology*, 42, pp. 79–92. doi: 10.1023/A:1006375904820.
- Eason, J. R. *et al.* (2007) 'Harvested broccoli (*Brassica oleracea*) responds to high carbon dioxide and low oxygen atmosphere by inducing stress-response genes', *Postharvest Biology and Technology*, 43(3), pp. 358–365. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.10.001.
- Faizal, A., Razis, A. and Noor, N. M. (2013) 'MINI-REVIEW Cruciferous Vegetables: Dietary Phytochemicals for Cancer Prevention', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(1999), pp. 1565–1570.
- FAO (2011) *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Rome.
- Favre, N. *et al.* (2018) 'Pulses of low intensity light as promising technology to delay postharvest senescence of broccoli', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 142(September 2017), pp. 107–114. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.11.006.
- Fonseca, S. C., Oliveira, F. A. R. and Brecht, J. K. (2002) 'Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review', 52, pp. 99–119.
- Fukada-Tanaka, S. *et al.* (1997) 'Identification of New Chalcone Synthase Genes for Flower Pigmentation in the Japanese and Common Morning Glories', *Plant and Cell Physiology*, 38(6), pp. 754–758. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029232.
- Funamoto, Y., Yamauchi, N. and Shigenaga, T. (2002) 'Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.)', *Postharvest Biology and Technology*, 24, pp. 163–170.
- Garrido, Y., Tudela, J. A. and Gil, M. I. (2015) 'Time of day for harvest and delay before processing affect the quality of minimally processed baby spinach', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 110, pp. 9–17. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.07.002.

- Gawlik-Dziki, U. *et al.* (2014) 'Anticancer and antioxidant activity of bread enriched with broccoli sprouts', *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/608053.
- Gergoff Grozeff, G. E., Chaves, A. R. and Bartoli, C. G. (2013) 'Low irradiance pulses improve postharvest quality of spinach leaves (*Spinacia oleracea* L. cv Bison)', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 77, pp. 35–42. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.10.012.
- El Ghaouth, A., Wilson, C. L. and Callahan, A. M. (2003) 'Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment', *Phytopathology*, 93(3), pp. 349–355. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.3.349.
- Gil, M. I., Ferreres, F. and Tomás-Barberán, F. A. (1999) 'Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), pp. 2213–2217. doi: 10.1021/jf981200l.
- Gomez-Lobato, M. E. *et al.* (2014) 'Expression of Stay-Green encoding gene (BoSGR) during postharvest senescence of broccoli', *Postharvest Biology and Technology*, 95, pp. 88–94.
- Gómez-Lobato, M. E. *et al.* (2012) 'Effect of 1-MCP on the expression of chlorophyll degrading genes during senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.)', *Scientia Horticulturae*, 144, pp. 208–211. doi: 10.1016/j.scienta.2012.07.017.
- Gómez-lobato, M. E., Civello, P. M. and Martínez, G. (2014) 'Clonado de PAL en brócoli (*Brassica oleracea*). Análisis de su expresión durante la senescencia y el efecto de tratamientos postcosecha.', in *XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. Mar del Plata, Argentina.
- Gomez-Lobato, M. E., Civello, P. M. and Martínez, G. a. (2012) 'Effects of ethylene, cytokinin and physical treatments on BoPaO gene expression of harvested broccoli', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(January 2011), pp. 151–158. doi: 10.1002/jsfa.4555.
- Gong, Y. and Mattheis, J. P. (2002) 'Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on chlorophyll catabolism of broccoli florets', (Wang 1977), pp. 33–38.
- González-Aguilar, G. A., Zavaleta-Gatica, R. and Tiznado-Hernández, M. E. (2007) 'Improving postharvest quality of mango "Haden" by UV-C treatment', *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), pp. 108–116. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.01.012.
- Gray, A. R. (1982) 'Taxonomy and evolution of Broccoli (*Brassica oleracea italica* 1)', 36(February), pp. 397–410.
- Grbić, V. (2003) 'SAG2 and SAG12 protein expression in senescing *Arabidopsis* plants', *Physiologia Plantarum*, 119(2), pp. 263–269. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00168.x.
