



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

**“Análisis de la calidad nutricional de brócoli (*Brassica oleracea*), durante la poscosecha. Evaluación del metabolismo de glucosinolatos”**

---

**Tesista: Lic. Victoria Casajús**

**Director: Dr. Gustavo A. Martínez**

**Codirectora: Dra. M. Eugenia Gómez Lobato**

**2022**

## Agradecimientos

A mi Mamá y mi Papá porque son el sostén incondicional en todos los momentos de mi vida y llegué acá gracias a ellos,

A Ro, Mili y Rodri, no imagino la vida sin mis hermanos,

A mi Director, Gustavo, por guiarme en todo este camino y ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente,

A mis Codirectores, Marcos y Eugenia, por acompañarme en esta trayectoria,

A mis Amigas para toda la vida, Naty, Anita, Flor, Lu y Ale que siempre están ahí y *para todo*,

A mis Amigas y compañeras de Laboratorio, Romi, Core y Anto que hicieron felices mis días de laboratorio, me aconsejaron y me incitaron siempre a seguir adelante,

A Mau, Agus y Nacho, por su generosidad, por recibirme con los brazos abiertos en el laboratorio, aconsejarme, enseñarme y ayudarme siempre, además de convertirse en grandes amigos,

Al INFIVE por permitirme realizar mi tesis de posgrado,

A la Facultad de Cs. Exactas, que guarda mis mejores recuerdos,

*Mis más sinceros agradecimientos*

*Vicky*

La presente tesis doctoral (con expediente de inscripción 0700-007923) se encuentra inscripta y admitida en la Carrera del Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas (Categoría, "A" Res. 747/13 CONEAU), de acuerdo con la Ordenanza 261 de la Universidad.

## Publicaciones

*Los resultados mostrados en la siguiente tesis han sido publicados en revistas con referato internacional:*

**Casajús V**, Civello P.M, Thannhauser T, Li L, Gómez Lobato M.E, Martínez G.A.

“Evidence of glucosinolates translocation from inflorescences to stems during postharvest storage of broccoli” (Enviado a *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*)

**Casajús V**, Howe K, Fish T, Civello P.M, Thannhauser T, Li L, Gómez Lobato M.E, Martínez G.A.

“Effect of modified atmosphere packaging on glucosinolate metabolism during postharvest storage of broccoli” (Enviado a *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*)

**Casajús V**, Civello P.M, Martínez G.A, Howe K, Fish T, Yang Y, Thannhauser T, Li L, Gómez Lobato M.E

“Effect of continuous white light illumination on glucosinolate metabolism during postharvest storage of broccoli”. *LWT-Food Science and Technology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111302>

**Casajús V**, Demkura P, Civello P.M, Gómez Lobato M.E, Martínez G.A

“Harvesting at different time-points times of day affects glucosinolate metabolism during postharvest storage of broccoli”. *Food Research International*.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109529>

**Casajús V**, Reyes Jara A, Gergoff G, Gómez Lobato M.E., Civello P.M., Martínez G.A.

“The time of the day to harvest affects the degreening, antioxidant compounds and protein content during postharvest storage of broccoli”. *Journal of Food Biochemistry*.  
<http://doi.org/10.1111/jfbc.12904>

*En las siguientes actas de congresos:*

“Efecto del envasado en atmósferas modificadas sobre el metabolismo de glucosinolatos durante el almacenamiento poscosecha de brócoli”

**Casajús V**, Martínez G.A, Gómez Lobato M.E. III Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha. 2021

“Expresión de genes de biosíntesis y degradación de glucosinolatos indólicos en brócoli tratados con luz blanca y luz roja”

**Casajús V**, Barcena A, Costa L, Civello P.M, Martínez G.A, Gómez Lobato M.E. II Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha. 2019.

“Effect of time of day at harvest and postharvest storage on the metabolism of indolic glucosinolates in broccoli”.

**Casajús V**, Gómez Lobato M.E, Civello P.M, Martínez G.A. XXXII Reunión Argentina/XVI Congreso latinoamericano de FISIOLÓGÍA VEGETAL. 2018.

“Expresión de genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en brócoli durante el ritmo circadiano y senescencia poscosecha”.

**Casajús V**, Gómez Lobato M.E, Civello P.M, Martínez G.A. IX Congreso iberoamericano Tecnología poscosecha y agroexportaciones.2017.

“Expresión de genes de biosíntesis y degradación de glucosinolatos indólicos en brócoli durante el ritmo circadiano y senescencia poscosecha”.

**Casajús V**, Gómez Lobato M.E, Civello P.M, Martínez G.A. I Congreso argentino de biología y tecnología poscosecha.2017.

## Neologismos y abreviaturas

1-MCP: 1-metilciclopropeno

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNasa: nucleasa

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AVG: aminoetoxivinilglicina

BAP: bencilaminopurina

BSA: albúmina sérica bovina

Buffer: solución amortiguadora

DEPC: pirocarbonato de dietilo

dNTPs: desoxinucleósidos 5'-trifosfato

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamintetracético

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.  
(Food and Agriculture Organization of the United Nations)

FT: factor de transcripción

GLS: glucosinolatos

M-MLV: virus de la leucemia murina transcriptasa reverse

MeJa: metiljasmonato

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Centre for Biotechnology Information)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

*primers*: cebadores

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

TBE: buffer Tris-Borato-EDTA

UV: radiación ultravioleta

UV-C: radiación ultravioleta comprendida en el rango de 200-280 nm

## **Unidades**

µg: microgramos

mg: miligramos

## Resumen

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) es una hortaliza de la familia *Brassicaceae* con un alto contenido de nutrientes y compuestos fitoquímicos, tales como vitaminas, minerales, compuestos con capacidad antioxidante (fenoles, flavonoides) y glucosinolatos. Los glucosinolatos son metabolitos secundarios, cuyos productos de hidrólisis poseen efectos benéficos para la salud humana, entre los que se destaca la prevención de inflamaciones, la disminución de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y la acción anticancerígena.

Del brócoli se cosecha y se consume la cabeza floral, la cual está compuesta por tejidos inmaduros que requieren una gran cantidad de agua, nutrientes y hormonas para la mantención de la homeostasis. Cuando se realiza la cosecha de la cabeza, se detiene el suministro de todos estos compuestos, lo cual desencadena un importante estrés, que se refleja en una rápida senescencia de la inflorescencia, con la pérdida del color verde, así como también pérdida de agua y de turgencia de los tejidos. Asimismo, se ha reportado la disminución del valor nutricional, con una pérdida del contenido de proteínas, de ácido ascórbico y de glucosinolatos totales durante el almacenamiento poscosecha.

Según datos de la FAO, aproximadamente 1.300 millones de toneladas de alimentos se desperdician en todo el mundo por año, atribuyéndose entre un 10 y un 20% a las pérdidas previas a la cosecha, a lo que se debe sumar las partes de las plantas que no son comestibles. El mundo invierte el 95% de sus recursos de I+D+I alimentario para aumentar la producción, pero solo un 5% en la conservación. Diversos métodos físicos y químicos poscosecha han sido estudiados con el objetivo de regular la senescencia y prolongar la vida útil de brócoli, incluyendo el almacenamiento refrigerado, el envasado en atmósferas modificadas, tratamientos térmicos, aplicaciones de UV-C, uso de inhibidores biosintéticos del etileno como la aminoetoxivinilglicina (AVG) y de inhibidores de la acción de esta hormona, tales como el 1-metilciclopropeno (1-MCP), los iones de plata y el etanol.

El objetivo general del plan de tesis fue analizar metodologías de poscosecha que además de prolongar la vida útil del brócoli, permitan aumentar o mantener el contenido de glucosinolatos en las inflorescencias; y contribuir al conocimiento a escala bioquímica y fisiológica del metabolismo de estos compuestos, por el interés de los glucosinolatos en los efectos benéficos para la salud humana.



En general, el contenido total de los glucosinolatos decae marcadamente durante la senescencia poscosecha de brócoli. Al analizar el efecto de cosechar en diferentes momentos del día, se observó que la cosecha de las cabezas hacia el final del día permitía un retraso en la aparición de los síntomas de senescencia. Respecto al metabolismo de glucosinolatos, la cosecha en diferentes momentos del día influye en el perfil y la concentración de glucosinolatos tanto indólicos como alifáticos de las cabezas de brócoli, tanto en el día de cosecha como durante el almacenamiento. Análogamente, el momento de cosecha también influye en la expresión de los genes asociados con la biosíntesis y degradación de los glucosinolatos.

En cuanto al tratamiento de las cabezas con reguladores hormonales, se detectó que la aplicación de etefón causa una mayor tasa de senescencia y, consecuentemente un mayor decaimiento del nivel de glucosinolatos, mientras que las aplicaciones de citoquininas sintéticas (BAP) o de 1-MCP permiten mantener, en general, contenidos más altos de glucosinolatos. En la expresión génica asociada a la biosíntesis de los glucosinolatos, se detectó una mayor expresión en las muestras tratadas con etileno y una menor expresión en las muestras tratadas con BAP, no mostrando correlación con el contenido de los respectivos glucosinolatos. El tratamiento con 1-MCP causó un efecto similar al BAP y contrario al etefón.

El uso de tratamientos físicos poscosecha, ha sido muy extendido en los últimos años, debido a que son tecnologías simples, limpias y medioambientalmente amigables. El almacenamiento de las cabezas de brócoli bajo luz visible continua de baja intensidad puede retrasar la senescencia y el decaimiento del contenido de glucosinolatos hacia el final de este período. La mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis y degradación de los glucosinolatos mostraron una menor expresión después de 3 días de almacenamiento, pero esta tendencia se revirtió después de cinco días. De manera contraria, la irradiación de las cabezas con UV-C, permite mantener la calidad organoléptica del brócoli, pero no contribuye a mantener el contenido de glucosinolatos durante el almacenamiento. En cuanto al tratamiento térmico, las muestras tratadas mostraron un mayor contenido de glucosinolatos tanto alifáticos como indólicos, que no se vio correlacionado con los genes de biosíntesis de los glucosinolatos, pero sí se observó un aumento de la expresión de los genes de degradación en las muestras tratadas. El envasado de las cabezas de brócoli en atmósferas modificadas durante el almacenamiento poscosecha además de retrasar la senescencia y el desverdizado, permitió mantener un mayor contenido de

glucosinolatos después de cinco días de almacenamiento a 20 °C. Los valores de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de glucosinolatos fueron más altos en los tratados respecto a los controles.

En los distintos tipos de ensayos realizados se detectó un descenso importante en el contenido de glucosinolatos totales (particularmente en las muestras no tratadas) durante la senescencia poscosecha, y también un descenso de la expresión de los genes de biosíntesis y de degradación. Esta aparente falta de correlación nos llevó a realizar un estudio del metabolismo de glucosinolatos no solo en las inflorescencias sino también en los pedúnculos y el tallo principal durante el almacenamiento poscosecha. Se detectó una fuerte disminución en el contenido de glucosinolatos en las inflorescencias, pero se encontró un aumento de este contenido en los tallos. En conjunto, los análisis de expresión de genes que codifican biosíntesis, degradación y transporte sugieren que los glucosinolatos mayormente se transportarán desde las inflorescencias hasta los tallos durante la senescencia poscosecha.

“Empujemos los límites de la realidad  
hasta que lo imposible se vuelva  
posible, lo sorprendente cotidiano y lo  
mediocre intolerable... pero está visto  
que no hay desgracia sin gracia, ni cara  
que no tenga su contracara, ni  
desaliento que no busque su aliento”

*Eduardo Galeano – “La escuela del mundo del  
revés”, Patas para arriba*

<b>1. Introducción general</b>	<b>13</b>
1.1 EL BRÓCOLI	13
1.2 REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO	13
1.3 LA COSECHA	14
1.4 SENESCENCIA POSCOSECHA DE BRÓCOLI	15
1.5 VIDA ÚTIL O VIDA POSCOSECHA	16
1.6 MANEJOS POSCOSECHA	16
1.7 VALOR NUTRICIONAL	17
1.8 GLUCOSINOLATOS	19
1.8.1 Generalidades	19
1.8.2 Biosíntesis de los glucosinolatos	21
1.8.2.1 Biosíntesis de glucosinolatos alifáticos	21
1.8.2.2 Biosíntesis de glucosinolatos indólicos	23
1.8.3 Degradación de los glucosinolatos	24
1.8.4 Transporte de glucosinolatos	27
<b>2. Objetivos</b>	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>30</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL	30
3.2 ESTUDIO DE SENESCENCIA EN HOJAS Y EN LAS DISTINTAS SECCIONES DE CABEZAS DE BRÓCOLI	30
3.3 COSECHAS A DISTINTAS HORAS DEL DÍA	31
3.4 TRATAMIENTOS POSCOSECHA CON AGENTES QUÍMICOS	32
3.4.1 Tratamiento con reguladores hormonales (citoquininas y etileno)	32
3.4.2 Tratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP)	32
3.5 TRATAMIENTOS POSCOSECHA CON AGENTES FÍSICOS	33
3.5.1 Irradiación con luz visible continua de baja intensidad	33
3.5.2 Irradiación con UV-C	33
3.5.3 Tratamiento térmico	33
3.5.4 Envasado en atmósferas modificadas (EAM)	34
3.6 MEDIDA DEL COLOR SUPERFICIAL	34
3.7 CONTENIDO DE CLOROFILAS, CAROTENOIDES Y XANTÓFILAS	35
3.8 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES Y TOTALES	36
3.9 CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO	36
3.10 CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS	37

3.11	CONTENIDO DE FLAVONOIDES	37
3.12	EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	38
3.13	INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL	39
3.14	PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL	40
3.15	REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN	41
3.17	DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> PARA PCR EN TIEMPO REAL	42
3.18	PCR EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)	43
3.19	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS	44
3.19.1	Método 1	44
3.19.2	Método 2	45
3.20	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	46
<b>4.</b>	<b>Capítulo 1</b>	<b>47</b>
4.1	<i>Introducción general</i>	47
4.2	<i>Resultados y discusión</i>	48
4.3	<i>Conclusiones parciales</i>	64
<b>5.</b>	<b>Capítulo 2</b>	<b>66</b>
5.1	TRATAMIENTO POSCOSECHA CON REGULADORES HORMONALES (CITOQUININAS Y ETILENO)	66
5.1.1	Introducción general	66
5.1.2	Resultados y discusión	67
5.2	TRATAMIENTO POSCOSECHA CON 1-METILCICLOPROPENO (1-MCP)	75
5.2.1	Introducción general	75
5.2.2	Resultados y discusión	76
5.2.3	Conclusiones parciales	85
<b>6.</b>	<b>Capítulo 3</b>	<b>87</b>
6.1	TRATAMIENTO CON LUZ VISIBLE CONTINUA	87
6.1.1	Introducción general	87
6.1.2	Resultados y discusión	88
6.2	TRATAMIENTO CON RADIACIÓN UV-C	97
6.2.1	Introducción general	97
6.2.2	Resultados y discusión	98
6.2.3	Conclusiones parciales	106
6.3	TRATAMIENTO TÉRMICO	106
6.3.1	Introducción general	106
6.3.2	Resultados y discusión	107
6.4	TRATAMIENTO DE ENVASADO CON ATMÓSFERAS MODIFICADAS	115
6.4.1	Introducción general	115
6.4.2	Resultados y discusión	116

6.4.3 Conclusiones parciales	123
<b>7. Capítulo 4</b>	<b>125</b>
7.1 <i>Introducción general</i>	125
7.2 <i>Resultados y discusión</i>	126
7.3 <i>Conclusiones parciales</i>	135
<b>8. Conclusiones finales</b>	<b>137</b>
<b>9. Referencias Bibliográficas</b>	<b>140</b>

## 1. Introducción general

### 1.1 EL BRÓCOLI

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) es una hortaliza mundialmente consumida perteneciente a la familia *Brassicaceae*. Esta familia tiene una compleja taxonomía y sistemática, y se encuentra compuesta por 341 géneros y 3977 especies. Se distingue fácilmente de otras familias de plantas con flores por la presencia de una corola cruciforme (cuatro pétalos dispuestos en forma de cruz), seis estambres (los dos exteriores más cortos que los cuatro internos), una cápsula a menudo con un tabique y una savia acuosa picante (Franzke y col., 2011). El género *Brassica* es el que posee la mayor cantidad de especies dentro de esta gran familia; siendo algunas de las hortalizas más consumidas de la especie *Brassica oleracea* como el coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis*), los repollos (*B. oleracea* var. *capitata*), el repollito de bruselas (*B. oleracea* var. *gemmifera*), los nabos (*Brassica rapa* var. *rapa*), el kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), entre otras.

El género *Arabidopsis*, que se encuentra dentro de la gran familia *Brassicaceae*, presenta su genoma secuenciado y publicado desde el año 2000 (*The Arabidopsis Genome Initiative 2000*), confirmando una ventaja para el estudio de los genes en el género *Brassica*. Se ha informado una extensa sintenia entre los géneros *Arabidopsis* y *Brassica*, con una conservación nucleotídica en exones en el rango de 70-90% y menor del 70 % en intrones y regiones intergénicas (Ayele y col., 2005).

### 1.2 REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO

El cultivo de brócoli se inicia por almácigo y trasplante. Este cultivo tiene temperaturas óptimas que varían entre 16 a 21 °C. Dependiendo del cultivar, se puede iniciar en diferentes épocas del año ya que se dispone de variedades de polinización abierta e híbridos para todas las épocas del año (Del Pino, 2014). La planta y la pella no son muy sensibles a las heladas, pero sí a las altas temperaturas. La mejor producción del brócoli se lleva a cabo en suelos con pH óptimos entre la neutralidad o ligeramente ácidos (pH = 6,5 y 7,0). Es recomendable realizar la rotación de los suelos, volviendo a plantar el mismo cultivo cada 3 o 4 años.

### 1.3 LA COSECHA

Del brócoli se consume la cabeza floral, también llamada pella, cada una compuesta por un conjunto de yemas florales hipertrofiadas y ramificadas, junto a sus pedúnculos. A su vez, cada yema floral consiste, en una flor inmadura, cerrada dentro de los sépalos verdes (Page y col., 2001) (Figura 1.1). Las cabezas pueden alcanzar un tamaño entre 20 y 25 cm de diámetro dependiendo del cultivar.



**Figura 1.1:** Detalles de la cabeza floral de brócoli

La cosecha de esta hortaliza se realiza de forma manual y también de forma mecanizada, aunque la primera práctica es la más utilizada, en las primeras horas de la mañana. Se realiza con cuchillo sobre el pedúnculo que sostiene la pella principal con un tallo que varía entre 5 y 10 cm. Para fines comerciales, es recomendado que, al momento de la cosecha, el diámetro de la inflorescencia sea mayor a 10 cm, y la compacidad sea al menos 0,3 kg/dm dependiendo del cultivar cosechado (Namesny, 1993). Si las condiciones ambientales son favorables, se puede realizar una segunda cosecha del crecimiento secundario, producto de la pérdida de la dominancia apical de la cabeza principal (Stoppani y Francescangeli, 2000). El brócoli de elevado índice de calidad debe tener los floretes cerrados y de color verde oscuro brillante con una cabeza compacta, es decir firme a la presión de la mano, el tallo bien cortado y de la longitud requerida (una longitud total entre pella y tallo de 15 a 20 cm) y no debe estar presente ninguna flor amarilla (Cantwell y Kasmire, 2002).



## 1.4 SENESCENCIA POSCOSECHA DE BRÓCOLI

Con fines comerciales y para el mercado, las inflorescencias de brócoli son cosechadas cuando aún se encuentran en un estado de desarrollo, el corte desencadena un mecanismo de senescencia inducido por desprendimiento (King y Morris, 1994).

En las plantas, el término “senescencia” se utiliza para aludir al deterioro estructural y funcional que sufren muchos órganos en la fase terminal de su desarrollo (Noodén, 1988a). Es un proceso altamente complejo y programado genéticamente, que sucede de manera ordenada y regulada y que se puede desencadenar por señales tanto externas como internas. La senescencia involucra una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que da como resultado la redistribución de nutrientes hacia los órganos en crecimiento como frutos y semillas (Noodén, 1988a). Más recientemente se ha definido el comienzo de la senescencia al momento en que un tejido que anteriormente era un “destino” comienza a ser “fuente” dentro de la planta (Masclaux Daubresse y col., 2016).

El patrón de senescencia natural de las plantas no siempre puede ser aplicable a productos cosechados, sin embargo, sí pueden existir similitudes (Pogson y Morris, 2004). La vida de almacenamiento y la calidad comercial de los productos cosechados dependen de la velocidad en el que se lleven a cabo los procesos de senescencia.