- Gunes, G., Liu, R. H. and Watkins, C. B. (2002) 'Controlled-atmosphere effects on postharvest quality and antioxidant activity of cranberry fruits', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), pp. 5932–5938. doi: 10.1021/jf025572c.
- Guo, R., Yuan, G. and Wang, Q. (2011) 'Sucrose enhances the accumulation of anthocyanins and glucosinolates in broccoli sprouts', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 129(3), pp. 1080–1087. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.078.
- Gupta, D. K., Palma, J. M. and Corpas, F. J. (2018) *Antioxidants and Antioxidant Enzymes, Free Radical Biology and Medicine*. Springer. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.230.
- Han, X. *et al.* (2013) 'Antioxidant intake and pancreatic cancer risk: The Vitamins and Lifestyle (VITAL) Study', *Cancer*, 119(7), pp. 1314–1320. doi: 10.1002/cncr.27936.
- Hasperué, J. H. *et al.* (2013) 'Time of day at harvest affects the expression of chlorophyll degrading genes during postharvest storage of broccoli', *Postharvest Biology and Technology*, 82, pp. 22–27. doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.02.021.
- Hasperué, J. H., Chaves, A. R. and Martínez, G. a. (2011) 'End of day harvest delays postharvest senescence of broccoli florets', *Postharvest Biology and Technology*, 59, pp. 64–70. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.08.005.
- Hodges, D. M. (2000) 'The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves', *Journal of Experimental Botany*, 51(344), pp. 645–655. doi: 10.1093/jexbot/51.344.645.
- Horie, Y. *et al.* (2009) 'Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in *Arabidopsis*', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(26), pp. 17449–17456. doi: 10.1074/jbc.M109.008912.

- Hortensteiner, S. (2013) 'Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown', pp. 505–517. doi: 10.1007/s11103-012-9940-z.
- Hu, Y. *et al.* (2017) 'Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: Crosstalk with other phytohormones', *Journal of Experimental Botany*, 68(6), pp. 1361–1369. doi: 10.1093/jxb/erx004.
- Hwang, J. H. and Lim, S. Bin (2015) 'Antioxidant and anticancer activities of broccoli by-products from different cultivars and maturity stages at harvest', *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(1), pp. 8–14. doi: 10.3746/pnf.2015.20.1.8.
- Iqbal, N. *et al.* (2017) 'Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones', *Frontiers in Plant Science*, 8(April), pp. 1–19. doi: 10.3389/fpls.2017.00475.
- Jacob, R. A. (1995) 'The integrated antioxidant system', *Science*, 15(5), pp. 755–766.
- Jacobo-velázquez, D. A. (2016) 'Plants as Biofactories : Postharvest Stress-Induced Accumulation of Phenolic Compounds and Glucosinolates in Broccoli Subjected to Wounding Stress and Exogenous Phytohormones', 7(February), pp. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2016.00045.
- Jagadeesh, S. L. *et al.* (2011) 'Influence of Postharvest UV-C Hormesis on the Bioactive Components of Tomato during Post-treatment Handling', *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), pp. 1463–1472. doi: 10.1007/s11947-009-0259-y.
- Jagadeesh, S. L., Charles, M. T. and Garipey, Y. (2011) 'Influence of Postharvest UV-C Hormesis on the Bioactive Components of Tomato during Post-treatment Handling', pp. 1463–1472. doi: 10.1007/s11947-009-0259-y.
- Jia, C. G. *et al.* (2009) 'Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets', *Food Chemistry*, 114(1), pp. 28–37. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.009.
- Jia, T. *et al.* (2015) 'Accumulation of the NON-YELLOW COLORING 1 protein of the chlorophyll cycle requires chlorophyll b in Arabidopsis thaliana', *Plant Journal*, 81(4), pp. 586–596. doi: 10.1111/tpj.12753.
- Jiang, Y., Joyce, D. C. and Terry, L. A. (2001) '1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay', *Postharvest Biology and Technology*, 23(3), pp. 227–232. doi: 10.1016/S0925-5214(01)00123-5.
- Jibrán, R. *et al.* (2013) 'Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals', *Plant Molecular Biology*, 82(6), pp. 547–561. doi: 10.1007/s11103-013-0043-2.
- Jibrán, R., Hunter, D. A. and Dijkwel, P. P. (2013) 'Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals', *Plant Molecular Biology*, 82(6), pp. 547–561. doi: 10.1007/s11103-013-0043-2.
- Jing, H. C. *et al.* (2002) 'Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence', *Plant Journal*, 32(1), pp. 51–63. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01400.x.
- Kaewsuksaeng, S. *et al.* (2015) 'Postharvest heat treatment delays chlorophyll degradation and maintains quality in Thai lime (*Citrus aurantifolia* Swingle cv. Paan) fruit', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 100, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.09.020.
- Kato, M. *et al.* (2002) 'Wound-induced ethylene synthesis in stem tissue of harvested broccoli and its effect on senescence and ethylene synthesis in broccoli florets', *Postharvest Biology and Technology*, 24, pp. 69–78.
- Kaur, P., Rai, D. R. and Paul, S. (2011) 'Quality changes in fresh-cut spinach (*spinacia oleracea*) under modified atmospheres with perforations', *Journal of Food Quality*, 34(1), pp. 10–18. doi: 10.1111/j.1745-4557.2010.00361.x.
- Kieber, J. J. and Schaller, G. E. (2018) 'Cytokinin signaling in plant development', *Development (Cambridge, England)*, 145(4), pp. 1–7. doi: 10.1242/dev.149344.
- Kim, J. (2019) 'Sugar metabolism as input signals and fuel for leaf senescence', *Genes and Genomics*. Springer Singapore, 0(0), p. 0. doi: 10.1007/s13258-019-00804-y.
- Koes, R. E. *et al.* (1989) 'Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*', *Gene*, 81, pp. 245–257. Available at: <https://ac-els-cdn->

com.uml.idm.oclc.org/0378111989901856/1-s2.0-0378111989901856-main.pdf?_tid=20ccd959-20db-47f5-88ac-8a33c5abdae5&acdnat=1542829530_3773a77d8411d70127c705168149a347.

- Kokalj, D. *et al.* (2019) 'Postharvest light-emitting diode irradiation of sweet cherries (*Prunus avium* L.) promotes accumulation of anthocyanins', *Postharvest Biology and Technology*, 148(November 2018), pp. 192–199. doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.11.011.
- Kuai, B., Chen, J. and Hörtensteiner, S. (2018) 'The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown', *Journal of Experimental Botany*, 69(4), pp. 751–767. doi: 10.1093/jxb/erx322.
- Kuittinen, H. and Aguadé, M. (2000) 'Nucleotide variation at the CHALCONE ISOMERASE locus in *Arabidopsis thaliana*', *Genetics*, 155(2), pp. 863–872.
- Kumah, P. and Appiah, F. (2011) 'Effect of hot water treatment on quality and shelf-life of Keitt mango', *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(5), pp. 806–817. doi: 10.5251/abjna.2011.2.5.806.817.
- Kusaba, M. *et al.* (2007) 'Rice non-yellow coloring1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence', *Plant Cell*, 19(4), pp. 1362–1375. doi: 10.1105/tpc.106.042911.
- Larson, R. A. (1988) 'The antioxidants of higher plants', *Phytochemistry*, 27(4).
- Lemoine, M. L. *et al.* (2009) 'Hot air treatment delays senescence and maintains quality of fresh-cut broccoli florets during refrigerated storage', *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), pp. 1076–1081. doi: 10.1016/j.lwt.2009.01.009.
- Lemoine, M. L., Chaves, A. R. and Martínez, G. A. (2010) 'Influence of combined hot air and UV-C treatment on the antioxidant system of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*)', *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 43(9), pp. 1313–1319. doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.011.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) 'Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes', *Methods in Enzymology*, 148, pp. 350–382.