Se ha observado, que aquellas hortalizas que contienen tejido inmaduro al momento de cosechar, es decir se encuentran en un crecimiento activo, senescen rápidamente debido al corte de suministro de agua, fitohormonas y nutrientes necesarios para la mantención de la homeostasis de los tejidos (Huber, 1987), como es el caso de brócoli. La senescencia poscosecha de este producto, es fácilmente observable, debido a que el efecto predominante es la pérdida de las clorofilas de los sépalos en las inflorescencias inmaduras, que comienza a observarse transcurridos 2 o 3 días a 20 °C a partir del momento de cosecha (Clarke y col., 1994) y está acompañado por la pérdida de color verde de las cabezas florales para comenzar a adquirir el color amarillo. Asimismo, se ha reportado la disminución en el contenido de proteínas, azúcares, ácido ascórbico y glucosinolatos, acompañado de una pérdida de agua y por lo tanto de turgencia de los tejidos en el almacenamiento poscosecha (Page y col., 2001).

## 1.5 VIDA ÚTIL O VIDA POSCOSECHA

El brócoli tiene una vida útil estimada de 3 a 4 semanas a una temperatura de almacenamiento de 0 °C y con una humedad relativa mayor al 95 % pero tan solo de tres a cuatro días cuando el almacenamiento se realiza a 20 °C (Wang, 1977). Las hortalizas que se encuentran dentro de la familia *Brassicaceae*, tienen un amplio rango de tasas de senescencia e intensidades respiratorias; las actividades respiratorias pueden variar desde moderadas como el caso del coliflor, hasta intensidades respiratorias muy altas como es el caso de brócoli, que alcanza valores entre 40 a 60 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (a 5 °C) y son comparables con hortalizas como espárragos, arvejas y el maíz dulce, que generan una vida de almacenamiento poscosecha muy corta. Sumado a esto, el brócoli tiene escasas reservas alimenticias, es decir un muy bajo contenido de hidratos de carbono que permitirían mantener al tejido activo en el período poscosecha. Ese es, un factor que contribuye a que la vida potencial útil sea más corta, respecto a otras hortalizas que cuentan con grandes cantidades de estas reservas como papas, batata, mandioca, entre otras.

Se ha reportado que la calidad poscosecha y la vida de almacenamiento del brócoli, varía considerablemente entre los diferentes cultivares, las prácticas de cultivo, y como se realice la fertilización nitrogenada (Kader,2002). Se ha encontrado hasta un 50% de diferencia en la duración de la vida útil dependiendo del cultivar utilizado, y se ha observado que cuanto mayor sea la fertilización con nitrógeno, menor es la vida útil de dicha hortaliza. El estadio de desarrollo de las inflorescencias al momento de cosechar también es un factor que influye en la posterior vida de almacenamiento (Tian y col., 1995). Otro factor para tener en cuenta es la longitud de tallo con el cuál se cosechan las cabezas, se ha reportado que la longitud del tallo afecta el contenido mineral y la calidad, mostrando que una longitud intermedia de tallo de 6 cm permite mantener una mejor vida poscosecha durante el almacenamiento (Guo y col., 2018).

## 1.6 MANEJOS POSCOSECHA

Como ya se conoce, hay una fuerte relación entre las tasas respiratorias y las tasas de senescencia. Conociendo que el brócoli tiene una alta tasa respiratoria, las prácticas de manejo más recomendadas, se basan en mantener la hortaliza recién

cosechada a bajas temperaturas y humedades relativas altas, con el fin de disminuir la tasa respiratoria y reducir la transpiración. El brócoli comercialmente aceptable no debe superar el 4% de pérdida de peso fresco para evitar el marchitamiento, y síntomas de senescencia en las inflorescencias de brócoli (Namesny,1996). El almacenamiento en frío disminuye el metabolismo respiratorio y así logra prolongar la vida útil de este producto, en la industria del brócoli, se sugieren tratamientos de prerrefrigeración por agua (hidroenfriamiento), o empaquetamiento con hielo directo sobre las cabezas, para lograr rápidamente disminuir la temperatura del campo, aunque también se recomienda la combinación de los dos tratamientos (Baron y col., 1996). El hidroenfriamiento y el enfriamiento con aire forzado también pueden usarse, pero el manejo de la temperatura durante la distribución es más crítico que el empaquetado con hielo (Cantwell y Kasmire, 2002).

Ha sido reportado el uso de diferentes tratamientos poscosecha en las cabezas de brócoli para la prolongación de la vida útil de esta hortaliza, que abarcan desde tratamientos físicos, como es el envasado en atmósferas modificadas (Makhlouf y col., 1989a; Makhlouf y col., 1989b ; Zhuang y col., 1994), tratamientos con calor (Funamoto y col., 2002, Costa y col., 2005b), irradiación con UV-C (Costa y col., 2006a) y UV-B (Aiama-or y col., 2009), y almacenamiento con luz visible continua de baja intensidad (Büchert y col., 2011a), así como tratamientos químicos con citoquininas sintéticas (Wang, 1977; Rushing, 1990; Downs y col., 1997) y 1-MCP (Ku y Wills, 1999).

## **1.7 VALOR NUTRICIONAL**

El brócoli es una hortaliza con un gran valor nutricional, ya que posee una gran cantidad de nutrientes y compuestos benéficos para la salud, con un rol potencial en la prevención de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. Como se puede ver en la tabla 1.1, el contenido en proteínas es alto para ser una hortaliza fresca, y además posee un alto contenido de antioxidantes, entre los que destacan el ácido ascórbico, carotenoides, fenoles y flavonoides (Fernández-León y col., 2013, Raseetha y col., 2013, Duarte-Sierra y col., 2017). Es rico en fibras y minerales, aporta vitamina C, A, E y K, ácido fólico. En el caso del brócoli una apariencia verde es un buen indicador de su valor nutricional (Kader, 2002).

**Tabla 1.1:** Aporte nutricional cada 100 g de brócoli. Fuente: FoodData Central - USDA  
<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/747447/nutrients>

Energía	30 kcal	<b>Vitaminas</b>	
Agua	90 g	Vitamina C	91,3 mg
Proteína	2,57 g	Vitamina A	8 µg
Carbohidratos	6,27 g	Vitamina E	0,15 mg
Nitrógeno	0,41 g	Vitamina K	102 µg
<b>Minerales</b>			
Ca	46 mg	Folato	65 µg
Fe	0,69 mg	β-carotenos	93 µg
Mg	21 mg	<b>Lípidos</b>	
P	67 mg	Total saturados	0,039 g
K	303 mg	Total monoinsaturados	0,011 g
Na	36 mg	Total poliinsaturados	0,017 g

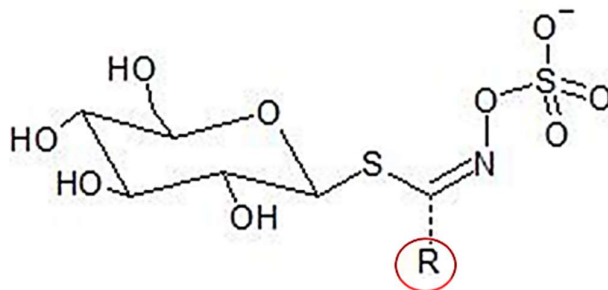
Desde 1993, el consumo mundial de brócoli ha aumentado alrededor de un 120% (Food and Agricultural Organization of the United Nations [FAOSTAT], <http://faostat.fao.org/>) y en nuestro país se ha visto un fuerte aumento del consumo en las últimas décadas, por su comercialización en el mercado fresco y por su incursión en la exportación como producto congelado (Mukherjee y col., 2008). Una de las razones de este consumo creciente, ha sido la difusión en los medios de comunicación de las cualidades nutritivas y de las propiedades anticancerígenas para atraer un segmento de consumidores que manifiestan una preocupación creciente por la salud. El brócoli, posee un gran contenido de glucosinolatos, cuyos productos de degradación tienen efectos benéficos para la salud humana. Uno de los casos más estudiados, es el del sulforafano, un isotiocianato derivado del glucosinolato glucorafanina, del cual se ha informado que puede prevenir el crecimiento tumoral mediante el bloqueo del ciclo celular y la promoción de la apoptosis. Por otra parte, el sulforafano muestra potencialidad para el tratamiento contra la gastritis y el cáncer de estómago (Halkier y Gershenzon, 2006). También se ha reportado que este isotiocianato tiene la capacidad de atenuar el estrés oxidativo, mediante la activación de un factor de transcripción (Nrf2), uno de los principales mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo (Xue y col., 2015).

## 1.8 GLUCOSINOLATOS

### 1.8.1 Generalidades

Los glucosinolatos (GLS) son compuestos pertenecientes al metabolismo secundario que representan un sistema de defensa contra la herbivoría descritos casi de manera exclusiva en el orden *Capparales*, el cual incluye 15 familias, entre ellas la familia *Brassicaceae* (Rodman, 1991).

Los primeros glucosinolatos se descubrieron en el SXIX, mediante el aislamiento de la sinigrina de la mostaza negra (*Brassica nigra*) y la sinalbina de mostaza blanca (*Sinapsis alba*). En 1956, se propone una estructura general de los glucosinolatos, confirmada por síntesis y cristalografía de rayos X. Como se muestra en la figura 1.2, los glucosinolatos constan de una estructura general que consiste en una  $\beta$ -D-glucopiranososa unida mediante un átomo de azufre a un ester Z-N-hidroxiaminosulfato y una cadena R que varía dependiendo de la estructura del aminoácido precursor y las modificaciones secundarias (Halkier y Gershenzon, 2006). Dependiendo de la estructura del aminoácido precursor, los glucosinolatos se clasifican en tres grupos: alifáticos (se derivan principalmente de metionina, pero también de alanina, valina, leucina, isoleucina), indólicos (triptófano) y aromáticos (fenilalanina o tirosina) (Fahey y col., 2001). En brócoli los glucosinolatos mayoritarios son los alifáticos y los indólicos.

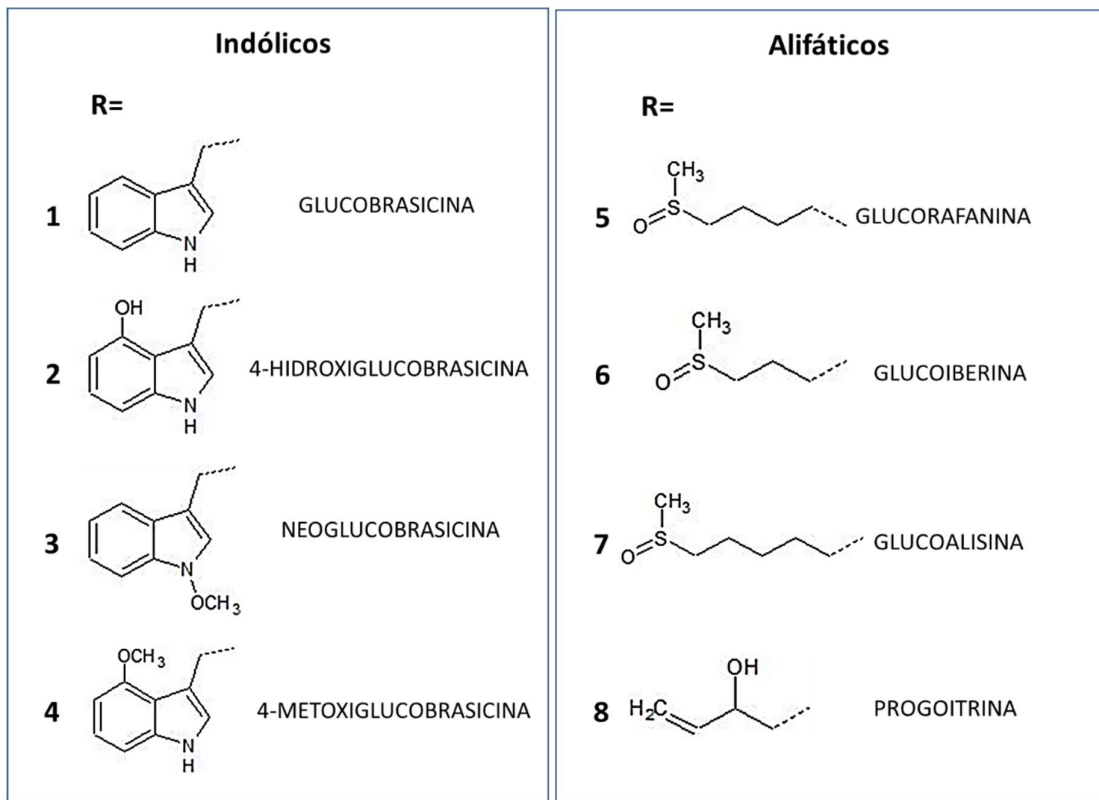


**Figura 1.2:** Estructura general de un glucosinolato. La cadena R es variable y depende del aminoácido precursor

Más de 130 tipos de glucosinolatos individuales han sido identificados en plantas, de los cuáles más de 30 son encontrados en la familia *Brassicaceae* (Fahey y col., 2001; Blažević y col., 2020). El perfil de glucosinolatos puede variar de acuerdo

con el cultivar estudiado, algunas variedades pueden presentar grandes cantidades de glucorafanina, mientras que otras pueden mostrar grandes contenidos de glucosinolatos indólicos, como glucobrasicina o neoglucobrasicina (Ávila y col., 2013; Ku y col., 2013). Una descripción de esta gran variabilidad fue hecha por Wang y col. (2012) quien analizó 143 líneas de brócoli y encontró variaciones en la concentración de glucosinolatos individuales. Los cambios dinámicos en el contenido de glucosinolatos en los diferentes tejidos dependen de la regulación de los procesos de biosíntesis, degradación y movilización de estos compuestos de defensa, y la capacidad de los tejidos de síntesis *de novo* de los glucosinolatos.

En la figura 1.3, se muestran los grupos R de los glucosinolatos alifáticos e indólicos identificados y analizados a lo largo de la presente tesis:



**Figura 1.3:** Cadenas laterales R de los glucosinolatos identificados y cuantificados a lo largo de la presente tesis

Indólicos: **1.** Glucobrasicina **2.** 4-hidroxiglucobrasicina **3.** Neoglucobrasicina **4.** 4-metoxiglucobrasicina  
Alifáticos: **5.** Glucorafanina **6.** Glucoiberina **7.** Glucoalisisina **8.** Progoitrina

### 1.8.2 Biosíntesis de los glucosinolatos

La vía biosintética comprende diversas etapas, que podrían ser clasificadas en tres: la primera consiste en la elongación de las cadenas laterales de los aminoácidos, en el caso de que el aminoácido precursor sea metionina o fenilalanina (Prieto y col., 2019). La segunda etapa es la formación de la estructura básica del glucosinolato, que incluye la descarboxilación oxidativa del aminoácido a su correspondiente aldoxima y la conversión de la oxima en la estructura básica del glucosinolato. Finalmente, ocurren las modificaciones secundarias que dan lugar a la gran variedad de glucosinolatos que se conocen, como pueden ser la hidroxilación, metoxilación, oxidación, desaturación o benzoilación, principalmente en sus cadenas laterales (Chen y Andreasson, 2001; Halkier y Gershenzon, 2006; Grubb y Abel, 2006; Blažević y col., 2020).

La biosíntesis ocurre principalmente en el citosol celular, con algunas reacciones que involucran los cloroplastos. Un grupo de factores de transcripción (FT) llamados MYB, es un subgrupo de la familia R2R3 MYB que tienen un motivo característico '[L/F]LN[K/R]VA' (Stracke y col., 2001) y participan en la regulación de las vías de biosíntesis de los glucosinolatos. Se ha reportado que los factores de transcripción MYB34, MYB51 y MYB122 son los principales en la vía de biosíntesis de GLS indólicos mientras que MYB28, MYB29 y MYB79 son los centrales en la regulación de la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos.

#### 1.8.2.1 Biosíntesis de glucosinolatos alifáticos

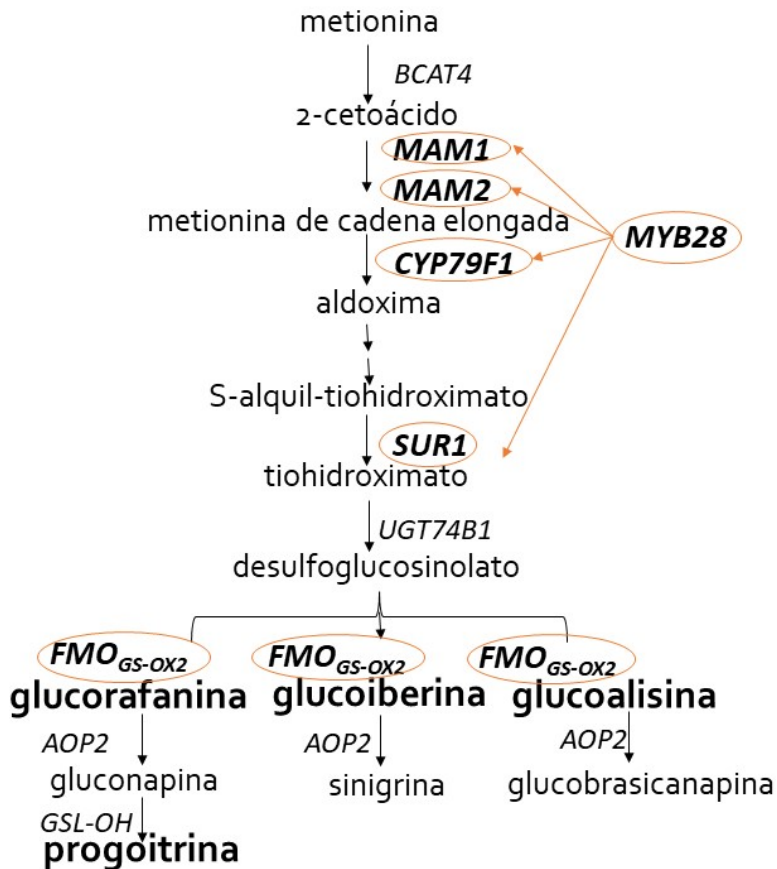
Dentro de la primera etapa, la etapa de elongación, cuando el aminoácido precursor es la metionina, están involucrados los genes MAM (metiltioalkilmalato sintasa), BASS, y BCATs (Sawada y col., 2009; Textor y col., 2007). La enzima MAM1 es capaz de catalizar las reacciones de condensación en los tres primeros ciclos de elongación de la metionina mientras que MAM2 solo la primera (Sønderby y col., 2010).

En la segunda fase, están involucrados los genes *CYP79F1*, *CYP83A1* y *UGT74B1* que son los responsables de la formación de desulfoglucosinolatos que posteriormente se convierten en los glucosinolatos alifáticos mediante la enzima sulfotransferasa, ST5<sub>b</sub> (Wittstock y Halkier, 2002). Inicialmente, se producen las

descarboxilaciones oxidativas por la familia de citocromos P450. Los aminoácidos son convertidos en aldoximas por la familia de citocromos p450, específicamente CYP79F1 convierte los derivados de metionina de cadena alargada en aldoximas. S-alquiltiohidroximatos son convertidos en tiohidroximatos por la enzima liasa SUR1.

Finalmente, en la etapa de las modificaciones secundarias, FMO<sub>GS-OX1</sub> cataliza la conversión de glucoerucina en glucoerufanina, mientras que AOP<sub>2</sub> es responsable de la conversión de glucoerufanina en gluconapina (Zang y col., 2009) (Figura 1.4).

MYB28 es un factor de transcripción central involucrado en la vía de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos y se ha reportado que modula positivamente la expresión de los genes *BoMAM1*, *BoMAM2*, *BoCYP79F1*, *BoSUR1* y *BoFMO<sub>GS-OX2</sub>* (Mitreiter y Gigolashvili, 2020).