- Liebsch, D. and Keech, O. (2016) 'Dark-induced leaf senescence: new insights into a complex light-dependent regulatory pathway', *New Phytologist*, 212(3), pp. 563–570. doi: 10.1111/nph.14217.
- Liu, C. *et al.* (2011) 'Temporary effect of postharvest UV-C irradiation on gene expression profile in tomato fruit', *Gene*. Elsevier B.V., 486(1–2), pp. 56–64. doi: 10.1016/j.gene.2011.07.001.
- Liu, H., Cao, J. and Jiang, W. (2015) 'Changes in phenolics and antioxidant property of peach fruit during ripening and responses to 1-methylcyclopropene', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 108, pp. 111–118. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.06.012.
- Liu, J. *et al.* (2012) 'Effect of heat treatment on inhibition of *Monilinia fructicola* and induction of disease resistance in peach fruit', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 65, pp. 61–68. doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.11.002.
- Liu, X. and Lv, K. (2013) 'Cruciferous vegetables intake is inversely associated with risk of breast cancer: A meta-analysis', *Breast*. Elsevier Ltd, 22(3), pp. 309–313. doi: 10.1016/j.breast.2012.07.013.
- Loi, M. *et al.* (2019) 'Effect of different light-emitting diode (LED) irradiation on the shelf life and phytonutrient content of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)', *Food Chemistry*. Elsevier, 283(September 2018), pp. 206–214. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.021.
- Lozano, L. *et al.* (2017) 'Evaluación de dos híbridos de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Valle de Lerma, Salta. Argentina', 36(90), pp. 37–48.
- Lu, J. *et al.* (2007) 'Heat treatment application to increase fruit and vegetables quality', *Stewart Postharvest Review*, 3(4), pp. 1–7. doi: 10.2212/spr.2007.3.4.
- Lurie, S. and Lurie, S. (2016) 'Prestorage heat stress to improve storability of fresh produce : a review', 9978(April). doi: 10.1080/07929978.2016.1159411.
- Lv, J. *et al.* (2020) 'Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the expression of genes involved in the chlorophyll degradation pathway of apple fruit during storage', *Food Chemistry*. Elsevier, 308(July 2019), p. 125707. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125707.

- Ma, G. *et al.* (2009) 'Effect of 1-methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli', *Plant Growth Regulation*, 57(3), pp. 223–232. doi: 10.1007/s10725-008-9339-7.
- MacLean, D. D. *et al.* (2006) 'Postharvest variation in apple (*Malus x domestica* Borkh.) flavonoids following harvest, storage, and 1-MCP treatment', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), pp. 870–878. doi: 10.1021/jf0525075.
- Mahajan, S. M. Æ. T. K. G. Æ. P. V (2009) 'Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables : A Review', pp. 133–158. doi: 10.1007/s12393-009-9007-3.
- Martin, C. R. (1993) 'Structure, Function, and Regulation of the Chalcone Synthase', *International Review of Cytology*, 147(C), pp. 233–284. doi: 10.1016/S0074-7696(08)60770-6.
- Martínez-Hernández, G. B. *et al.* (2013) 'Combination of electrolysed water, UV-C and superatmospheric O₂ packaging for improving fresh-cut broccoli quality', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 76, pp. 125–134. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.09.013.
- Martínez-Sánchez, A. *et al.* (2006) 'Controlled atmosphere preserves quality and phytonutrients in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*)', *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), pp. 26–33. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.12.015.
- Martínez-Sánchez, A. *et al.* (2019) 'Preharvest UV-C treatment improves the quality of spinach primary production and postharvest storage', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 155(May), pp. 130–139. doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.05.021.
- Matsumura, H. *et al.* (2005) 'Molecular linkage mapping and phylogeny of the chalcone synthase multigene family in soybean', *Theoretical and Applied Genetics*, 110(7), pp. 1203–1209. doi: 10.1007/s00122-005-1950-7.
- Mayuoni, L. *et al.* (2011) 'Does ethylene degreening affect internal quality of citrus fruit?', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 62(1), pp. 50–58. doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.04.005.
- Meir, S. *et al.* (2007) 'Quality improvement of cut flowers and potted plants with postharvest treatments based on various cytokinins and auxins', *Acta Horticulturae*, 755, pp. 143–154. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.755.18.
- Meldgaard, M. (1992) 'Expression of chalcone synthase, dihydroflavonol reductase, and flavanone-3-hydroxylase in mutants of barley deficient in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis', *Theoretical and Applied Genetics*, 83(6–7), pp. 695–706. doi: 10.1007/BF00226687.
- Mok, D. W. S. and Mok, M. C. (2001) 'Cytokinin Metabolism and Action', *Plant Physiology*, 52(39), pp. 89–118. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.89.
- Mudau, A. R. *et al.* (2018) 'Influence of modified atmosphere packaging on postharvest quality of baby spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves', *HortScience*, 53(2), pp. 224–230. doi: 10.21273/HORTSCI12589-17.
- Mudau, A. R. *et al.* (2019) 'Effect of season on growth, productivity, and postharvest quality of baby spinach', *HortScience*, 54(5), pp. 835–839. doi: 10.21273/HORTSCI13746-18.
- Muir, S. R. *et al.* (2001) 'Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols', *Nature Biotechnology*, 19(5), pp. 470–474. doi: 10.1038/88150.
- Natella, F. *et al.* (2016) 'Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation', *FOOD CHEMISTRY*. Elsevier Ltd, 201, pp. 101–109. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.063.
- Ninh Le, T. *et al.* (2019) 'Broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *Italica*) Sprouts as the Potential Food Source for Bioactive Properties: A comprehensive study on in vitro disease models', *Foods*, 8(11). doi: 10.3390/foods8110532.
- Nishihara, M., Nakatsuka, T. and Yamamura, S. (2005) 'Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene', *FEBS Letters*, 579(27), pp. 6074–6078. doi: 10.1016/j.febslet.2005.09.073.
- O'Neill, S. D. *et al.* (1990) 'Molecular genetic analysis of chalcone synthase in *Lycopersicon esculentum* and an anthocyanin-deficient mutant', *MGG Molecular & General Genetics*, 224(2), pp. 279–288. doi: 10.1007/BF00271562.
- Page, T., Griffiths, G. and Buchanan-wollaston, V. (2001) 'Molecular and Biochemical Characterization

- of Postharvest Senescence in Broccoli', *Plant Physiology*, 125. Available at: <http://www.plantphysiol.org/content/125/2/718.short>.
- Pan, J. *et al.* (2004) 'Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), pp. 1831–1838. doi: 10.1002/jsfa.1894.
- Panth, N., Paudel, K. R. and Parajuli, K. (2016) 'Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease', *Advances in Medicine*, 2016, pp. 1–12. doi: 10.1155/2016/9152732.
- Park, Y. S. *et al.* (2006) 'Effect of ethylene treatment on kiwifruit bioactivity', *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(3), pp. 151–156. doi: 10.1007/s11130-006-0025-5.
- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A. and García-Viguera, C. (2011) 'Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation', *Food Chemistry*, 129(1), pp. 35–44. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.049.
- Perini, M. A. *et al.* (2017) 'Hot water treatments performed in the base of the broccoli stem reduce postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var italic) heads stored at 20 C', *LWT - Food Science and Technology*, 77, pp. 314–322. doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.066.
- Piao, W. *et al.* (2017) 'Rice 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase is involved in the promotion of chlorophyll degradation and modulates cell death signaling', *Molecules and Cells*, 40(10), pp. 773–786. doi: 10.14348/molcells.2017.0127.
- Pinheiro, J. *et al.* (2015) 'Use of UV-C postharvest treatment for extending fresh whole tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. Zinac) shelf-life', *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), pp. 5066–5074. doi: 10.1007/s13197-014-1550-0.
- Podsdek, A. (2007) 'Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables : A review', *LWT - Food Science and Technology*, 40, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.lwt.2005.07.023.