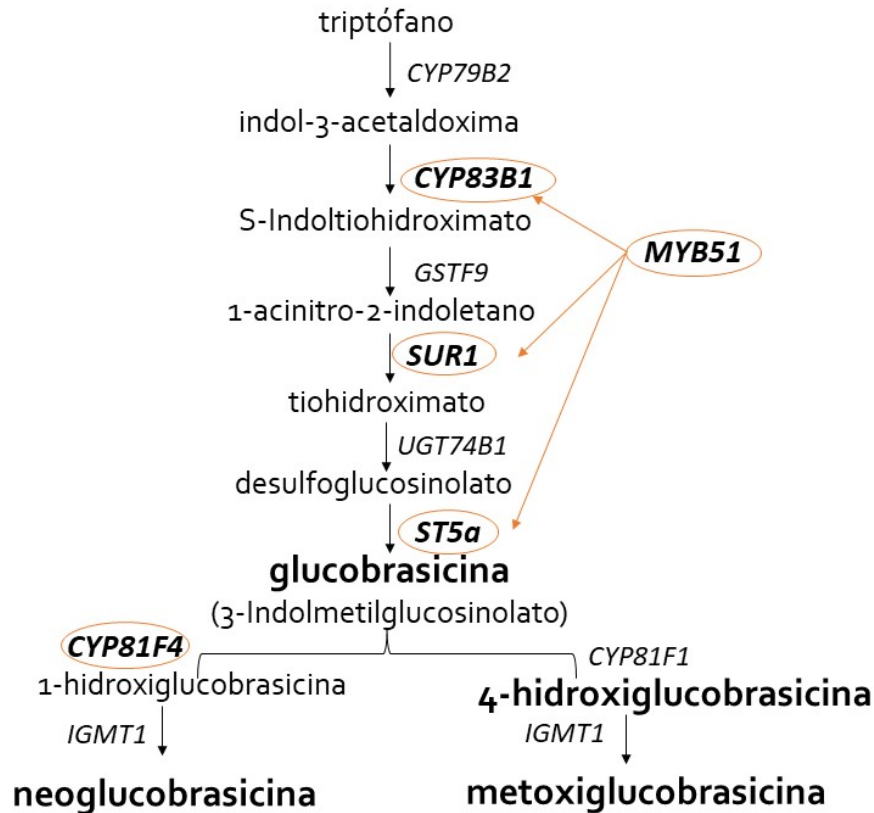
**Figura 1.4:** Ruta biosintética de glucosinolatos alifáticos

Englobados en naranja se encuentran los genes estudiados a lo largo de la presente tesis y en letra negra se encuentran remarcados aquellos glucosinolatos individuales identificados y cuantificados



### 1.8.2.2 Biosíntesis de glucosinolatos indólicos

La ruta de biosíntesis de glucosinolatos indólicos comienza cuando el triptófano es convertido en indol-3-acetaldoxima por los genes *CYP79B2/B3*, y el indol-3-acetaldoxima es convertido en indol-3-acetonitrilo en una reacción catalizada por la enzima CYP83B1 (Xu y col., 2018). Una serie de genes incluidos *GSTF*, *SUR1*, *UGT74B1*, y *ST5a* están involucrados en la subsecuente parte de la vía en la formación de la estructura núcleo 3-indolmetilglucosinolato (glucobrasicina), siendo la enzima sulfotransferasa *ST5a* la que está involucrada en la última reacción del desulfoglucosinolato a la estructura del glucosinolato. Las modificaciones secundarias están a cargo de las enzimas CYP81F y IGMT, las cuales CYP81F1 catalizan la conversión de la glucobrasicina en 4-hidroxiglucobrasicina y CYP81F4 en el pasaje de glucobrasicina a 1-hidroxiglucobrasicina (Figura 1.5) (Frerigmann y Gigolashvili, 2014). MYB51 es uno de los principales factores de transcripción que regula la vía de biosíntesis de glucosinolatos indólicos y se ha descrito que modula positivamente los genes *BoCYP83B1*, *BoSUR1*, *BoST5a* y *BoCYP81F4*.



**Figura 1.5:** Ruta biosintética de glucosinatos indólicos

Englobados en naranja se encuentran los genes estudiados a lo largo de la presente tesis y en letra negra se encuentran remarcados aquellos glucosinatos individuales identificados y cuantificados

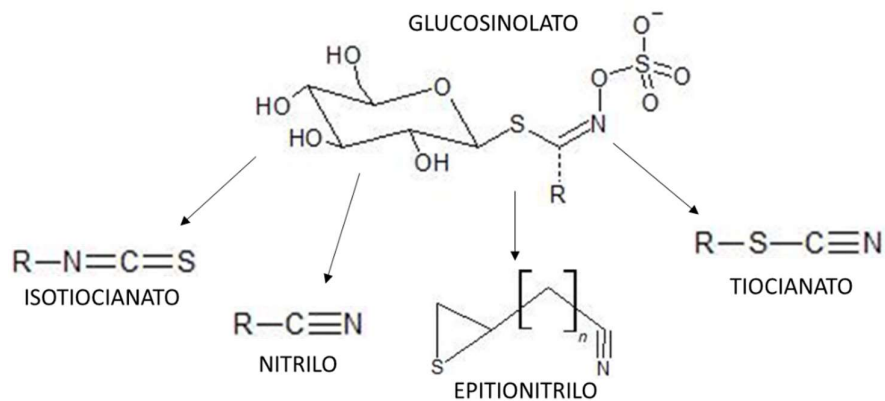
### 1.8.3 Degradación de los glucosinatos

La mirosinasa pertenece a una familia de enzimas con actividad glucósido hidrolasa responsable de la hidrólisis de los glucosinatos. La enzima tiene varias isoformas que se expresan diferencialmente dependiendo del estadio de desarrollo y de la localización tisular. Se ha reportado que la actividad mirosinasa es más alta en semillas y estados de desarrollo temprano, ya que los glucosinatos indólicos son degradados para formar ácido indolacético, una fitohormona esencial para el crecimiento (Bones y Rossiter, 1996). La enzima debe estar separada de sus sustratos, y localizada en un compartimiento subcelular diferente o en células diferentes, dependiendo de la especie vegetal (Prieto y col., 2019). Se ha reportado que la enzima mirosinasa se localiza en las vacuolas de unas estructuras especiales denominadas células mirosinasas o idioblastos mientras que los glucosinatos se

encuentran en las vacuolas de todas las células (Chen y col., 2001; Jones y col., 2006). Los idioblastos son células individuales que difieren notablemente de sus vecinas en cuanto a tamaño, estructura y contenido. La morfología de estas células varía en diferentes órganos, tejidos y estadios de desarrollo.

Cuando se produce la descompartimentalización debido a la lesión provocada por un insecto o a un daño mecánico, los glucosinolatos se ponen en contacto con la mirosinasa y son rápidamente hidrolizados por acción de la enzima, la cual remueve el azúcar presente en estos compuestos, dando como resultado isotiocianatos, tiocianatos, epitionitros, nitrilos, cianidas orgánicas e ión tiocianato que resultan altamente tóxicos para muchos insectos herbívoros (Fahey y col., 2001).

El producto de la reacción catalizada por la enzima mirosinasa dependerá especialmente de la cadena lateral del sustrato (cadena R), el pH, la presencia de proteínas modificadoras epitioespecificadoras y, en el caso de los glucosinolatos indólicos, de la disponibilidad de iones  $Fe^{+2}$ . El producto mayoritario a pH fisiológico (pH neutro) son los isotiocianatos, mientras que a pH más ácidos y en presencia de la proteína ESP, se forman nitrilos (Cartea Gonzalez y col., 2008). Si hay un doble enlace terminal en la cadena lateral, el átomo de azufre es capturado por el doble enlace, llevando a la formación de epitionitros (Figura 1.6).



**Figura 1.6:** Estructura de los posibles productos de degradación de glucosinolatos después de la hidrólisis por la enzima mirosinasa. R, representa la cadena lateral variable.

Imágen adaptada de Halkier y Gershenzon, 2006

Durante la poscosecha y el procesamiento, la actividad de la mirosinasa es influenciada por algunos factores intrínsecos y extrínsecos como el pH, la temperatura

y la presión a la que se encuentre expuesta (Ludikhuyze y col., 2000). Está caracterizado que la máxima actividad de esta enzima es a pH 6,5 y a una temperatura óptima de 37 °C (BRENDA: [www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)). La mirosinasa es una enzima relativamente termolábil, sin embargo, se sabe que las enzimas mirosinasas en vegetales de la familia *Brassicaceae* varían su estabilidad térmica dependiendo de la especie, mostrando un máximo de inactivación, que es a la temperatura de 60 °C en el caso de brócoli (Matusheski y col., 2004).

Como se mencionó anteriormente, hay otras proteínas que están involucradas en el sistema de degradación de los glucosinolatos. En *Brassica* han sido reportados dos proteínas modificadoras: proteína epitioespecificadora (ESP) y la proteína modificadora epitioespecificadora (ESM1). Cuando estas proteínas no están presentes, los productos mayoritarios son los isotionatos; pero en presencia de la proteína ESP se dirige la descomposición del aglicón inestable hacia la formación de nitrilos en el caso de los alquilglucosinolatos mientras que para los alquenilglucosinolatos que contienen un doble enlace terminal se producen epitioitrilos como se mencionó previamente (Burow y col., 2009). La proteína ESM1 dirige la descomposición hacia la producción de isotiocianato, posiblemente interfiriendo con ESP (Wittstock y Burow, 2007). Esta capacidad de redireccionar los productos de degradación de glucosinolatos tóxicos como los isotiocianatos, hacia nitrilos (no tóxicos), utilizando la proteína nitrilo especificadora (ESP), ha sido observado en muchos de los herbívoros, como la familia de mariposas *Pieridae* que se alimentan de *Brassicaceas*, como una habilidad evolutiva de detoxificar esta defensa química. Por lo tanto, una mayor proporción de isotiocianatos fue obtenida en el procesamiento de crucíferas cuando la proteína ESP fue inactiva, pero se mantuvo la actividad mirosinasa (Van Eylen y col., 2007). Asimismo, no todos los glucosinolatos pueden ser sustratos de estas proteínas y no todos los miembros de la familia *Brassicaceae* poseen esta proteína (Bones y Rossiter, 1996).

La enzima mirosinasa no solo está presente en crucíferas, sino que ha sido reportada en hongos, bacterias y microorganismos relacionados con la microflora intestinal de los mamíferos (Angelino y Jeffery, 2014). La mayoría de los isotiocianatos absorbidos por los mamíferos del material vegetal ingerido se forman por la mirosinasa presente en las bacterias del tracto gastrointestinal. Como se mencionó anteriormente, se ha estudiado la acción de los isotiocianatos para inhibir la mitosis y estimular la apoptosis de células tumorales (Sønderby y col., 2010).

#### 1.8.4 Transporte de glucosinolatos

Los glucosinolatos se encuentran en todos los órganos de las crucíferas, pero como se comentó previamente, la capacidad biosintética varía entre los tejidos y en las diferentes etapas, y se conoce que disminuye a medida que madura el tejido, aunque también se ha descrito que la reducción de los glucosinolatos podría ser debido a la degradación y translocación de estos compuestos (Clossais y Larher, 1991).

La distribución de compuestos de defensa en las plantas está estrechamente regulado y presenta un alto grado de especificidad. Es importante destacar que los glucosinolatos y desulfoglucosinolatos poseen propiedades fisicoquímicas que les permiten la carga y el transporte por el floema (Brudenell y col., 1999), junto con los fotoasimilados que se dirigen desde la fuente al sumidero. El transporte por el floema de glucosinolatos puede ayudar a la planta a defenderse contra los organismos que se alimentan de floema y también adquirir la capacidad para coordinar la síntesis y el uso de los recursos de protección entre los distintos órganos (Chen y col., 2001). Los compuestos de defensa se pueden distribuir entre los diferentes órganos coordinando la síntesis y el uso de los recursos de protección (Egevang Jørgensen y col., 2015), además de ayudar a la planta a defenderse contra organismos que se alimentan del floema.

Se demostró que hay un transporte específico para los glucosinolatos, tratándose de un transporte activo dependiente del gradiente de protones a través de la membrana plasmática, es decir un simportador glucosinato/ $H^+$  (Nour-Eldin y col., 2012). En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado los transportadores AtGTR1 y AtGTR2 pertenecientes a la gran familia de transportadores NRT/PTR, una gran familia ampliamente difundida en el reino vegetal.

## 2. Objetivos

Durante mucho tiempo, el objetivo central del desarrollo de las tecnologías y tratamientos poscosecha en brócoli y otras hortalizas, ha sido lograr un retraso en el desarrollo de la senescencia, poniendo especial énfasis en la preservación de la calidad sensorial-visual del producto cosechado. Sin embargo, más recientemente, y en vista a las cualidades nutricionales y nutraceuticas de las hortalizas del género *Brassica* se comenzó a tener en cuenta el efecto de estos tratamientos sobre la calidad nutricional. En consecuencia, se plantea la siguiente hipótesis y los siguientes objetivos: general y específicos.

### HIPÓTESIS

Los tratamientos poscosecha utilizados para la extensión de la vida útil en brócoli, afectan el metabolismo de glucosinolatos y por lo tanto el valor nutricional de esta hortaliza.

#### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar metodologías de precosecha o poscosecha que contribuyan a aumentar o mantener el contenido de glucosinolatos durante la poscosecha de cabezas de brócoli; y contribuir al conocimiento a escala bioquímica y fisiológica del metabolismo de los mismos.

#### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto de diferentes tratamientos poscosecha en inflorescencias de brócoli y del momento de cosecha sobre el contenido de glucosinolatos alifáticos e indólicos.
- Analizar el efecto de distintos reguladores de crecimiento durante la poscosecha de inflorescencias de brócoli sobre el contenido de glucosinolatos alifáticos e indólicos.

- Caracterizar la expresión de genes asociados al metabolismo de glucosinolatos en los distintos tratamientos poscosecha, hormonales y momento de cosecha realizados sobre las cabezas de brócoli.
- Correlacionar la expresión de dichos genes con los contenidos de glucosinolatos totales y particulares.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Para llevar a cabo todas las experiencias que se presentan a continuación, se cosecharon cabezas de brócoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) con la colaboración de un productor local del cinturón hortícola platense (34° 59' 40. 1" S 58° 00' 13.3" W). Luego de la cosecha, las cabezas de brócoli se trasladaron inmediatamente al laboratorio, donde se acondicionaron y se seleccionaron aquellas cabezas que no presentaran daños visibles y que además presentaron uniformidad en color, tamaño, forma y estadio de desarrollo (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Cosecha, traslado y acondicionamiento de las cabezas de brócoli para realizar los posteriores tratamientos

#### 3.2 ESTUDIO DE SENESCENCIA EN HOJAS Y EN LAS DISTINTAS SECCIONES DE CABEZAS DE BRÓCOLI

Se realizó la cosecha de 15 hojas y de 15 cabezas de brócoli con la misma longitud de tallo de modo de realizar el estudio de la senescencia en las distintas partes del órgano cosechado. Las cabezas fueron colocadas en vasos plásticos y las hojas en bandejas y se almacenaron a 20 °C durante 5 días en oscuridad. En el día 0 (día de cosecha) y día 5 de almacenamiento, las cabezas fueron separadas en tres secciones diferentes, tal como se muestra en la figura 3.2: inflorescencias (sección 1, S1), los tallos pequeños (sección 2, S2) y el tallo principal (sección 3, S3). Las



secciones y las hojas fueron cortadas en nitrógeno líquido y luego congeladas a -20 °C para los análisis posteriores.



**Figura 3.2:** Distintas secciones de la planta de brócoli. Hoja, y la cabeza floral seccionada:  
S1: inflorescencias, S2: tallos pequeños y S3: tallo principal.

### 3.3 COSECHAS A DISTINTAS HORAS DEL DÍA

Se cosecharon cabezas de brócoli en tres diferentes momentos del día: 8 h, 13 h y 18 h. Inmediatamente después de la cosecha, las muestras se trasladaron al laboratorio para realizar el acondicionamiento. Las cabezas fueron colocadas en vasos plásticos y almacenadas a 20 °C en oscuridad durante 5 días.

Tanto para el día de cosecha (día 0), como para el día 3 y día 5 de almacenamiento poscosecha, se tomaron cinco cabezas de brócoli en cada uno de los horarios en el que había sido realizada su cosecha. Las inflorescencias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C para las determinaciones posteriores.

### 3.4 TRATAMIENTOS POSCOSECHA CON AGENTES QUÍMICOS

#### 3.4.1 *Tratamiento con reguladores hormonales (citoquininas y etileno)*

Se realizaron tratamientos hormonales por inmersión de las cabezas de brócoli durante 10 min en soluciones conteniendo con 100 ppm 6- bencilaminopurina (6-BAP, una citoquinina sintética) con DMSO 0,1% v/v, 100 ppm ácido 2-cloroetilfosfónico (etefón, un agente liberador de etileno) con DMSO 0,1% v/v y una solución de DMSO 0,1% v/v para el grupo control. Luego del tratamiento las muestras se almacenaron a 20 °C en oscuridad durante 5 días.

Al día 0 y día 3 y 5 de almacenamiento poscosecha, se determinó el color superficial de las cabezas correspondientes a los tres grupos y las inflorescencias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C para las determinaciones posteriores.

#### 3.4.2 *Tratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP)*

Para llevar a cabo el tratamiento poscosecha con 1-metilciclopropeno (1-MCP) las cabezas se ubicaron en vasos plásticos y se almacenaron en un contenedor hermético con una concentración de 1  $\mu\text{l l}^{-1}$  de 1-MCP durante 16 h a 20 °C. Los controles se almacenaron en las mismas condiciones, pero en ausencia de 1-MCP. Luego del tratamiento las muestras se almacenaron a 20 °C en oscuridad durante 5 días.

Al día 0 y día 3 y 5 de almacenamiento poscosecha, se determinó el color superficial de las cabezas correspondientes a los dos grupos y las inflorescencias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C para las determinaciones posteriores.

### **3.5 TRATAMIENTOS POSCOSECHA CON AGENTES FÍSICOS**

#### *3.5.1 Irradiación con luz visible continua de baja intensidad*

Para el tratamiento con luz visible, 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: un grupo control y un grupo a irradiar. Una mitad de la cabina se mantuvo a completa oscuridad ( $< 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) donde se colocaron las cabezas de brócoli pertenecientes al grupo control, mientras que la otra mitad fue expuesta a luz continua, donde se colocaron aquellas cabezas a tratar. Se utilizaron tubos fluorescentes de luz blanca de 40 w con una intensidad de  $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Ambos grupos se mantuvieron a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante cinco días.

Al día 0 y día 3 y 5 de almacenamiento poscosecha, se determinó el color superficial de las cabezas correspondientes a los dos grupos y las inflorescencias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para las determinaciones posteriores.

#### *3.5.2 Irradiación con UV-C*

Para el tratamiento con luz UV-C, las cabezas se colocaron en vasos plásticos de modo que queden orientadas en posición vertical, y luego fueron irradiadas con 4 lámparas UV-C (TUV G30T8, 30W, Philips) a una distancia de 30 cm, hasta alcanzar una dosis de  $10 \text{ KJ m}^{-2}$ , medido con un radiómetro digital (Cole-Palmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA). Un grupo de igual número de cabezas no se irradió, el cual se utilizó como grupo control. Ambos grupos se almacenaron a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , en oscuridad durante cinco días.

Al día 0 y día 3 y 5 de almacenamiento poscosecha, se determinó el color superficial de las cabezas correspondientes a los dos grupos y las inflorescencias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para las determinaciones posteriores.

#### *3.5.3 Tratamiento térmico*

Para realizar el tratamiento térmico, las cabezas de brócoli se colocaron en vasos plásticos y se incubaron en estufa a 42 °C durante 3 h. Durante este tiempo, los controles se dejaron a temperatura ambiente. Finalmente, ambos grupos se almacenaron a 20 °C y en oscuridad durante 5 días. Al día 0 y día 3 y 5 de almacenamiento poscosecha, se determinó el color superficial de las cabezas correspondientes a los dos grupos y las inflorescencias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C para las determinaciones posteriores.

#### *3.5.4 Envasado en atmósferas modificadas (EAM)*

Para el envasado en atmósferas modificadas, las cabezas de brócoli se colocaron individualmente en bandejas plásticas, se cubrieron con bolsas de polietileno de baja densidad (40 µm de espesor, 20 cm x 30 cm) con una permeabilidad al oxígeno entre 8,500-15,000 mL O<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup> y una permeabilidad al dióxido de carbono entre 22,000- 26,000 mL CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup> y se termosellaron herméticamente con un cierre en doble mordaza, para la generación la atmósfera de equilibrio deseada. Como controles, se utilizaron cabezas de brócoli cubiertas con un film PVC para prevenir la deshidratación. Ambos grupos se almacenaron a 20 °C, en oscuridad durante 5 días.

Al día 0 y día 3 y 5 de almacenamiento poscosecha, se determinó el color superficial de las cabezas correspondientes a los dos grupos y las inflorescencias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C para las determinaciones posteriores.