- Pombo, M. A. *et al.* (2009) 'UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation', *Postharvest Biology and Technology*, 51(2), pp. 141–148. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.07.007.
- Pombo, M. A. *et al.* (2011) 'UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.)', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 59(1), pp. 94–102. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.08.003.
- Poret, M., Chandrasekar, B. and Hoorn, R. A. L. Van Der (2016) 'Plant Science Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape', *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd, 246, pp. 139–153. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.02.011.
- Prasad, S., Gupta, S. C. and Tyagi, A. K. (2017) 'Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 387, pp. 95–105. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.042.
- Ralston, L. *et al.* (2005) 'Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases', *Plant Physiology*, 137(4), pp. 1375–1388. doi: 10.1104/pp.104.054502.
- Rodoni, L. M. *et al.* (2016) 'Combined use of mild heat treatment and refrigeration to extend the postharvest life of organic pepper sticks, as affected by fruit maturity stage', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 117, pp. 168–176. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.11.016.
- Rodov, V., Vinokur, Y. and Horev, B. (2012) 'Brief postharvest exposure to pulsed light stimulates coloration and anthocyanin accumulation in fig fruit (*Ficus carica* L.)', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 68, pp. 43–46. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.02.001.
- Rodrigues, A. S. *et al.* (2010) 'Effect of post-harvest practices on flavonoid content of red and white onion cultivars', *Food Control*. Elsevier Ltd, 21(6), pp. 878–884. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.12.003.
- Rushing, J. W. (1990) 'Cytokinins Affect Respiration, Ethylene Production, and Chlorophyll Retention of Packaged Broccoli Florets', *Hort Science*, 25(1), pp. 88–90.
- Sabir, F. K. (2012) 'Postharvest quality response of broccoli florets to combined application of 1-methylcyclopropene and modified atmosphere packaging', *Agricultural and Food Science*,

- 21(4), pp. 421–429. doi: 10.23986/afsci.6387.
- Sade, N. *et al.* (2018) 'Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress', *Journal of Experimental Botany*, 69(4), pp. 845–853. doi: 10.1093/jxb/erx235.
- Sakuraba, Y. *et al.* (2013) '7-Hydroxymethyl chlorophyll a reductase functions in metabolic channeling of chlorophyll breakdown intermediates during leaf senescence', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 430(1), pp. 32–37. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.050.
- Samson, G. *et al.* (2020) 'Oxidation of polyphenols and inhibition of photosystem II under acute photooxidative stress', *Planta*. Springer Berlin Heidelberg, 251(1), pp. 1–13. doi: 10.1007/s00425-019-03316-x.
- Santana, A. C. *et al.* (2012) 'Effect of harvest at different times of day on the physical and chemical characteristics of vegetable-type soybean', *Food Science and Technology*, 32(2), pp. 351–356. doi: 10.1590/s0101-20612012005000044.
- Sato, R., Ito, H. and Tanaka, A. (2015) 'Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions', *Photosynthesis Research*. Springer Netherlands, 126(2–3), pp. 249–259. doi: 10.1007/s11120-015-0145-6.
- Sato, Y. *et al.* (2009) 'Two short-chain dehydrogenase / reductases , NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE , are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice', *Plant Journal*, 57(1), pp. 120–131. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03670.x.
- Schulze-Lefert, P. *et al.* (1989) 'Functional architecture of the light-responsive chalcone synthase promoter from parsley.', *The Plant cell*, 1(7), pp. 707–714. doi: 10.2307/3868961.
- Selcuk, N. and Erkan, M. (2014) 'Changes in antioxidant activity and postharvest quality of sweet pomegranates cv. Hicrannar under modified atmosphere packaging', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 92, pp. 29–36. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.01.007.
- Serrano, M. *et al.* (2006) 'Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging', *Postharvest Biology and Technology*, 39(1), pp. 61–68. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.08.004.
- Shahidi, F. (2000) 'Antioxidants in food and food antioxidants', *Nahrung*, 44(3), pp. 158–163.