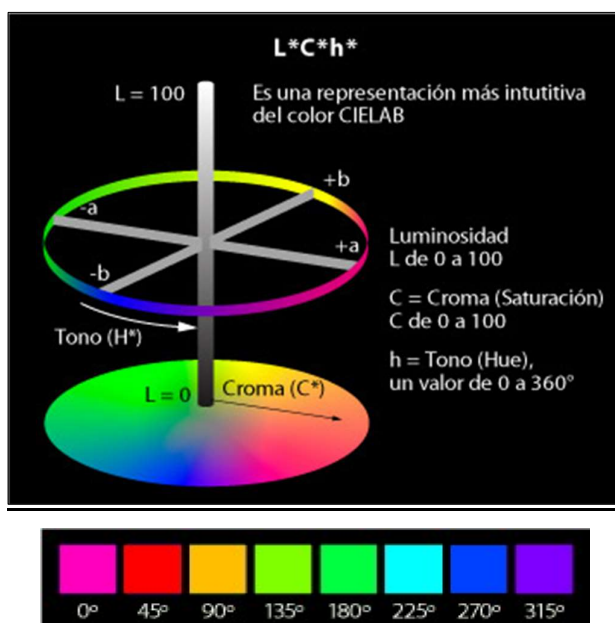
### **3.6 MEDIDA DEL COLOR SUPERFICIAL**

Para la determinación del color superficial en las cabezas de brócoli se utilizó un colorímetro (Minolta CR-400, Osaka, Japón), y se tomaron medidas en cinco posiciones de cada cabeza: un punto central y cuatro medidas realizadas periféricamente.

Tal como se puede observar en la figura 3.3, con el uso de este equipo se obtienen 3 parámetros de un espacio de color llamado CIELAB: 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.

Para evaluar la pérdida de color verde en las cabezas de brócoli, se utilizó el ángulo HUE ( $h^\circ$ ), calculado de la siguiente manera:  $HUE = \tan^{-1} (-(b/a))$  cuando  $a$  y  $b > 0$  o  $HUE = 180^\circ + \tan^{-1} (b/a)$  cuando  $a < 0$  y  $b > 0$ .



**Figura 3.3:** Representación esquemática de los parámetros de color, utilizados en el modelo CIE LAB (Commission Internationale d'Eclairage).

Ángulo de Tono (HUE) varía de  $0^\circ$  a  $360^\circ$ ; Saturación ( $C^*$ , chroma) de 0 a 100 y Luminosidad ( $L^*$ ) de 0 a 100.

### 3.7 CONTENIDO DE CLOROFILAS, CAROTENOIDES Y XANTÓFILAS

El contenido de clorofilas, carotenoides y xantófilas se determinó de acuerdo con el protocolo descrito en Lichtenthaler (1987). Para ello, se pulverizó el tejido previamente congelado con nitrógeno líquido en mortero. Se pesaron 100 mg del pulverizado y se resuspendieron en 1 mL de acetona 100% (relación 1:10 v/v). Los tubos se homogeneizaron con la ayuda de vórtex y se agitaron suavemente durante 4 horas en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron durante 10 min a  $10000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  y se recuperaron los sobrenadantes en tubos nuevos. Se tomaron alícuotas de los mismos y se midieron las absorbancias a tres longitudes de onda: 661,6 nm, 644,8 nm y 470 nm.

Para calcular el contenido de clorofila a, b y total, carotenoides y xantófilas, se efectuaron los siguientes cálculos expresados como  $\mu\text{g} / \text{mL}$ :

Clorofila a:  $(11,24 * A_{661,6}) - (2,04 * A_{644,8})$

Clorofila b:  $(20,13 * A_{644,8}) - (4,19 * A_{661,6})$

Clorofila total:  $(7,05 * A_{661,6}) + (18,09 * A_{644,8})$

Carotenoides + Xantófilas:  $((1000 * A_{470}) - (1,9 * \text{clorofila A}) - (63,14 * \text{clorofila B})) / 214$

Todas las medidas se realizaron por quintuplicado, y el contenido de los pigmentos se expresaron como mg por gramo de tejido fresco.

### **3.8 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES Y TOTALES**

Para el caso de proteínas solubles, las muestras de brócoli congeladas se pulverizaron en nitrógeno líquido y 500 mg de los pulverizados obtenidos se mezclaron con 5 mL de una solución buffer (50 mM Tris-HCl, 0.4 mL L<sup>-1</sup>  $\beta$ -mercaptoetanol y 2 mM ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], pH= 7,5). La mezcla se centrifugó a 10000  $\times g$  durante 10 min a 4 °C y el contenido de proteínas solubles se determinó en el sobrenadante usando el método de Bradford (1976) y albúmina sérica como estándar.

En el caso de determinación del contenido de proteínas totales, se utilizaron 300 mg del pulverizado, homogeneizado con 10 mL de una solución 0.1 mM NaOH y 10 g L<sup>-1</sup> de dodecil sulfato sódico [SDS] y la mezcla se llevó a 100 °C durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 10000  $\times g$  durante 40 min a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Con el fin de precipitar proteínas, a la mezcla se le adicionó 5 volúmenes de acetona y se incubó a 20 °C durante 12 h. Pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron a 13000  $\times g$  durante 10 min a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de una solución 0,1 mM NaOH y 10 g L<sup>-1</sup> SDS y el contenido proteico se midió con el método de Lowry (1951) usando albúmina sérica bovina como estándar. Todas las medidas se realizaron por triplicado y los contenidos se informaron como gramo de proteína soluble o total por kg de peso fresco.

### **3.9 CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO**

La extracción del ácido ascórbico (AA) y su forma oxidada S- dehidroascorbato (DHA) fue realizada a partir de tejido congelado en nitrógeno líquido de las

inflorescencias de brócoli. Aproximadamente 200 mg del tejido fue procesado con 1 mL de ácido trifluoroacético 3 % v/v en mortero en frío. Los homogenatos fueron colocados en tubos eppendorf y centrifugados a 16.000 x *g* durante 10 min a 4 °c. Se guardaron los sobrenadantes en frío hasta ser utilizados para la determinación. Las muestras fueron eluidas en columnas C18. El contenido de AA se cuantificó en un equipo HPLC con bomba LC-10 AT a un flujo de elución de 0,5 mL min<sup>-1</sup> con un buffer fosfato de potasio 100 mM (pH= 3,0) usando un detector UV-VIS a una longitud de onda de 265 nm.

Para la determinación del AA total, 1 volumen de 100 mM buffer fosfato (pH= 7,0) fue mezclado con 1 volumen del sobrenadante e incubado durante 10 min en presencia de 5 mM DL-ditiotreitol [DTT] y luego se midió como se describió anteriormente.

La diferencia entre el AA total y el AA permitió determinar la cantidad de DHA en la muestra. El contenido de AA fue expresado en mmol gr<sup>-1</sup> de peso fresco. El estado redox del ácido ascórbico fue calculado de la siguiente manera: % DHA = [(DHA content) / (AA content + DHA content)] x 100. L-ácido ascórbico fue utilizado como standard (A-7506 Sigma-Aldrich®) (Bartoli y col., 2006).

### **3.10 CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

Para la determinación del contenido de fenoles totales, se homogeneizaron 200 mg de tejido congelado y triturado con 1 ml de etanol absoluto durante 5 min con vórtex. Luego, se centrifugó a 9000 x *g* durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se utilizó para la medida espectrofotométrica mediante el método Folin-Ciocalteau según Costa y col. (2006) con algunas modificaciones. A 50 µL del extracto etanólico se le añadieron 450 µL de agua destilada y 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteau (1:1 en agua destilada). Luego de 3 min, a la mezcla de reacción se le adicionó 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% p/v, y se incubó en oscuridad durante 1 hora. Se determinó la absorbancia a 760 nm y se estimó el contenido total de compuestos fenólicos utilizando ácido gálico como estándar. Este procedimiento se realizó por triplicado, tanto biológico como técnico y los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico/ 100g de tejido fresco.

### **3.11 CONTENIDO DE FLAVONOIDES**

La determinación del contenido total de flavonoides se realizó mediante un método colorimétrico adaptado del protocolo descrito en Zhishen y col. (1999) utilizando los mismos extractos etanólicos que se usaron en la determinación del contenido de compuestos fenólicos. Se realizó una mezcla de reacción conteniendo 200  $\mu\text{L}$  del extracto, 510  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  5% p/v. Luego de 5 min, se añadieron 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  10% p/v, se homogeneizó la mezcla y se incubó por otros 5 min. Finalmente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1M, se homogeneizaron nuevamente las muestras y se realizó la determinación de absorbancia a 515 nm. Para la estimación del contenido de flavonoides se construyó una curva de calibración utilizando catequina como estándar. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de equivalente de catequina por gramo de tejido fresco. Este procedimiento se realizó por triplicado, tanto biológico como técnico.

### **3.12 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL**

El ARN total de las muestras de brócoli, se obtuvo utilizando el método del borato caliente (Wan y Wilkins, 1994) adaptado y modificado, como se detalla a continuación. Previamente, todo el material y las soluciones a utilizar a lo largo de todo el protocolo se esterilizaron luego de haber sido tratadas con dietil pirocarbonato [DEPC] a una concentración final de 0,1% v/v en agitación durante toda la noche, con el objetivo de inhibir la actividad de posibles ARNasas.

Para comenzar, se trituraron 200 mg de tejido congelado con nitrógeno líquido, y se mezclaron con 1 mL de *buffer XT* (Borax 0,2 M, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 30 mM, dodecilsulfato sódico [SDS] 1% p/v y deoxicolato de sodio 1% p/v, DTT 10 mM, NP-40 1% v/v, PVP-40 2% p/v), precalentado a 80 °C. Se homogeneizaron los tubos con la ayuda de vórtex.

Los homogenatos resultantes se incubaron con 15  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K (20 mg/ml) a 42 °C con agitación suave durante 90 min. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{KCl}$  2 M a cada tubo y se incubaron en frío durante 1 hora. Se centrifugaron los tubos a 12000 x g durante 20 min a 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes y se les adicionó  $\text{LiCl}$  8 M (un tercio del volumen total de sobrenadante recuperado). Las muestras se almacenaron a 4 °C durante toda la noche.

Luego de dicha incubación, se centrifugaron los tubos a 12000 x g durante 20 min a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados obtenidos, se lavaron



con 400 µl de LiCl 2 M. Se centrifugó nuevamente a 12000 x g durante 10 min a 4 °C y nuevamente, se descartaron los sobrenadantes. Este procedimiento, se repitió hasta que no se observó coloración en los precipitados.

Los precipitados se resuspendieron en 150 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) a temperatura ambiente. Se centrifugaron 10 min a 12000 x g. Se recuperaron los sobrenadantes y se les agregó 15 µl KAc 2 M (pH 5,5). Luego, se incubaron en hielo durante 15 min y se llevaron a centrifugar 10 min a 12000 x g a 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes y se precipitaron los ARN con 375 µl de etanol absoluto frío (2,5 volúmenes del volumen de sobrenadante). Posteriormente, se precipitaron a -80 °C durante 2,5 h. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10000 x g durante 30 min a 4 °C. Se descartaron los sobrenadantes y se lavaron los ARN con 500 µl de etanol 70% frío. Se centrifugaron a 10000 x g 5 min a 4 °C. Se descartaron los sobrenadantes y se eliminaron los residuos de etanol de los precipitados obtenidos con secado al vacío. Luego, se resuspendieron los precipitados en 100 µl de agua DEPC, a los cuáles se le agregaron 10 µl (1/10 volúmenes) de NaAc 3M (pH 6,0) y 250 µl de etanol 100% frío. Se almacenaron durante toda la noche a -20 °C. Luego de esa incubación, se centrifugaron las muestras a 16000 x g 20 min a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los precipitados se lavaron utilizando 200 µl de etanol 70% frío. Se repitió el paso de la centrifugación y el descarte de los sobrenadantes. Para finalizar, se secaron las muestras al vacío. Finalmente, los precipitados obtenidos, se resuspendieron con 25 µl de agua DEPC y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso.

### **3.13 INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL**

Para constatar la integridad de los ARN obtenidos, las muestras de ARN total fueron visualizadas directamente en geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes: agarosa 1% p/v, formaldehído 1% v/v y buffer MOPS (MOPS 200 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0) con el fin de observar bandas discretas y definidas, correspondientes a las subunidades mayor y menor de los ARN ribosomales.

Para la preparación de las muestras, las mismas se desnaturalizaron durante 10 min en una mezcla que contenía buffer MOPS, formamida 50% v/v, formaldehído 20% v/v

y bromuro de etidio  $0,3 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . Las muestras se incubaron a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 min y se agregó  $2 \mu\text{L}$  del colorante de frente de corrida Orange G.

Finalmente, se realizó una separación de las bandas a voltaje constante (70 V durante 40 min) en buffer de corrida MOPS y se visualizaron las mismas con un transiluminador UV y adquisidor de imágenes.

Las soluciones de ARN obtenidas se cuantificaron utilizando un lector de microplacas (CLARIOstar, BMG LABTECH) y las concentraciones de los ARN se determinaron utilizando el siguiente cálculo:

$$\text{Concentración ARN (ng/}\mu\text{l)} = (A_{260} \times 40 \times \text{dil}^{-1})$$

Donde dil, es la dilución de los ARN en agua DEPC, en este caso se utilizaron diluciones 1:5 v/v.

Las interferencias de contaminantes pueden estimarse calculando un cociente de absorbancias. Dado que las proteínas absorben a 280 nm, y los polisacáridos a 230 nm, se emplea el cociente  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ , para estimar la pureza del ARN total. Un ARN total puro presenta una relación  $A_{260}/A_{280}$  aproximada entre 1,8 y 2, y una relación  $A_{260}/A_{230}$  cercana a 2,3.

### **3.14 PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL**

Para purificar el ARN obtenido, de una posible contaminación con ADN genómico durante el proceso de extracción del ARN, se procedió con el siguiente protocolo. Por cada  $\mu\text{g}$  de ARN a purificar, se utilizó 1 unidad enzimática de Q1 ADNasa ( $1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ) y se llevaron las soluciones a un volumen final de  $10 \mu\text{L}$  con el agregado de agua Milli-Q. Las muestras se incubaron a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min. Terminada la incubación, en cada tubo, se agregaron  $90 \mu\text{L}$  de agua Milli-Q y  $100 \mu\text{L}$  de una mezcla de cloroformo-octanol (24:1 v/v). Se centrifugaron los tubos durante 10 min a  $12000 \times g$  y se recuperaron las fases acuosas. En los nuevos tubos, se agregaron  $200 \mu\text{L}$  de etanol absoluto frío y  $20 \mu\text{L}$  de NaAc 3 M (pH 6,0). Los ARN se precipitaron durante 1 h a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pasado este tiempo, se centrifugaron 20 min a  $12000 \text{ g}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados se lavaron con  $200 \mu\text{L}$  de etanol 70% y se centrifugaron y descartaron los sobrenadantes nuevamente, finalmente se secaron las muestras al vacío. Se resuspendieron los precipitados obtenidos en  $15 \mu\text{L}$  de agua Milli-Q tratada previamente con DEPC 0,1 % v/v. Se determinó la concentración y se corroboró la integridad de los ARN

purificados como se describió previamente en el apartado 3.13 y se almacenan los tubos a -80 °C hasta su uso.

### 3.15 REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN

Se utilizaron 2 µg de las muestras de ARN previamente purificadas para la obtención del ADN complementario (ADNc) utilizando la enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase).

Los 2 µg de ARN previamente purificados, se completaron con el volumen necesario de agua Milli-Q, hasta un volumen final de 18,55 µL. Estas soluciones fueron calentadas durante 10 min a 70 °C, colocadas en hielo durante 5 min y finalmente se dejaron 10 min a temperatura ambiente. En cada uno de los tubos se dispensaron, 6,45 µL de una mix de reacción que contiene por tubo 5 µl de buffer de reacción 5x (adjunto con la M-MLV), 0,3 µl de dNTPs (10 mM), 0,15 µl de solución de Random Primers (2 µg/µl) y 1 µl de enzima M-MLV. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 90 min, y luego a 95 °C durante 5 min, para la inactivación de la retrotranscriptasa.

### 3.16 PCR A TIEMPO FINAL

Para chequear el correcto funcionamiento de la reacción de retrotranscripción, se llevó a cabo una PCR a tiempo final utilizando 0,5 µl del molde obtenido y 19,5 µl de la siguiente mezcla de reacción tal como se muestra en la siguiente tabla, hasta alcanzar un volumen final de 20 µl.

Reactivo	Vol (µl)	Cf
Buffer 10x	2	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2	1,5 mM
Fw BoAct (10 µM)	1	0,5 µM
Rv BoAct (10 µM)	1	0,5 µM
dNTPs (10mM)	0,4	0,2 mM
TAQ Pegasus (5 U/ µl)	0,2	0,04 U/ul
H <sub>2</sub> O	13,7	c.s.p 20

El programa de ciclado constó de una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C como etapa inicial de desnaturalización, 30 ciclos de 15 seg a 92 °C, 25 seg a 60 °C y 30 seg 72 °C, y una etapa de elongación final de 5 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados por PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en buffer TBE en presencia de bromuro de etidio.

### **3.17 DISEÑO DE *PRIMERS* PARA PCR EN TIEMPO REAL**

Se diseñaron *primers* para la amplificación mediante PCR en tiempo real de genes que codifican enzimas involucradas en las vías de biosíntesis, degradación y transporte de glucosinolatos indólicos y alifáticos. Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó la base de datos de *Brassica Oleracea* BRAD <http://brassicadb.org/brad/> y la información y diferentes herramientas que brinda la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y el programa Beacon Designer v7.21. Se realizó una PCR a punto final utilizando como molde ADN complementario de *Brassica oleracea* con todos los *primers* diseñados para constatar la obtención de un único producto de amplificación y con el tamaño deseado. En la tabla 3.2, se muestran las secuencias de los *primers* forward y reverse diseñados para todos los genes estudiados a lo largo de la tesis, el tamaño del amplicón, expresado en pares de bases (pb) y el número de acceso a la secuencia del gen de las bases de datos que se utilizó para el diseño.

**Tabla 3.2:** Listado de los primers Forward (Fw) y Reverse (Rv) diseñados para las reacciones de PCR a tiempo final y PCR en tiempo real.

<b>Indólicos</b>				
<b>Gen</b>	<b>Fw primer</b>	<b>Rv primer</b>	<b>pb</b>	<b>Nro. acceso</b>
<b>CYP83B1</b>	ACTATCGTGAGATGAGGAAG	TCGTTATACCGCTTACCAA	214	GU584125
<b>ST5a</b>	TTGATCTCTGGTCCTTT	GTGAAGTAGCTCTGAATGTTT	151	XM_013766107
<b>CYP81F4</b>	GAGTTTTGAGAAGAAAGTGAAAG	AAAGAGAGCAAGTGATTAACC	120	XM_013759036
<b>MYB51</b>	TGACATCAAAGAGGAGAGT	TGAGTGTTCCAGGAGTTCTT	144	Bol013207
<b>Alifáticos</b>				
<b>Gen</b>	<b>Fw primer</b>	<b>Rv primer</b>	<b>pb</b>	<b>Nro. acceso</b>
<b>MAM1</b>	GACAAGTCGAAGTAACAATCA	GAACATACAAGCCAGTATATTCT	183	KP295465
<b>MAM 2</b>	TGTCTGTGTACCACTTGTA	CTAGTTTGGCAGGTTGATTT	112	XM_009138817
<b>CYP79F1</b>	CTGAATTGCGTTTCGTGTCGTTTG	ACGGACAAGAGAAGAGGCTTAGC	193	GU385846
<b>FMO<sub>GS-ox2</sub></b>	CTTCTTCCTTCTTATTTCCCA	CAACCCTTACATTCAGCTTTA	126	Bol010993
<b>MYB28</b>	TTGTGTCGGAGAAGGGCTGAA	CCAACGCAGTCTACAACCTTTT	154	GQ478992
<b>Alifáticos/Indólicos</b>				
<b>Gen</b>	<b>Fw primer</b>	<b>Rv primer</b>	<b>pb</b>	<b>Nro. acceso</b>
<b>SUR1</b>	GGATAACTATCGGAGTGGAA	TCTGTATCTGTCTTCTTGGTAT	94	Bol038767
<b>Degradación</b>				
<b>Gen</b>	<b>Fw primer</b>	<b>Rv primer</b>	<b>pb</b>	<b>Nro. acceso</b>
<b>Myr</b>	ACTGACCAAGCCAGCAGAGATG	AGCCGACTACCCACAATTTCCC	122	EU004075
<b>ESP</b>	ATCAAGGTCGAGCAGAAA	GATGGAATGTTGGGAGTTAA	117	DQ059298
<b>Normalizador</b>				
<b>Gen</b>	<b>Fw primer</b>	<b>Rv primer</b>	<b>pb</b>	<b>Nro. acceso</b>
<b>Act</b>	CCAGAGGTCTTGTCCAGCCATC	GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAG	137	AF044573

### 3.18 PCR EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Se realizaron reacciones de comparación relativa de PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando SYBR Green I como método de detección, un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied biosystems) y el kit FastStart Universal SYBR Green Master (Roche). Se siguieron las condiciones propuestas por

el fabricante del kit, mezclando 5  $\mu\text{L}$  de Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  ADNc molde, el volumen de primers para alcanzar la concentración final en la amplificación de cada gen en particular y agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Como se mostró en la Tabla 3.2, se utilizó el gen de actina de *Brassica oleracea* como gen normalizador. El programa térmico utilizado para todos los ensayos fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, y 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y de 1 min a 60 °C. Al final de cada programa se agregó el siguiente perfil térmico para obtener una curva de disociación (curva de melting) con el fin de evaluar que el producto de amplificación haya sido único: 95 °C por 1 min; 55 °C por 30 seg; 95 °C por 30 seg. En cada medida de RT-qPCR cada muestra de ADNc se colocó por triplicado y cada medida se realizó al menos por triplicado y se incluyeron controles negativos sin molde.

### **3.19 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS**

#### **3.19.1 Método 1**

La extracción y el análisis de los glucosinolatos fue llevado a cabo con el protocolo descrito en Ramos y col. (2011). Se pesaron 25 mg de tejido liofilizado y se homogeneizaron con 1,4 mL de metanol 80 %v/v, precalentado a 75 °C. Las mezclas se dejaron 15 min en baño húmedo a 80 °C y se centrifugaron a 12000 x g durante 12 min dos veces. Se transfirieron 800  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes obtenidos, a columnas DEAE Sephadex A-25, las cuales se trataron con 140  $\mu\text{L}$  de la enzima sulfatasa (15 U, Sigma), incubándose durante toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Los desulfoglucosinolatos se eluyeron de las columnas con 200  $\mu\text{L}$  de metanol 80 %v/v seguido con 200  $\mu\text{L}$  de agua. Los eluatos fueron combinados, secados al vacío y finalmente, se les adicionó 600  $\mu\text{L}$  de agua. Las muestras se analizaron en un equipo Acquity UPLC (Waters) usando una columna HSS T3 (1,8  $\mu\text{m}$ , 100 mm  $\times$  2,1 mm) y eluidas con una fase móvil compuesta por agua y acetonitrilo 100 % a un flujo constante de 0,65 mL/min durante 6 min. Las concentraciones de los glucosinolatos individuales fueron calculados en base a las áreas de los picos obtenidos y una curva de calibración construida con sinigrina comercial (Sigma-Aldrich). Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{mol}$  por gramo de peso seco y se midieron tres réplicas por muestra.

La identificación de los glucosinolatos individuales se realizó con un sistema de masas LC-MS/MS en un equipo Acquity UPLC acoplado a un espectrómetro de masas Xevo G2 QTof con una fuente LockSpray (Waters Corp., Milford, MA, USA). Los desulfoglucosinolatos fueron separados en una columna HSS T3 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  100 mm, Waters) y luego detectados mediante un detector de matriz de fotodiodos (PDA) a 229 nm y el Xevo G2 QTof con una fuente de iones estándar. El Xevo G2 QTof se operó en modo de adquisición dependiente de datos (DDA) de iones positivos. Los datos de MS y MS / MS se corrigieron en masa de bloqueo usando la masa monoisotópica en  $m / z$  566,2771 Da del ión de carga única de leucina encefalina. La identificación de los glucosinolatos individuales se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos (Mellon y col., 2002; Zimmermann y col., 2007). Cada desulfoglucosinolato se identificó sobre la base de las masas de iones precursores protonados (M + H)<sup>+</sup> y sus iones de fragmentos específicos de grupo, incluido el ión con la pérdida de un grupo de azúcar (M + H - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sup>+</sup> y el metal observado (aductos de iones: (M + Na)<sup>+</sup> y (M + K)<sup>+</sup>)

### 3.19.2 Método 2

La extracción y el análisis de los glucosinolatos se realizó de acuerdo a Cargnel y col. (2014) y Darré y col. (2017). Se pesaron 15 mg de tejido liofilizado y se mezclaron con 1,2 mL de una mezcla metanol/agua (70:30 v/v) que contenía 0,125  $\mu\text{mol}$  de sinigrina (Sigma-Aldrich) como estándar interno. Las muestras fueron incubadas durante 5 min a 70 °C y se centrifugaron a 13600  $\times g$  durante 2 min. Nuevamente, se agregaron dos alícuotas más de la mezcla metanol/agua (70:30 v/v) para repetir el paso de extracción y se juntaron los sobrenadantes obtenidos. Después de centrifugar, los sobrenadantes se transfirieron a columnas rellenas con 400  $\mu\text{L}$  (75 mg) de DEAE-Sephadex A-25 (GEHealthcare), previamente equilibradas con 600  $\mu\text{L}$  de metanol/agua (70:30 v/v) y 600  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ. Las columnas cargadas se lavaron nuevamente con 600  $\mu\text{L}$  de metanol/agua (70:30 v/v) y 600  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ y se incubaron toda la noche con 25  $\mu\text{L}$  de una solución sulfatasa (Sigma-Aldrich), como se describe en Graser y col. (2001), resuspendida en 600  $\mu\text{L}$  de buffer acetato 0,02 M (pH 5,2) para desulfatar los glucosinolatos que fueron retenidos en la columna. Después de la incubación con la enzima, los desulfoglucosinolatos fueron eluidos con

600  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ. Los desulfoglucosinolatos fueron analizados por HPLC (Knauer Euroline) en una columna C18 Restek Pinnacle ( $5.0 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 150 \text{ mm}$ ) con agua MilliQ (solvente A) y una solución de acetonitrilo/agua 80:20 v/v (solvente B), y se eluyeron con un gradiente de B al 1% a los 0 min, B al 10% a los 10 min, B al 75% a los 22-24 min, con un tiempo de equilibrio de 10 min y una velocidad de flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . El volumen de inyección fue de  $20 \mu\text{l}$  y la elución se controló con un detector de matriz de diodos a 229 nm. Los principales glucosinolatos alifáticos e indólicos se identificaron de acuerdo con sus tiempos de retención relativos y espectros UV. Para calcular las concentraciones molares de glucosinolatos individuales, se utilizaron factores de respuesta relativa (Brown y col., 2003) para corregir la diferencia de absorbancia entre el estándar interno y otros compuestos.

### **3.20 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Los experimentos se planearon según un diseño factorial, siendo los factores el tratamiento correspondiente y el tiempo de almacenamiento. Para todos los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) usando el programa STATISTICA (Statsoft). Los gráficos o tablas muestran las comparaciones de medias entre diferentes tratamientos a un mismo tiempo de almacenamiento. No se muestran las comparaciones entre medias de un mismo tratamiento a diferentes tiempos, por una cuestión de simplicidad. En los casos que se mencionan estos cambios durante el almacenamiento en el texto, se debe inferir que son diferencias significativas.

En el caso del análisis de los resultados de la cosecha a diferentes horarios (Sección 4: Capítulo 1), y el tratamiento poscosecha con reguladores hormonales (Sección 5: Capítulo 2, 5.1.2) en los cuales se compararon tres medias, se realizó una prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95 % ( $p \leq 0,05$ ).

Para todos los demás resultados presentados, donde se comparó un control y un tratamiento, se analizó mediante una prueba de Dunnett con un nivel de confianza de 95 % ( $p \leq 0,05$ ) indicado con \* y del 99 % ( $p \leq 0,01$ ) indicado con \*\*.



## 4. Capítulo 1

### ***Análisis del metabolismo de glucosinolatos durante el almacenamiento poscosecha en cabezas de brócoli cosechadas en distintas horas del día***

#### *4.1 Introducción general*

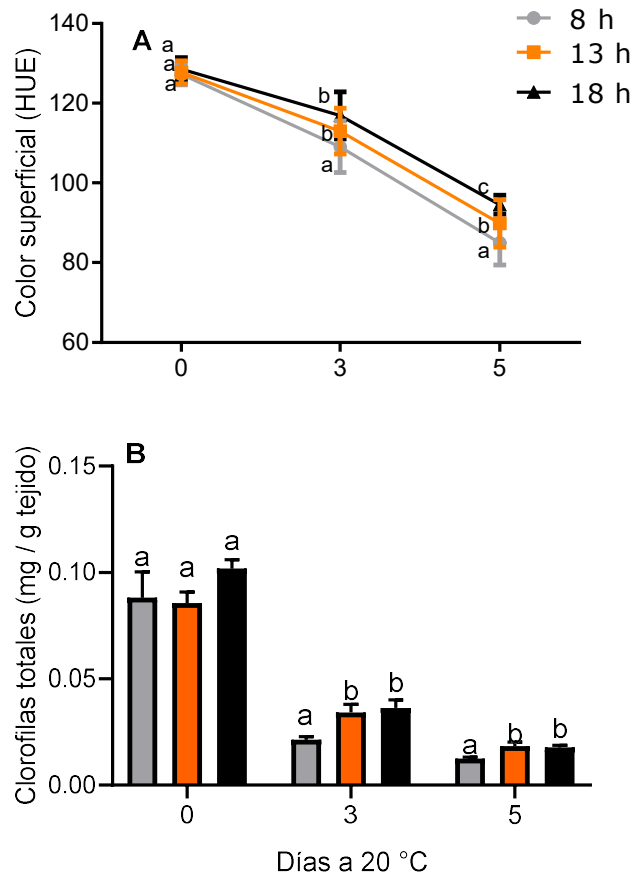
La vida poscosecha de las frutas y hortalizas también puede ser influenciada por factores precosecha, tales como condiciones del suelo, del clima, de la fertilización y manejos de cultivo, así como la estación del año en la que se realiza la cosecha. Otro factor posible y que puede ser relevante, es el momento del día en que se realiza la cosecha. El ciclo diurno de muchas plantas puede influir en varios procesos fisiológicos y metabólicos de las mismas (Bläsing y col., 2005), por ejemplo, la producción de especies reactivas de oxígeno puede ser regulada por ciclos diurnos (Lai y col., 2012). Se ha reportado que hojas de rúcula (*Eruca vesicaria* ssp. *sativa*), lechuga Lollo Rosso (*Lactuca sativa* L. "Ravita") y acelga roja (*Beta vulgaris* L. var. *flavescens*) han mostrado un aumento en la duración del almacenamiento poscosecha cuando se cosecha al final del día (10 p.m) en comparación con las hojas que se cosechan al comienzo del día (10 a.m) (Clarkson y col., 2005). Asimismo, Garrido y col. (2015) informaron que las hojas de espinacas baby mínimamente procesadas cosechadas en primavera a las 8 a.m, muestran un mayor contenido de agua de la hoja, mayor coloración, menor tasa de respiración y mejor calidad visual después del almacenamiento, en comparación con las hojas cosechadas al final del día (18 h).

En un trabajo anterior de nuestro grupo, se determinó que cosechar a diferentes horas del día puede afectar la tasa de senescencia durante el almacenamiento poscosecha (Hasperué y col., 2011), sin la necesidad de usar productos químicos o tecnologías que requieran costos económicos. Se demostraron

los beneficios de cosechar brócoli hacia el final del día, ya que esta práctica permite una tasa de senescencia y pérdida del color verde más lenta durante el almacenamiento poscosecha (Hasperué y col., 2011; Hasperué y col., 2013).

#### *4.2 Resultados y discusión*

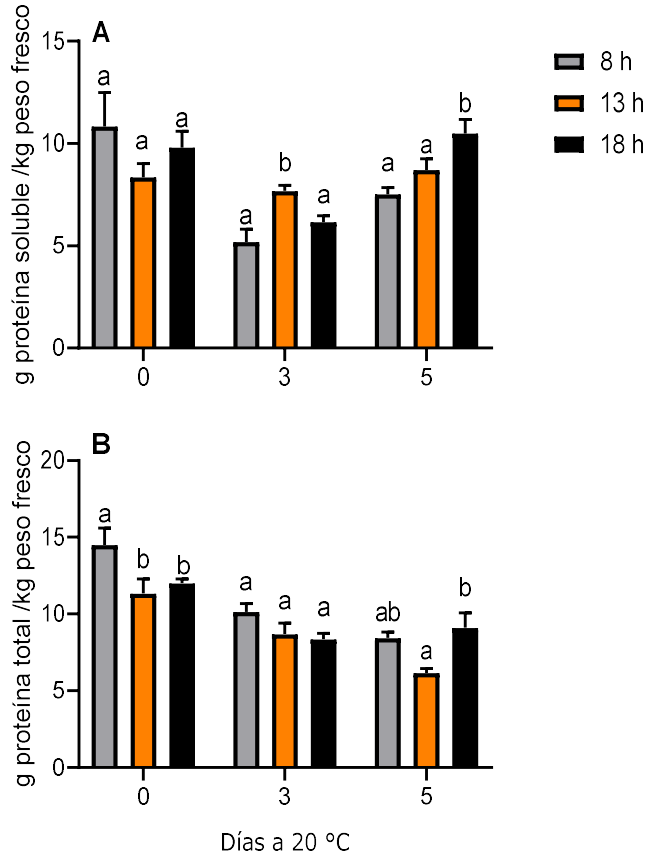
La calidad visual de las cabezas de brócoli se evaluó midiendo el color superficial y el contenido de clorofilas totales. Al momento de la cosecha, todas las muestras mostraron valores similares de HUE y de contenido de clorofilas totales (Figura 4.1). Durante el almacenamiento, las muestras perdieron su color verde y comenzaron a tornarse amarillas, pero estos cambios fueron más pronunciados en las muestras recolectadas a las 8:00 h. Las muestras recolectadas a las 18:00 h mostraron una menor disminución de HUE, lo que indica un menor amarillamiento con respecto a las muestras recolectadas en los otros horarios. Además, las muestras obtenidas a las 13:00 h y 18:00 h mostraron una menor degradación de la clorofila a los tres días de almacenamiento en relación con las obtenidas a las 8:00 h. Sin embargo, después de cinco días, las muestras obtenidas por la tarde fueron las que mostraron mayores valores de HUE.



**Figura 4.1:** **A.** Color superficial (ángulo HUE) y **B.** Contenido de clorofilas totales (mg clorofilas totales/ g tejido fresco) en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

Además de la pérdida de color verde y la degradación de la clorofila, la fisiología poscosecha del brócoli se caracteriza por una pérdida de proteínas (Page y col., 2001). Numerosos artículos describen un aumento en la actividad de las proteasas durante la senescencia del brócoli y una disminución en el contenido total de proteínas (Wang y col., 2004). Se encontró una disminución en el contenido de proteínas totales durante la senescencia sin diferencias entre el tiempo de cosecha (Figura 4.2, B). Sin embargo, las proteínas solubles mostraron un ligero aumento después de cinco días de almacenamiento (Figura 4.2, A), lo cual se puede explicar por la pérdida de integridad y funcionalidad de las membranas en una etapa avanzada de la senescencia que puede conducir a la solubilización de proteínas ancladas a la membrana lo que resulta en un aumento en el contenido de proteínas solubles (Dangl

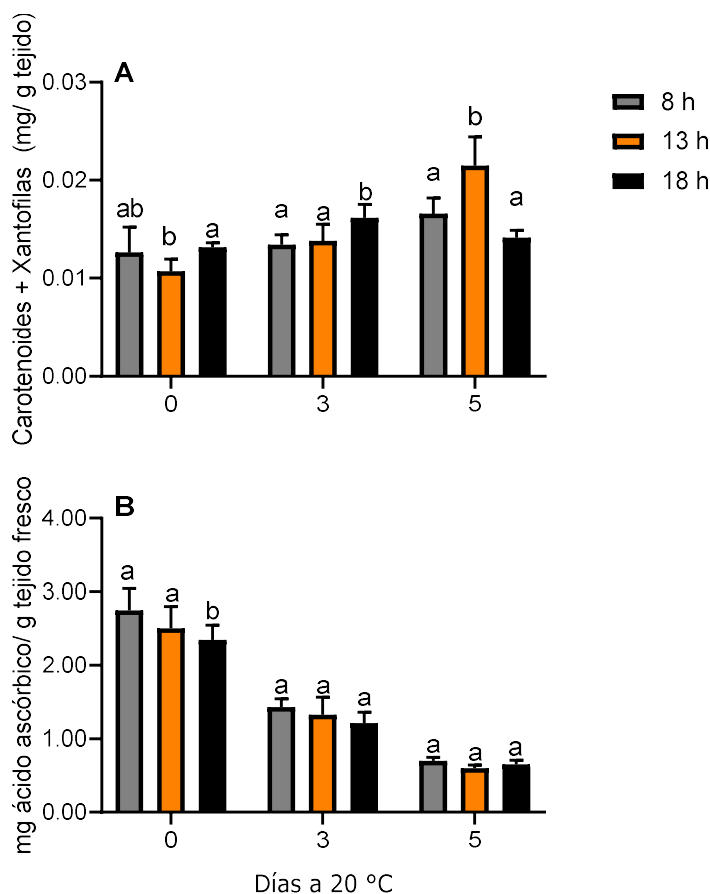
y col., 2000). De todas maneras, no se detectaron cambios importantes en el metabolismo de las proteínas en las muestras recolectadas en diferentes momentos del día o durante la senescencia.



**Figura 4.2:** **A.** Contenido de proteínas solubles (g proteínas/ kg peso fresco) y **B.** Contenido de proteínas totales (g proteínas totales/ kg peso fresco) en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

Se detectó un incremento en el contenido de carotenoides, fenoles y flavonoides durante el almacenamiento en muestras recolectadas a las 18:00 h hacia el día 3 y en las muestras recolectadas a las 13:00 h hacia el día 5. Los carotenoides actúan como antioxidantes solubles en lípidos, ya que protegen las membranas celulares eliminando o apagando los radicales libres. El contenido de carotenoides y xantófilas mostró un leve incremento en las muestras recolectadas a las 18:00 h en relación con las cabezas recolectadas a las 13:00 h en el día de cosecha. Se demostró

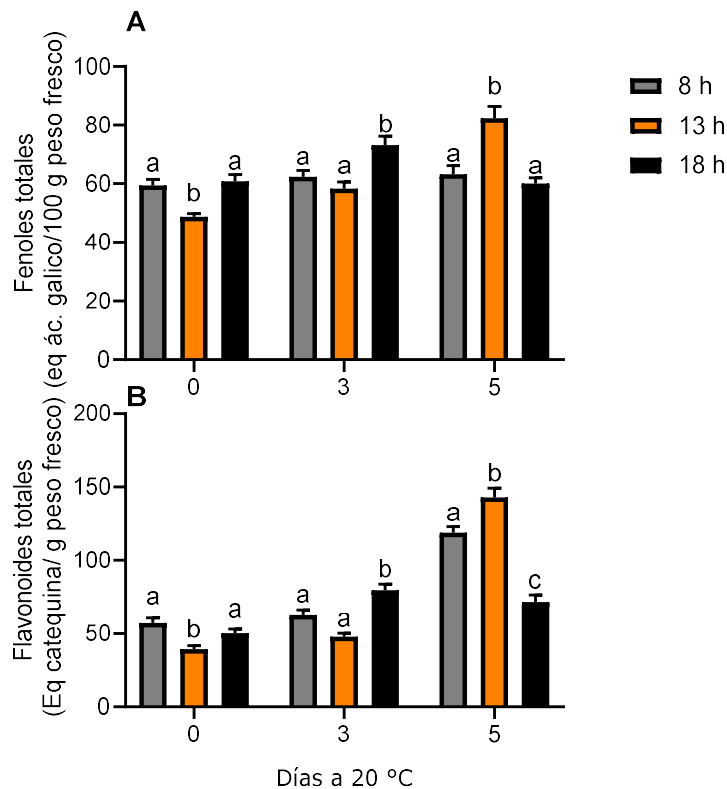
que los genes que codifican la biosíntesis de carotenoides están regulados positivamente por la luz (Simkin y col., 2003). En este sentido, el aumento de carotenoides hacia el final del día detectado podría deberse a la exposición de las cabezas de brócoli a la luz. El contenido de carotenoides y xantófilas aumentó después de tres días de almacenamiento (Figura 4.3, A) pero el incremento fue mayor en las muestras recolectadas a las 18:00 h. En cambio, a los cinco días el incremento fue mayor en las muestras recolectadas a las 13:00 h alcanzando valores aproximadamente un 25% superiores a los detectados en el resto de las muestras. El caso de las xantófilas y carotenoides es peculiar, ya que el contenido de estos componentes suele disminuir durante la senescencia de las hortalizas de hoja (Biswal, 1995). Sin embargo, el brócoli es un tejido particular, ya que es una inflorescencia y los carotenoides y xantófilas podrían acumularse en los pétalos durante el desarrollo de las flores. Un leve decrecimiento se detectó en el contenido de ácido ascórbico en las muestras que fueron cosechadas a las 18:00 en el día de cosecha (Figura 4.3, B). La acumulación de especies reactivas de oxígeno (Foyer y Shigeoka, 2011) es el resultado de reacciones secundarias de la fotosíntesis que hacia el final del día pueden causar una disminución en el contenido de ácido ascórbico. Asimismo, variaciones en los niveles de ácido ascórbico, durante el ritmo circadiano han sido reportadas (Chang y col., 2013) y se ha hipotetizado que dichas variaciones pueden darse a ciclos de luz-oscuridad y la actividad fotosintética (Ivanov, 2014). En este caso, el contenido de ácido ascórbico disminuye del mismo modo en todas las muestras a medida que avanza la senescencia poscosecha de las cabezas como ya ha sido descrito en otros trabajos (Ma y col., 2010, Ma y col., 2012).