- Shimoda, Y., Ito, H. and Tanaka, A. (2016) 'Arabidopsis STAY-GREEN , Mendel ' s Green Cotyledon Gene , Encodes Magnesium-Dechelatase', 28(September), pp. 2147–2160. doi: 10.1105/tpc.16.00428.
- Siddiqui, M. W. *et al.* (2015) '6-Benzylaminopurine affects lipid peroxidation and membrane permeability and thereby preserves curd quality and antioxidants during storage of cauliflower', *Acta Physiologiae Plantarum*. Springer Berlin Heidelberg, 37(5), pp. 1–8. doi: 10.1007/s11738-015-1848-1.
- Simionatto, E. *et al.* (2009) 'Influence of Cutting and Harvest Day Time on the essential oils of lemon balm (melissa officinalis L.)', *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(3), pp. 348–357. doi: 10.1080/0972060X.2009.10643730.
- Soengas, P. *et al.* (2018) 'Endogenous Circadian Rhythms in Polyphenolic Composition Induce Changes in Antioxidant Properties in Brassica Cultivars', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), pp. 5984–5991. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01732.
- Song, M. B. *et al.* (2015) 'Effects of high CO₂ treatment on green-ripening and peel senescence in banana and plantain fruits', *Journal of Integrative Agriculture*. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 14(5), pp. 875–887. doi: 10.1016/S2095-3119(14)60851-0.
- Song, Y. *et al.* (2016) 'Abscisic acid as an internal integrator of multiple physiological processes modulates leaf senescence onset in arabidopsis thaliana', *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), pp. 1–16. doi: 10.3389/fpls.2016.00181.
- Sui, Y. *et al.* (2016) 'Recent advances and current status of the use of heat treatments in postharvest disease management systems : Is it time to turn up the heat ?', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 51, pp. 34–40. doi: 10.1016/j.tifs.2016.03.004.
- Sun, B. *et al.* (2012) 'Effects of plant hormones on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese kale', *Food Research International*. Elsevier B.V., 48(2), pp. 359–366. doi: 10.1016/j.foodres.2012.04.021.
- Talla, S. K. *et al.* (2016) 'Cytokinin delays dark-induced senescence in rice by maintaining the

- chlorophyll cycle and photosynthetic complexes', *Journal of Experimental Botany*, 67(6), pp. 1839–1851. doi: 10.1093/jxb/erv575.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. and Kakde, R. B. (2008) 'Flavonoids as Nutraceuticals : A Review', 7(September), pp. 1089–1099.
- Tenorio, M. D., Villanueva, M. J. and Sagardoy, M. (2004) 'Changes in carotenoids and chlorophylls in fresh green asparagus (*Asparagus officinalis* L) stored under modified atmosphere packaging', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(4), pp. 357–365. doi: 10.1002/jsfa.1631.
- Thain, S. C. *et al.* (2002) 'The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific', *Plant Physiology*, 130(1), pp. 102–110. doi: 10.1104/pp.005405.
- Tian, M. S. *et al.* (1994) 'A role for ethylene in the yellowing of broccoli after harvest', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(2), pp. 276–281. doi: 10.21273/jashs.119.2.276.
- Topcu, Y. *et al.* (2015) 'Plant Physiology and Biochemistry The effects of UV radiation during the vegetative period on antioxidant compounds and postharvest quality of broccoli (*Brassica oleracea* L.)', *Plant Physiology et Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.02.016.
- Trivellini, A., Cocetta, G., Vernieri, P., Mensuali, A., *et al.* (2015) 'Effect of cytokinins on delaying petunia flower senescence: a transcriptome study approach', 1, pp. 169–180. doi: 10.1007/s11103-014-0268-8.
- Trivellini, A., Cocetta, G., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., *et al.* (2015) 'Effect of cytokinins on delaying petunia flower senescence: a transcriptome study approach', *Plant molecular biology*, 87(1–2), pp. 169–180. doi: 10.1007/s11103-014-0268-8.
- Troncoso-ponce, M. A. *et al.* (2013) 'Plant Science Lipid turnover during senescence'. Elsevier Ireland Ltd, 206, pp. 13–19.