**Figura 4.3:** **A.** Contenido de carotenoides + xantófilas (mg/ g tejido) y **B.** Contenido de ácido ascórbico (mg AA/ g tejido fresco) en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

En cuanto al contenido de fenoles totales, se detectaron variaciones en relación con la hora del día en que se recolectaron las muestras (Figura 4.4, A). Las muestras obtenidas cerca del mediodía presentaron un menor contenido de fenoles totales y se detectó un ligero incremento en las muestras obtenidas a las 18:00 h. Se ha reportado que en brócoli y repollo los niveles de actividad antioxidante y fenólicos disminuyen al final del período de luz (Soengas y col., 2018). Durante el almacenamiento, se observó un aumento en el contenido de compuestos fenólicos en todas las muestras, pero este aumento fue más importante en las muestras recolectadas a las 18:00 h luego de 3 días de almacenamiento, mientras que las muestras recolectadas a las 13:00 h mostraron el mayor contenido de compuestos fenólicos después de 5 días de almacenamiento. La variación en el contenido de flavonoides fue similar a la

observada para los fenoles totales (Figura 4.4, B). En el momento de la cosecha, las muestras obtenidas a las 13:00 h tenían menor contenido de flavonoides. También se detectó un aumento de flavonoides durante el almacenamiento, siendo las cabezas recolectadas a las 18:00 h las que mostraron el mayor contenido a los 3 días. Sin embargo, hacia el final del período de almacenamiento, las muestras obtenidas a las 8:00 h y 13:00 h mostraron un incremento de 2,5 y 3 veces respectivamente. Los estudios sobre la variación en el contenido de fenoles y flavonoides durante la poscosecha del brócoli han arrojado resultados diferentes. En algunos estudios se ha detectado un aumento en el contenido de estos compuestos durante el almacenamiento poscosecha (Costa y col., 2006a; Xu y col., 2012), mientras que en otros casos se describió una disminución en el nivel de estos compuestos (Serrano y col., 2006; Villarreal-García y col., 2016).



**Figura 4.4:** **A.** Contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/ 100 g peso fresco) y **B.** Contenido de flavonoides totales (equivalente catequina/ g peso fresco) en las muestras cosechadas las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

El metabolismo de los glucosinolatos se estudió en dos condiciones, de acuerdo con el horario del momento de cosecha de las cabezas de brócoli y durante el almacenamiento poscosecha de las mismas. Se identificaron 7 glucosinolatos individuales: 4 alifáticos (glucorafanina, glucoalisina, glucoiberina y progoitrina) y 3 indólicos (glucobrasicina, 4-hidroxi glucobrasicina y 4-metoxi glucobrasicina).

El contenido de glucosinolatos tanto alifáticos como indólicos disminuye a lo largo del día, tal como se muestra en la primera fila de la tabla 4.1. Sin embargo, esa disminución no es similar, ya que a las 8:00 h se detectó un contenido mayor de glucosinolatos indólicos que de alifáticos, valores similares para ambos grupos a las 13:00 h, y un mayor contenido de glucosinolatos alifáticos en las cabezas cosechadas a las 18:00 h, sugiriendo que la tasa de acumulación, degradación y/o transporte es diferente para cada grupo de compuestos.

Durante el almacenamiento poscosecha, el comportamiento de los dos grupos de glucosinolatos también fue diferente. El contenido de glucosinolatos alifáticos disminuyó hacia el día 3 en las muestras cosechadas a los tres horarios, y continuó disminuyendo hacia el día 5 en las muestras cosechadas a las 8:00 y 18:00 h. En contraste, los niveles de glucosinolatos indólicos, disminuyeron después de 3 días a 20 °C, pero aumentaron entre el día 3 y el día 5 en todas las muestras. Como consecuencia, al final del almacenamiento poscosecha, el contenido de glucosinolatos indólicos fue entre tres o cuatro veces mayor que el de alifáticos (Tabla 4.1).

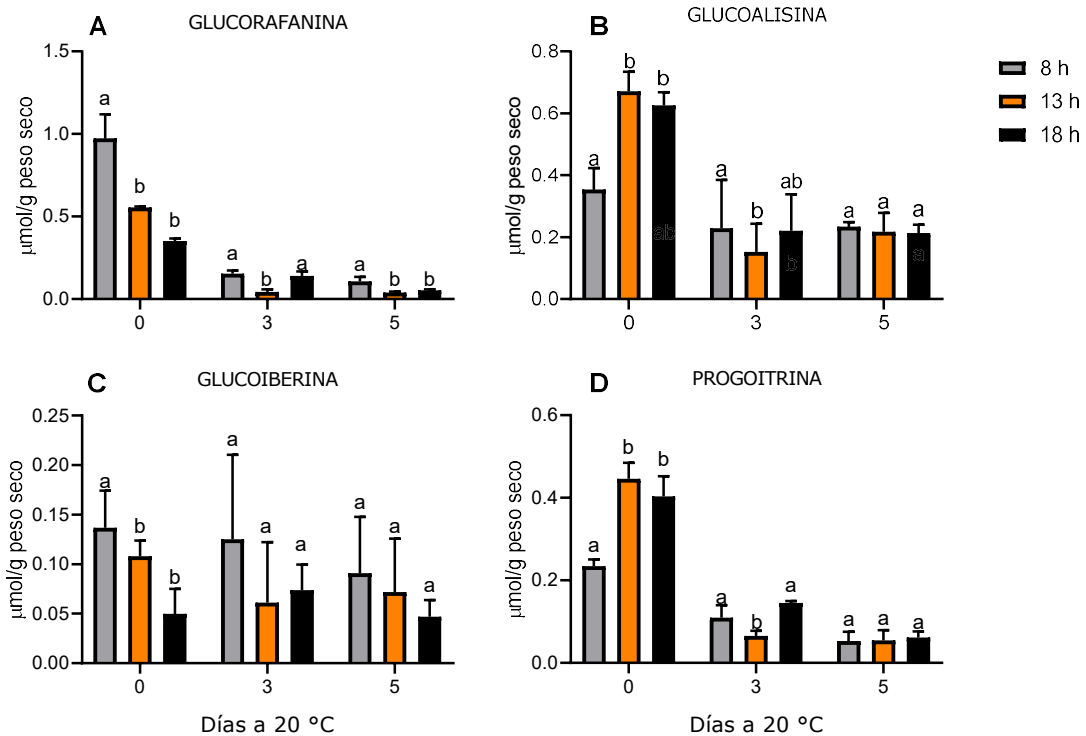
**Tabla 4.1:** Contenido de glucosinolatos alifáticos e indólicos totales ( $\mu\text{mol} / \text{g}$  peso fresco) calculado como la suma de los glucosinolatos individuales identificados en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

	Glucosinolatos alifáticos totales ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ pf)			Glucosinolatos indólicos totales ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ pf)		
	8 h	13 h	18 h	8 h	13 h	18 h
Día 0	1,67 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	1,72 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,44 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	1,92 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	1,78 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	1,13 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>
Día 3	0,64 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,39 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,57 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,64 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,81 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,95 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
Día 5	0,47 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,39 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	1,13 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	1,80 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	1,28 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>

Al analizar el contenido individual de los glucosinolatos alifáticos, se encontró a las 8:00 h, una mayor concentración de glucorafanina, seguida de glucoalisina y progoitrina y una pequeña cantidad de glucoiberina. Sin embargo, el contenido de



glucorafanina y glucoiberina, fue menor en las muestras obtenidas a las 13:00 h, comparadas con aquellas obtenidas a las 8:00 h, mientras que el contenido de glucoalisina y progoitrina fueron mayores en las cabezas cosechadas a las 13:00 h comparadas con los otros horarios (Figura 4.5).



**Figura 4.5:** Contenido de glucosinolatos individuales alifáticos expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

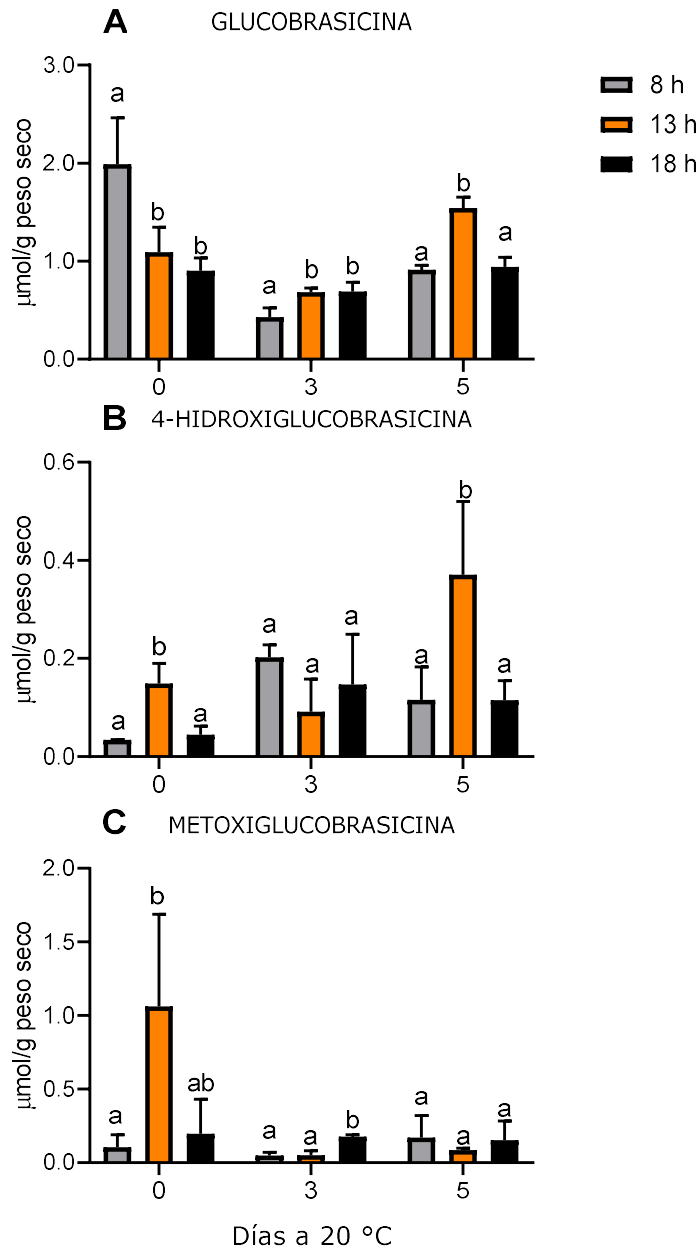
**A.** Glucorafanina. **B.** Glucoalisina. **C.** Glucoiberina. **D.** Progoitrina

Durante el almacenamiento poscosecha, se observó una disminución en el contenido de glucorafanina en todas las muestras, aunque después de 5 días de almacenamiento, las cabezas cosechadas a la mañana contenían más glucorafanina que las demás muestras. La cantidad de glucoalisina y progoitrina, disminuyó fuertemente después de 3 días de almacenamiento, en las muestras cosechadas a las 13:00 h y 18:00 h, pero se mantuvo casi sin variar en las cabezas cosechadas a la mañana. Después de cinco días, no se encontraron diferencias en los contenidos en las muestras obtenidas a diferentes horarios para estos dos glucosinolatos. El

contenido de glucoiberina, disminuyó durante el periodo poscosecha en las muestras cosechadas a las 8:00 h pero no cambió en las muestras cosechadas a los otros horarios. Después de 5 días de almacenamiento a 20 °C, el mayor contenido corresponde a la glucoalisina con valores que duplican o triplican los de los otros glucosinolatos. Finalmente, contenidos similares de glucosinolatos alifáticos individuales fueron detectados comparando las muestras obtenidas de las 13 y las 18 h.

Al analizar los glucosinolatos indólicos de forma individual, detectamos que, en el día 0, el mayor contenido correspondió a glucobrasicina con respecto a 4-hidroxi-glucobrasicina y metoxi-glucobrasicina, en todas las muestras. También observamos un aumento en la concentración de 4-hidroxi-glucobrasicina en el día 3 de almacenamiento, respecto a su tiempo cero. Este comportamiento ya ha sido reportado, en cabezas enteras de brócoli que muestran un aumento del 84 % a las 24 horas del almacenamiento a 20 °C en el contenido de este glucosinolato comparado con el día 0 (Villarreal-García y col., 2016).

De manera similar a lo observado con la glucorafanina, la concentración de glucobrasicina fue menor en las muestras recolectadas a las 13:00 h y no cambió en las cabezas obtenidas a las 18:00 h. De manera diferente, el contenido de 4-hidroxi-glucobrasicina y metoxi-glucobrasicina fue mayor en las muestras recolectadas a las 13:00 h y menor en las obtenidas a las 18:00 h. Luego de 3 días de almacenamiento poscosecha, se detectaron disminuciones significativas en el contenido de glucobrasicina en las muestras de las 8:00 h y en el contenido de metoxi-glucobrasicina en las muestras de las 13:00 h. En las otras muestras, el cambio fue mínimo y, como consecuencia, hubo menores diferencias en el contenido de los tres glucosinolatos indólicos. Al quinto día se detectó un aumento de glucobrasicina en las tres muestras, aunque el aumento fue mucho mayor en las muestras de las 13:00 h. En el caso de la 4-hidroxi-glucobrasicina se observó un incremento solo en las muestras recolectadas a las 13:00 h. Finalmente, el contenido de metoxi-glucobrasicina aumentó ligeramente en las muestras a las 8:00 h pero no cambió en las muestras de las 13:00 h y 18:00 h (Figura 4.6).

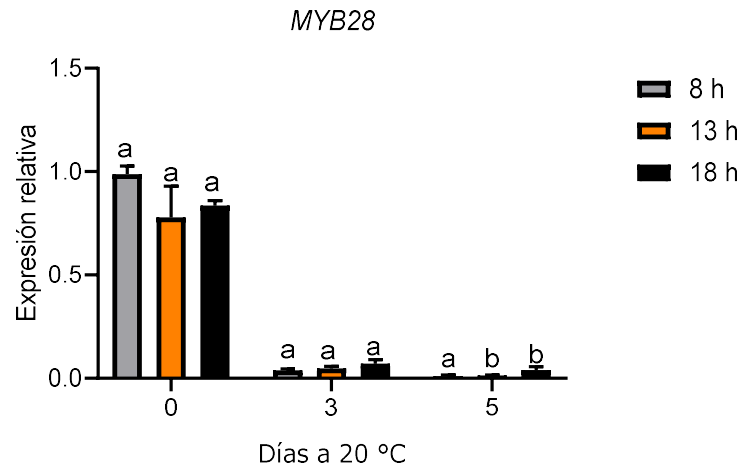


**Figura 4.6:** Contenido de glucosinolatos individuales indólicos expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

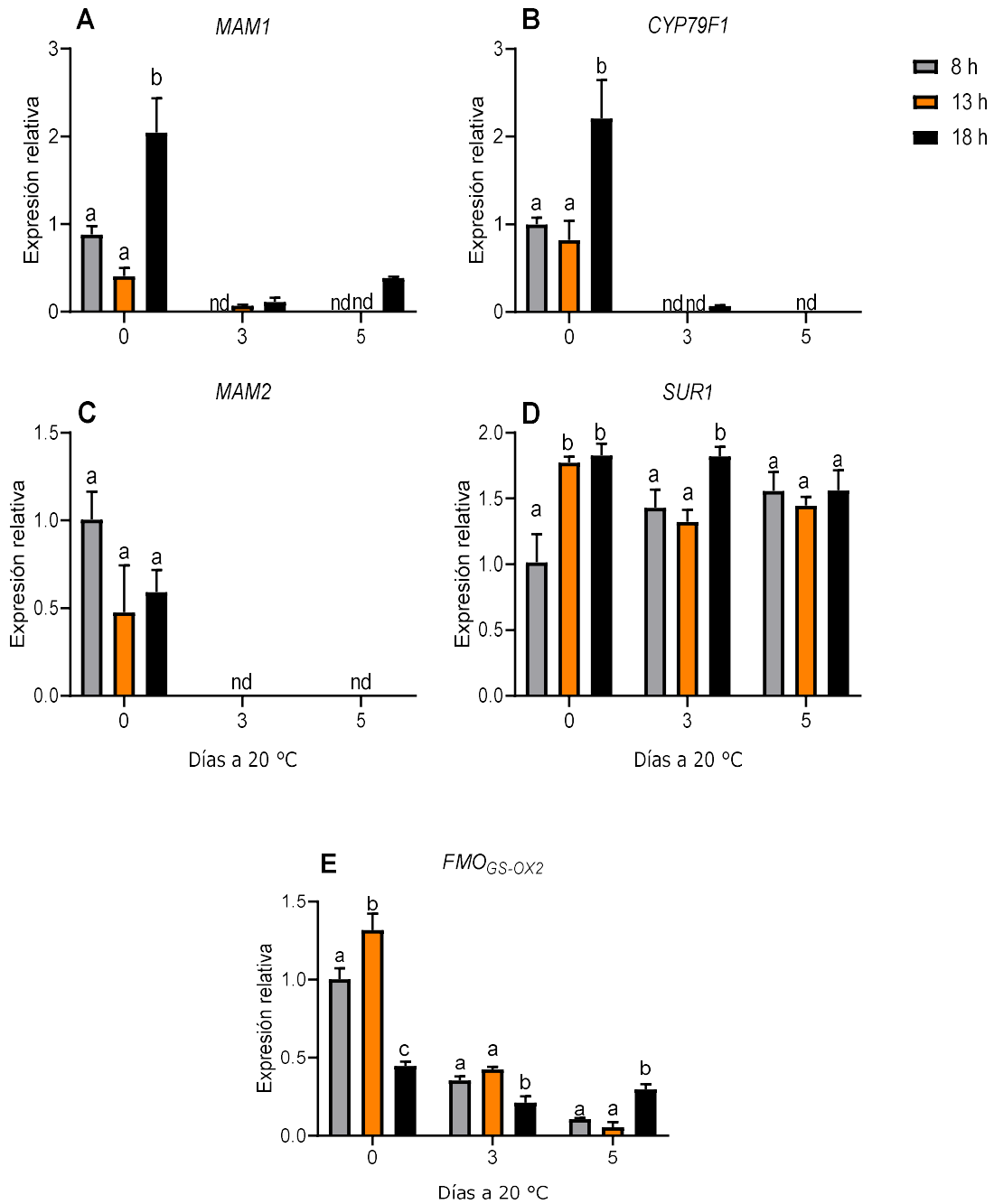
**A.** Glucobrasicina. **B.** 4-hidroxi glucobrasicina. **C.** Metoxi glucobrasicina

Por otro lado, se analizó la expresión de genes asociados con la síntesis y degradación de glucosinolatos alifáticos e indólicos. En el caso de la expresión de los genes asociados al metabolismo de glucosinolatos alifáticos, analizamos la expresión

del factor de transcripción *BoMYB28* (Figura 4.7), y los genes de biosíntesis *BoMAM1*, *BoMAM2*, *BoSUR1*, *BoCYP79F1* y *BoFMO<sub>GS-OX2</sub>*. Durante el día de cosecha, no se detectaron cambios en la expresión de *MYB28* y *MAM2* (Figura 4.8, C) en los diferentes horarios, pero si un aumento en la expresión de *MAM1*, *SUR1* y *CYP79F1* (Figura 4.8: A, B y D) y una disminución en la expresión de *FMOGS-OX2* hacia las 18:00 h (Figura 4.8, E).



**Figura 4.7:** Expresión relativa del gen *BoMYB28* en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.



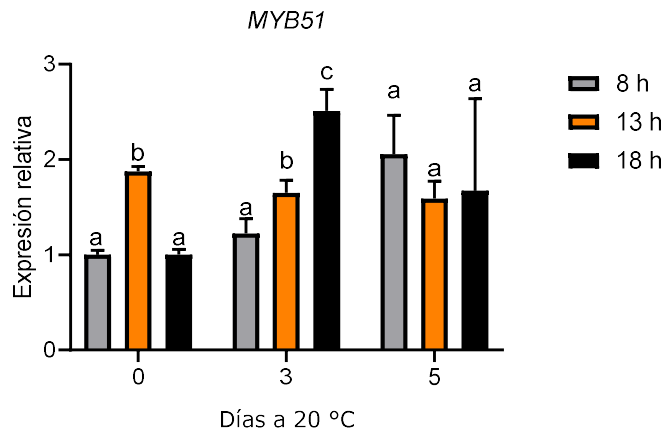
**Figura 4.8:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMAM1*. **B.** *BoCYP79F1*. **C.** *BoMAM2*. **D.** *BoSUR1*. **E.** *BoFMO<sub>GS-OX2</sub>*

Durante el almacenamiento poscosecha se detectó una importante disminución en la expresión de los genes asociados a la biosíntesis de glucosinolatos

alifáticos a excepción de *SUR1*, que está involucrado en ambas rutas. En muchos casos la expresión fue indetectable, como se puede observar en *MAM1* en las muestras obtenidas a las 8:00 h hacia el día 3 y en muestras recolectadas a las 8:00 h y 13:00 h hacia el día cinco; en *MAM2* para todas las muestras del día tres y del día cinco; y *CYP79F1* en muestras recolectadas a las 8:00 h y 13:00 h hacia el día 3 y en todas las muestras hacia el día 5. Hacia el final del período de almacenamiento las muestras obtenidas a las 18:00 h mostraron una mayor expresión de *MYB28*, *MAM1* y *FMO<sub>GS-OX2</sub>*. Finalmente, se detectó una respuesta diferente cuando analizamos la expresión de *SUR1*. Las muestras recolectadas a las 8:00 h mostraron un aumento en la expresión de este gen mientras que las obtenidas a las 13:00 h y 18:00 h no mostraron cambios hacia el final del almacenamiento.

También se evaluó la expresión de los genes *MYB51*, *CYP83B1*, *SUR1*, *ST5a* y *CYP81F4* asociados al metabolismo de los glucosinolatos indólicos. Al analizar los cambios de expresión en diferentes momentos de cosecha, se detectó un incremento de casi el doble en la expresión de *MYB51* en muestras recolectadas a las 13:00 h en comparación con las muestras obtenidas a las 8:00 h y a las 18:00 h (Figura 4.9).



**Figura 4.9:** Expresión relativa del gen *BoMYB51* en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

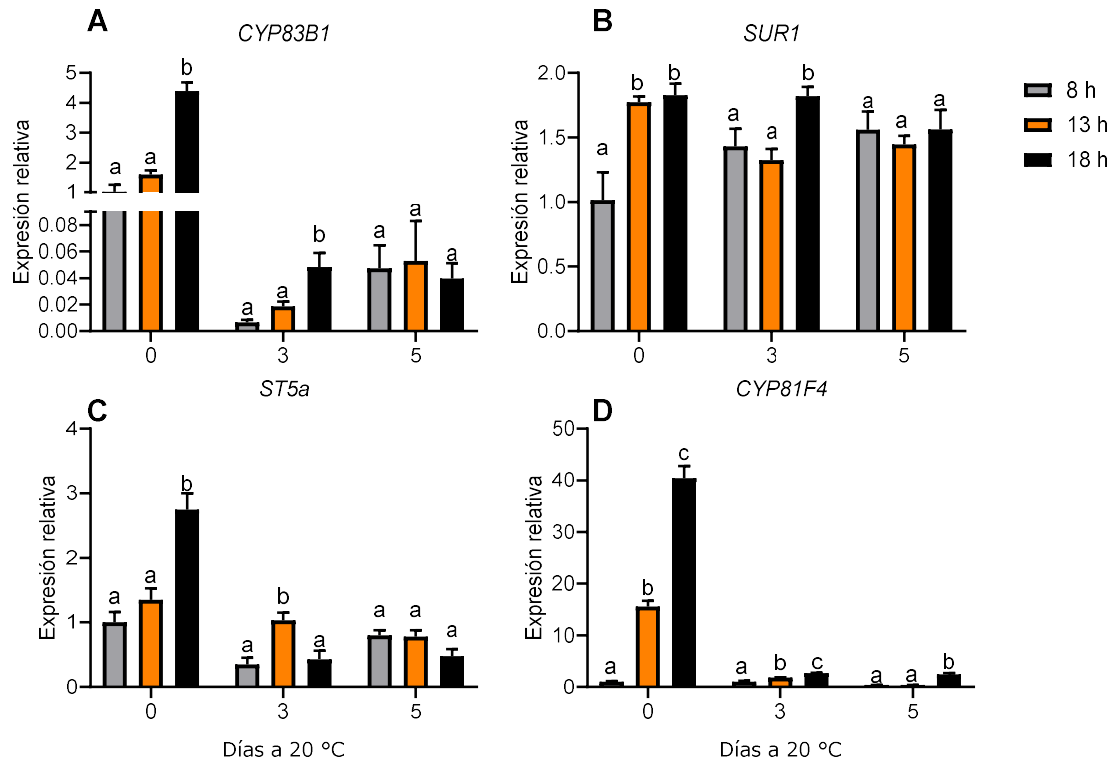
El gen que codifica para el factor de transcripción MYB51, uno de los centrales en la regulación de la vía de biosíntesis de glucosinolatos indólicos, se ha visto que aumenta su expresión cuando avanza la senescencia. Este mismo perfil, se ha observado para todos los tratamientos analizados, por lo que se realizó un análisis *in*

*silico* de los elementos cis-regulatorios que actúan sobre la región promotora de dicho gen utilizando la base de datos de elementos cis-regulatorios en plantas: *PlantCARE* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) y *New Place* (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>). En la tabla 4.2, se observan distintos elementos cis-regulatorios encontrados en la región promotora del gen *MYB51*, como elementos de respuesta a la hormona etileno en *Arabidopsis thaliana* y elementos de respuesta al daño en la especie *Brassica oleracea*.

**Tabla 4.2:** Elementos cis-regulatorios encontrados en la región promotora del gen *MYB51*

Elemento	Organismo	Secuencia	Función
WUN	<i>Brassica oleracea</i>	AAATTCCT	Elemento de respuesta al daño
ERE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATTTCAA	Respuesta al etileno
	<i>Solanum melongena</i>	ATTTCAA	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	ATTTCAA	
G-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GCCACGTGGA	Respuesta a la luz

Además, se detectó un aumento de aproximadamente cuatro a cuarenta veces en la expresión del resto de genes en muestras recolectadas a las 18:00 h respecto de los otros horarios (Figura 4.10: A, B, C y D).



**Figura 4.10:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

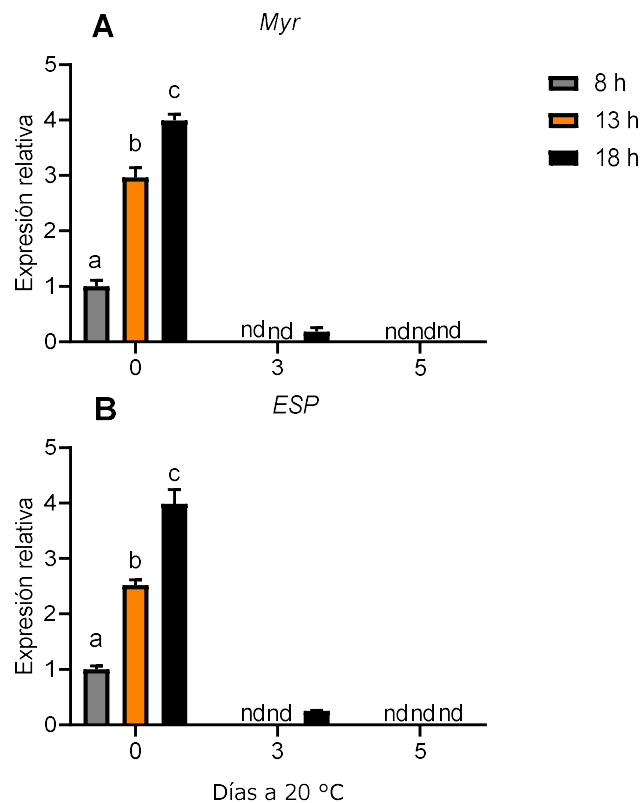
**A.** *BoCYP83B1*. **B.** *BoSUR1*. **C** *BoST5a*. **D.** *BoCYP81F4*

Durante el almacenamiento poscosecha, el comportamiento de los genes asociados con la biosíntesis de glucosinolatos indólicos fue diferente al detectado en el caso de los glucosinolatos alifáticos. La expresión del factor de transcripción *MYB51* aumentó a los 3 días en las muestras obtenidas a las 18:00 h y a los 5 días en las muestras recolectadas a las 8:00 h, pero no cambió en las muestras a partir de las 13:00 h. Como consecuencia, hacia el final del almacenamiento, no se detectaron diferencias en la expresión de *MYB51* entre las diferentes muestras, aunque la expresión promedio fue superior a la detectada en las muestras el día 0 de cosecha. En el caso de *CYP83B1* y *ST5a*, se detectó una disminución en su expresión el día 3, particularmente en aquellas muestras que mostraron alta expresión el día 0. No se detectaron cambios hacia el día 5 de almacenamiento poscosecha. La expresión de *CYP81F4* también disminuyó hacia el día 3 en aquellas muestras (13:00 h y 18:00 h) con expresión muy alta el día 0. La expresión de este gen continuó disminuyendo



hacia el día 5 en las muestras recolectadas a las 8:00 h y 13:00 h y no varió en las obtenidas a las 18:00 h. Los cambios en la expresión de *SUR1* se describieron anteriormente, ya que como mencionamos este gen es común en las dos vías de biosíntesis. Tomando en conjunto todos los genes analizados asociados a la biosíntesis de glucosinolatos indólicos, se puede concluir que, a excepción de *CYP83B1*, la expresión de estos genes se mantuvo en niveles similares o ligeramente superiores a los de las muestras recolectadas a las 8:00 h del día 0.

Finalmente, se detectó un aumento significativo en la expresión de los genes asociados a la degradación (*Myr* y *ESP*) alrededor de las 13:00 h e incluso más hacia las 18:00 h en el día de cosecha (Figura 4.11: A y B), asimismo hubo una disminución considerable en la expresión de dichos genes durante el almacenamiento poscosecha, alcanzando niveles indetectables en casi todas las muestras excepto en las recolectadas a las 18:00 h del tercer día de almacenamiento.



**Figura 4.11:** Expresión relativa de los genes de degradación en las muestras cosechadas a las 8:00 h (gris), a las 13:00 h (naranja) y a las 18:00 h (negro) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** BoMyr. **B.** BoESP

### 4.3 Conclusiones parciales

La cosecha hacia las últimas horas del día (18:00 h) permite obtener una menor velocidad de amarillamiento y una menor degradación de las clorofilas totales en comparación con las cabezas recolectadas en la mañana. Asimismo, la mayoría de los genes que asociados a la degradación de la clorofila durante la senescencia muestran una expresión más baja o un retraso en los incrementos de sus niveles de ARNm en las muestras recolectadas a las 18:00 h (Hasperué y col., 2013). Las cabezas de brócoli cosechadas hacia el final del día acumulan almidón como producto de la fotosíntesis y esta acumulación probablemente contribuye a mantener los niveles de azúcares solubles, lo cual permite retrasar la senescencia y mantener una mejor calidad del producto (Hasperué y col., 2011). Coincidentemente, las muestras recolectadas a las 8:00 h, con mayor tasa de senescencia, también poseen un mayor catabolismo de proteínas. Desde el punto de vista de la calidad nutricional de las cabezas, la combinación de retraso de senescencia y el aumento de antioxidantes refuerza la recomendación de cosechar alrededor de las 18:00 h, o si las muestras se almacenan por más tiempo cosechar al mediodía.

Respecto al metabolismo de glucosinolatos, la cosecha en diferentes momentos del día influye en el contenido y composición de glucosinolatos en cabezas de brócoli. El contenido de glucosinolatos alifáticos disminuye notablemente durante el día, mientras que el contenido de glucosinolatos indólicos presenta una dinámica diurna menos marcada. Durante la poscosecha, el almacenamiento en oscuridad generó cambios importantes en el pool de glucosinolatos. En general, el contenido de alifáticos disminuye marcadamente durante el período de poscosecha, así como la expresión de los genes asociados con su biosíntesis. En el caso de los glucosinolatos indólicos, su contenido se mantiene o varía ligeramente (dependiendo del tiempo de cosecha) mientras que la expresión de los genes asociados no decae tan fuertemente como en el caso de genes asociados con el metabolismo alifático. También se puede concluir que la expresión de genes relacionados con la degradación de los glucosinolatos tiene una regulación génica dependiente de la luz, ya que hubo un aumento en su expresión durante las horas del día y una marcada disminución durante el almacenamiento poscosecha en la oscuridad. Tomando en conjunto estos resultados y los obtenidos previamente por nuestro grupo (Hasperué y col., 2011;

Hasperué y col., 2013), consideramos adecuada la cosecha de brócoli entre el mediodía y la puesta del sol, ya que permite mantener una mejor calidad visual y mayor contenido de glucosinolatos.

### ***Análisis del metabolismo de glucosinolatos durante el almacenamiento poscosecha en cabezas de brócoli sometidas a tratamientos químicos***

#### **5.1 TRATAMIENTO POSCOSECHA CON REGULADORES HORMONALES (CITOQUININAS Y ETILENO)**

##### *5.1.1 Introducción general*

Las hormonas vegetales juegan un papel importante en la regulación de la senescencia de los productos hortícolas. El etileno generalmente acelera la tasa de senescencia, mientras que se conoce que las citoquininas lo retrasan. La senescencia poscosecha de brócoli es influenciada por las hormonas, el daño que se produce en el tejido al momento de la cosecha desencadena la producción endógena de etileno, alcanzando un pico en la producción de esta hormona vegetal de 5 a 10 veces mayor que sus valores basales (King y Morris, 1994).

Se han observado cambios en la expresión de los genes, relacionados en la biosíntesis de etileno durante la poscosecha de brócoli, como es el caso del gen que codifica para la enzima aminociclopropanocarboxilato oxidasa (ACC oxidasa) que ha sido descrita como el factor limitante de la tasa de producción de etileno en la senescencia de brócoli (Pogson y col., 1995). Los niveles de ARN mensajero y la actividad de la ACC oxidasa se elevan a niveles entre 10 y 15 veces mayores en los tejidos reproductivos inmaduros respecto a los sépalos y pétalos vegetativos del brócoli cosechado (Tian y col., 1995). El ARN mensajero de la ACC oxidasa es inducido después de dos horas de cosechar por el gen de la ACC oxidasa 2 que tiene una expresión tejido específico. También se induce el gen de la ACC oxidasa 1, que tiene una expresión específica de sépalos y hojas senescentes.

Después del pico, los niveles de etileno rondan alrededor de 0.5-1.5 nL. (g.h)<sup>-1</sup>, y se mantienen en estos valores durante 2 o 3 días a 20 °C. El brócoli es muy sensible a esta hormona y su efecto más característico es el amarillamiento de las inflorescencias en tiempos cortos, el contacto con etileno 2 ppm a 10 °C reduce en un 50 % la vida poscosecha (Kader, 1985).

La aparición o intensidad de este pico, se puede disminuir o retrasar con el almacenamiento en frío, Ahlawat y col. (2022) observaron en brócoli que la expresión de ACC sintasa, una de las enzimas clave en la ruta de biosíntesis de etileno, se ve aumentada a temperatura ambiente, mientras que se ve reducida a bajas temperaturas.

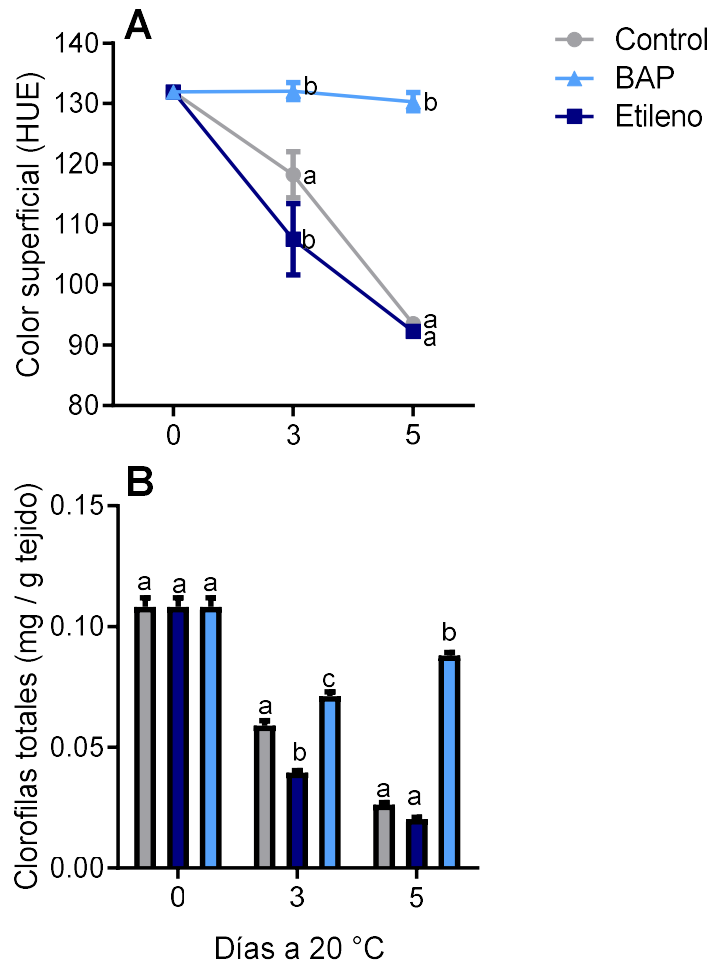
Así como la pérdida de clorofila en los floretes de brócoli se ve acelerada con la aplicación de etileno exógeno, esta puede ser retrasada con la síntesis de inhibidores de esta hormona (Aharoni, 1985; Wang, 1977). Por otro lado, los efectos de la aplicación de citoquininas exógenas en el retardo de la senescencia en brócoli son muy notables. Las citoquininas sintéticas tales como kinetina y 6-bencilaminopurina (6-BAP) son reguladores de crecimiento vegetales reportados como no tóxicos en la agricultura (Xu y col., 2012), y se han estudiado como bioplaguicidas para el cultivo de tabaco, pera, aguacate (Prange y col., 2006). La aplicación de citoquininas como tratamiento poscosecha ha sido reportado en varias frutas y hortalizas para prolongar la vida útil de las mismas, tal como se ha descrito en espárragos (Wei y col., 2011), pepino (Chen y Yang, 2013) y coliflor (Siddiqui y col., 2015), entre otros.

En el caso de brócoli, Rushing (1990) analizaron diferentes tratamientos poscosecha con citoquininas, como la zeatina y la benziladenina, observando que permiten extender la vida útil de las inflorescencias disminuyendo la tasa respiratoria y la pérdida del contenido de clorofilas totales respecto a los controles. Downs y col. (1997) propone que los tratamientos con citoquininas permiten prolongar la vida poscosecha de brócoli debido a un mantenimiento en los azúcares respecto a los controles.

### *5.1.2 Resultados y discusión*

El seguimiento de la senescencia en las muestras sometidas a los tratamientos con etefón y BAP se realizó mediante la medida de color superficial (Figura 5.1.1, A) y el contenido de clorofilas totales (Figura 5.1.1, B). Se observó que los valores de HUE y el contenido de clorofilas totales disminuyen en el grupo control a medida que avanza la senescencia poscosecha tal como se describió previamente. Sin embargo, aquellas cabezas que fueron tratadas con etefón 100 ppm presentaron hacia el día 3 del almacenamiento poscosecha un menor contenido de clorofilas y menos valores

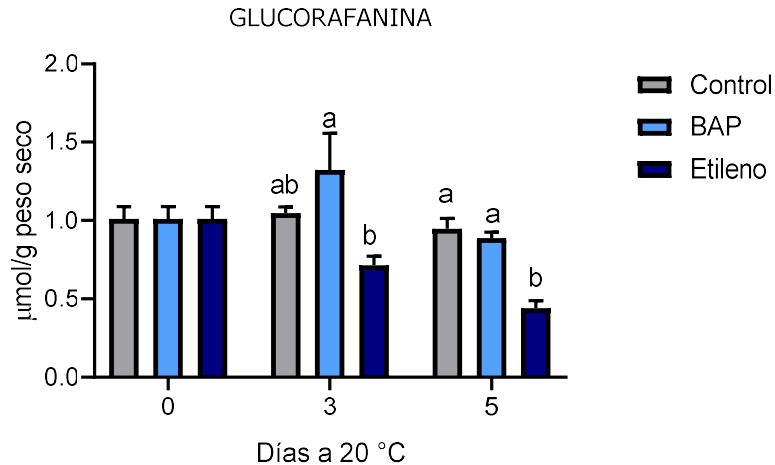
de HUE respecto al control, pero sin diferencias significativas hacia el final del almacenamiento. Para el caso del grupo tratado con citoquininas, se encontró que se mantienen los valores de HUE y un menor catabolismo de las clorofilas totales respecto a los controles a lo largo de la senescencia poscosecha.