- Turtoi, M. (2013) 'Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface : A review', 19(3), pp. 325–337.
- Villarreal-García, D. *et al.* (2016) 'Plants as Biofactories : Postharvest Stress-Induced Accumulation of Phenolic Compounds and Glucosinolates in Broccoli Subjected to Wounding Stress and Exogenous Phytohormones', *Frontiers in Plant Science*, 7(February), pp. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2016.00045.
- Viña, S. Z., López Osornio, M. M. and Chaves, A. R. (2007) 'Quality changes in fresh cut celery as affected by heat treatment and storage', *Journal of the science of food and agriculture*, 87, pp. 1400–1407. doi: 10.1002/jsfa.
- Waki, T. *et al.* (2020) 'A conserved strategy of chalcone isomerase-like protein to rectify promiscuous chalcone synthase specificity', *Nature communications*. Springer US, 11(1), p. 870. doi: 10.1038/s41467-020-14558-9.
- Wan, C.-Y. and Wilkins, T. A. (1994) 'A modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)'. *Analytical Biochemistry*, pp. 7–12. doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1538>.
- Wang, W. K. *et al.* (2007) 'Diverse selective modes among orthologs/paralogs of the chalcone synthase (Chs) gene family of *Arabidopsis thaliana* and its relative *A. halleri* ssp. *gemmifera*', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(2), pp. 503–520. doi: 10.1016/j.ympev.2007.05.006.
- Watada, A. E. (1986) 'Effects of Ethylene on the Quality and Vegetables of Fruits', *Food Technology*, (May), pp. 82–85.
- Watada, A. E. *et al.* (1987) 'Quality of Green Beans, Bell Peppers and Spinach Stored in Polyethylene Bags', *Journal of Food Science*, 52(6), pp. 1637–1641. doi: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb05894.x.
- Watkins, C. B. (2006) 'The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables', *Biotechnology Advances*, 24(4), pp. 389–409. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.005.
- Wei, Y. and Ye, X. (2011) 'Effect of 6-benzylaminopurine combined with ultrasound as pre-treatment on quality and enzyme activity of green asparagus', *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(5), pp. 587–595. doi: 10.1111/j.1745-4549.2010.00504.x.
- Winkel-shirley, B. (2002) 'Biosynthesis of flavonoids and effects of stress', pp. 218–223.
- Woo, H. R. *et al.* (2019) 'Leaf Senescence: Systems and Dynamics Aspects', *Annual Review of Plant*

- Biology*, 70(1), pp. 347–376. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-095859.
- Wright, M. E. *et al.* (2004) 'Development of a comprehensive dietary antioxidant index and application to lung cancer risk in a cohort of male smokers', *American Journal of Epidemiology*, 160(1), pp. 68–76. doi: 10.1093/aje/kwh173.
- Xu, F. *et al.* (2012) '6-Benzylaminopurine Delays Senescence and Enhances Health-Promoting Compounds of Harvested Broccoli', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), pp. 234–240. doi: 10.1021/jf2040884.
- Xu, F. *et al.* (2014) 'Blue light irradiation affects anthocyanin content and enzyme activities involved in postharvest strawberry fruit', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), pp. 4778–4783. doi: 10.1021/jf501120u.
- Yang, X. *et al.* (2013) 'Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V., 78, pp. 55–66. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.11.012.
- Yang, Z. and Ohlrogge, J. B. (2009) 'Turnover of fatty acids during natural senescence'. *Plant Physiology*, pp. 1981–1989. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.109.140491>.
- Zhang, L. *et al.* (2011) 'Effect of post-harvest heat treatment on proteome change of peach fruit during ripening', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 74(7), pp. 1135–1149. doi: 10.1016/j.jprot.2011.04.012.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Wu, J. (1999) 'The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals', *Food Chemistry*, 64, pp. 555–559.
- Zoratti, L. *et al.* (2014) 'Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits', *Frontiers in Plant Science*, 5(OCT), pp. 1–17. doi: 10.3389/fpls.2014.00534.