**Figura 5.1.1: A.** Color superficial (ángulo HUE) y **B.** Contenido de clorofilas (mg clorofilas totales/ g tejido fresco) en las muestras control (gris), tratadas con etefón (azul) y tratadas con 6-BAP (celeste) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

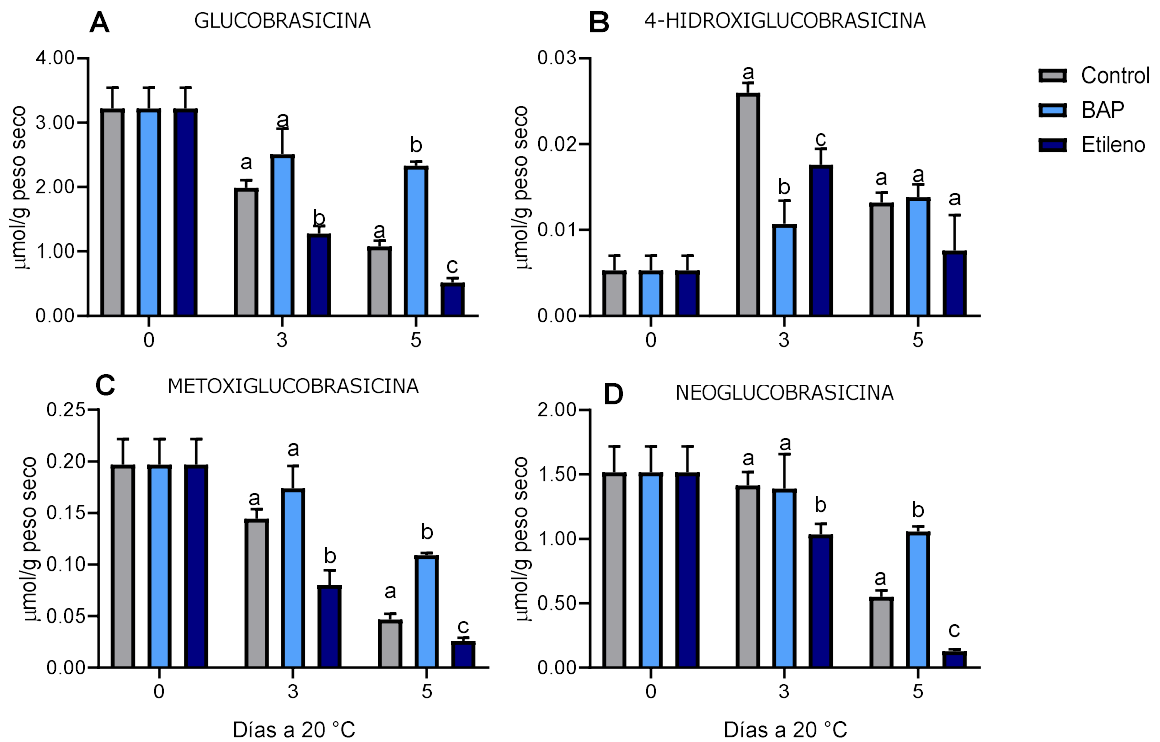
Por otro lado, se estudió el metabolismo de glucosinolatos alifáticos e indólicos bajo la acción de diferentes reguladores hormonales y se identificaron 5 glucosinolatos individuales: glucorafanina (alifático) y glucobrasicina, metoxiglucobrasicina, 4-hidroxiglucobrasicina y neoglucobrasicina (indólicos).

Como se muestra en la figura 5.1.2, no se encontraron diferencias en el contenido de glucorafanina en ninguno de los tiempos entre las muestras control y aquellas tratadas con BAP, pero sí se encontró una menor concentración de este glucosinolato en las muestras tratadas con etefón respecto a las muestras control y a aquellas tratadas con 6-BAP tanto al día 3 como al día 5 de almacenamiento poscosecha.



**Figura 5.1.2:** Contenido de glucorafanina expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras control (gris), tratadas con etefón (azul) y tratadas con 6-BAP (celeste) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

En el caso de los glucosinolatos indólicos no se encontraron diferencias en el contenido de glucobrasicina, metoxiglucobrasicia y neoglucobrasicina (Figura 5.1.3: B, D y E) en el día 3 entre el control y el tratamiento con BAP, pero sí se encontró una mayor concentración de estos glucosinolatos hacia el final del almacenamiento, exceptuando el caso de la 4-hidroxiglucobrasicina, glucosinolato en el que se detectó una menor concentración en la muestra tratada con BAP respecto al control en el día 3 y sin diferencias hacia el final del almacenamiento.



**Figura 5.1.3:** Contenido de glucosinolatos indólicos individuales expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras control (gris), tratadas con etefón (azul) y tratadas con 6-BAP (celeste) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**A.** Glucobrasicina. **B.** 4-hidroxiglucobrasicina. **C.** Metoxiglucobrasicina. **D.** Neoglucobrasicina

El contenido de 4-hidroxiglucobrasicina está relacionado con la expresión de los genes de la familia *CYP81F*. Yi y col. (2016) sugiere que la expresión de dichos genes aumenta con tratamientos con metiljasmonato (MeJa). Considerando que la cosecha causa un daño mecánico que puede resultar en el aumento de MeJa, podría aumentar la expresión de los genes *CYP81F1-3*, y por consiguiente el contenido de 4-hidroxiglucobrasicina, como se observa en el caso de los controles a lo largo de la poscosecha.

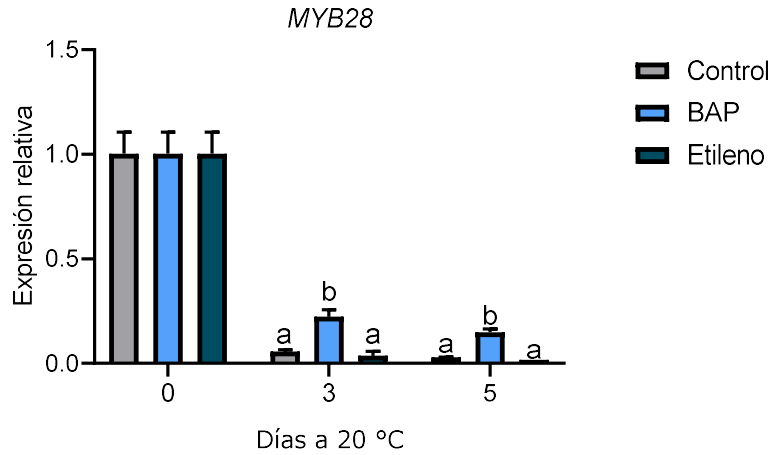
Xu y col. 2012 analizaron el efecto en el contenido total de glucosinolatos cuando las cabezas de brócoli fueron previamente tratadas con 6-BAP 200 ppm a almacenarse durante 4 días a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , encontrando un mayor contenido de glucosinolatos total a lo largo del almacenamiento en las muestras tratadas con BAP respecto a sus controles.



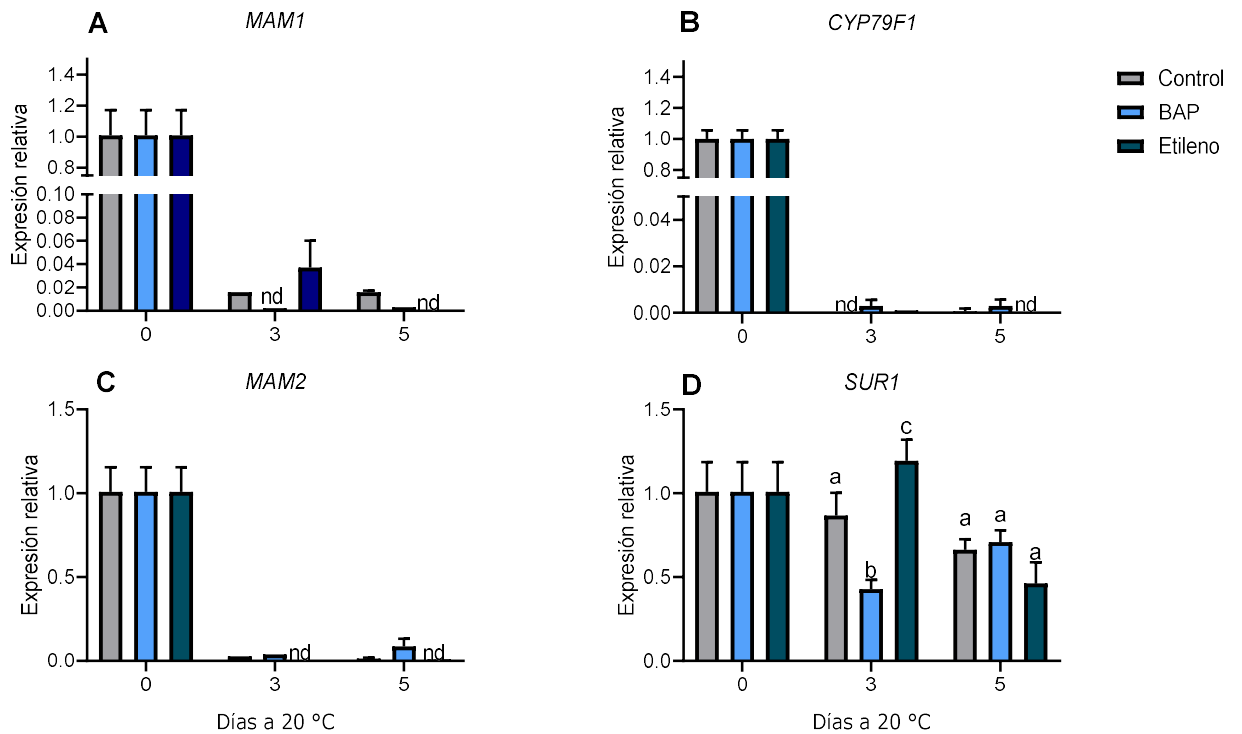
Se ha reportado que a las 24 h posteriores a la exposición de etefón 1000 ppm, se encuentra un aumento en la concentración de glucorafanina y 4-hidroxiglucobrasicina respecto aquellas muestras almacenadas en aire (Villarreal-García y col., 2016). Un resultado similar se detectó en nuestro caso, en muestreos realizados a las 48 h con un aumento del 177 % en el contenido de glucorafanina y del 73 % en el caso de 4-hidroxiglucobrasicina en muestras tratadas con etefón (resultados no mostrados). Con el avance del almacenamiento poscosecha, se encontró que las cantidades de dichos glucosinolatos indólicos siempre fueron menores en las muestras tratadas con etefón respecto a los controles tanto al día 3 como al día 5 del almacenamiento poscosecha.

El decaimiento general de glucosinolatos alifáticos y algunos indólicos pueden coincidir temporalmente con una marcada pérdida de la calidad visual (Aires y col., 2011). Como se mencionó anteriormente, las muestras tratadas con BAP mostraron un retardo en la senescencia poscosecha, con una mayor retención del color y un mayor contenido de clorofilas totales, que coincide con una mayor retención del contenido de glucosinolatos, siendo aún esta diferencia más marcada en el día 5. Se detectó lo contrario para las muestras tratadas con etileno, las cuales mostraron una senescencia más avanzada y una menor concentración de los cinco glucosinolatos individuales analizados, glucorafanina, glucobrasicina, metoxiglucobrasicina, neoglucobrasicina y 4-hidroxiglucobrasicina en los tiempos analizados.

Al analizar a nivel molecular la expresión de los genes asociados con la vía de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos, se encontró una fuerte disminución del factor de transcripción, *BoMYB28* (Figura 5.1.4) y de la expresión de *BoMAM1*, *BoMAM2*, *BoCYP79F1* (Figura 5.1.5: A, B y C) durante el almacenamiento poscosecha, excepto para el caso de *BoSUR1* que es un gen que comparten ambas vías de biosíntesis (Figura 5.1.5: D). Al analizar las muestras tratadas, entre los controles y ambos tratamientos no se encontraron diferencias al día 3 y al día 5 con respecto a los controles, con excepción del factor de transcripción *MYB28*, en el cual se observa un aumento en la expresión en las muestras tratadas con BAP en ambos tiempos y el gen *SUR1* que al día 3 mostró una menor expresión las muestras tratadas con BAP y una mayor expresión las muestras tratadas con etileno respecto al control.



**Figura 5.1.4:** Expresión relativa del gen *BoMYB28* en las muestras control (gris), tratadas con etefón (azul) y tratadas con 6-BAP (celeste) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

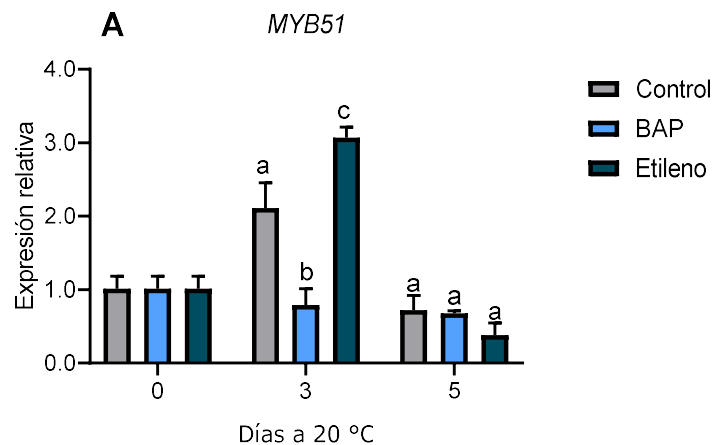


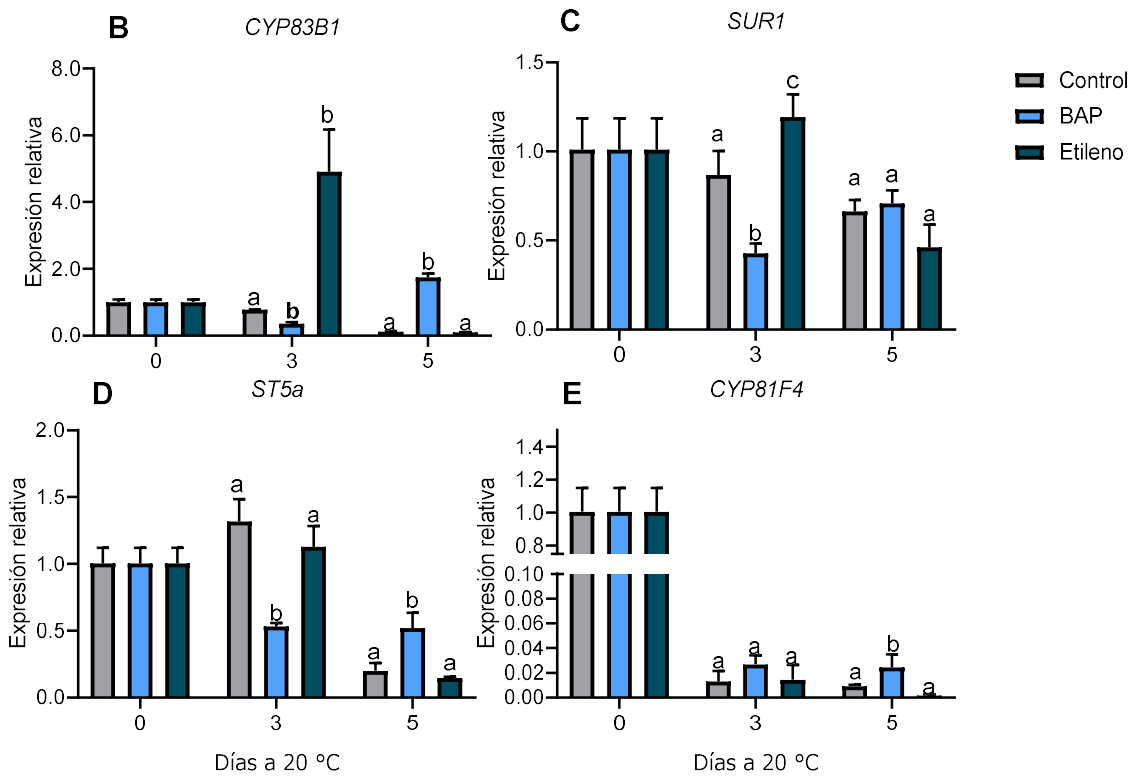
**Figura 5.1.5:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en las muestras control (gris), tratadas con etefón (azul) y tratadas con 6-BAP (celeste) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

A. *BoMAM1*. B. *BoCYP79F1*. C. *BoMAM2*. D. *BoSUR1*.

En cuanto a la expresión de los genes asociados con la biosíntesis de glucosinolatos indólicos, se observó un aumento de la expresión en el caso de *MYB51*, *CYP83B1* y *SUR1* (Figura 5.1.6: A, B y C) en las muestras tratadas con etileno al día 3 del almacenamiento poscosecha. Ku y col. (2013) observaron que la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de glucosinolatos indólicos en brócoli tenían una correlación con la producción endógena de etileno. Xu y col. (2017) mostraron en *Arabidopsis* que un tratamiento con ACC induce la expresión del gen *BoCYP83B1*. Villarreal-García y col., 2016 sugieren que hormonas como metiljasmonato y etileno inducen la activación de los genes *CYP81F* involucrados en la hidroxilación y metoxilación de los glucosinolatos. Sin embargo, hacia el final del almacenamiento no se observó cambios en la expresión de dichos genes en las muestras tratadas con etileno respecto al control.

En las muestras tratadas con 6-BAP, se vio una disminución de la expresión de dichos genes hacia el día 3, excepto en el caso del gen *CYP81F4* que no mostró diferencias significativas. Hacia el final del almacenamiento (día 5), se observó un comportamiento diferente con un aumento de la expresión en dichas muestras respecto al control, excepto para el gen *SUR1* que no mostró diferencias significativas.



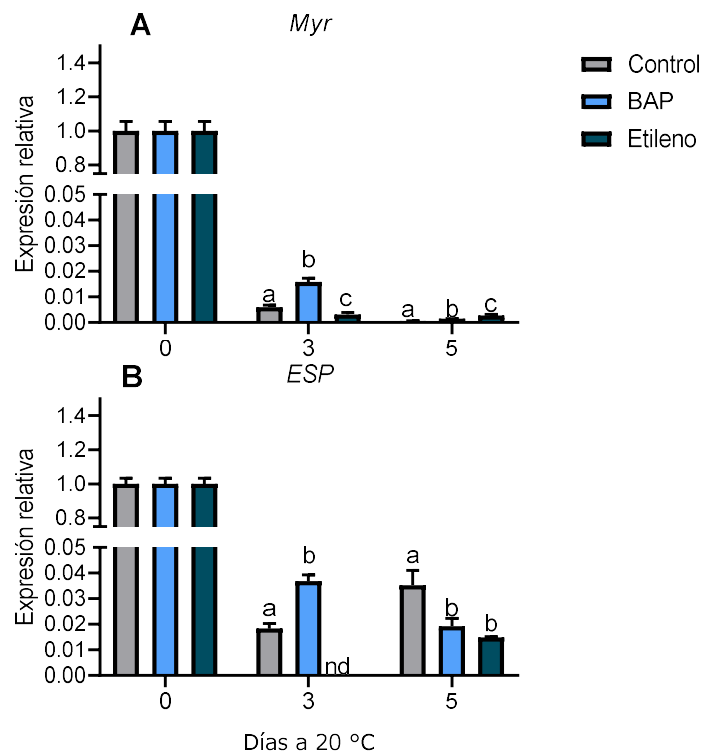


**Figura 5.1.6:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinatos indólicos en las muestras control (gris), tratadas con etefón (azul) y tratadas con 6-BAP (celeste) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMYB51*. **B.** *BoCYP83B1*. **C.** *BoSUR1*. **D.** *BoST5a* **E.** *BoCYP81F4*

Estudios previos en *Arabidopsis* indican que los genes relacionados con la vía de biosíntesis de glucosinatos indólicos son más susceptibles a ser inducidos por la aplicación de reguladores hormonales exógenos que aquellos genes relacionados con la biosíntesis de glucosinatos alifáticos (Mikkelsen y col., 2003).

En cuanto a los genes relacionados con la degradación de glucosinatos, se observó al tercer día una mayor expresión de los genes *BoMyr* y *BoESP* en las muestras tratadas con 6-BAP y una menor expresión o incluso indetectable en aquellas tratadas con etileno (Figura 5.1.7: A y B)



**Figura 5.1.7:** Expresión relativa de los genes de degradación en las muestras control (gris), tratadas con etefón (azul) y tratadas con 6-BAP (celeste) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

A. *BoMyr* B. *BoESP*

## 5.2 TRATAMIENTO POSCOSECHA CON 1-METILCICLOPROPENO (1-MCP)

### 5.2.1 Introducción general

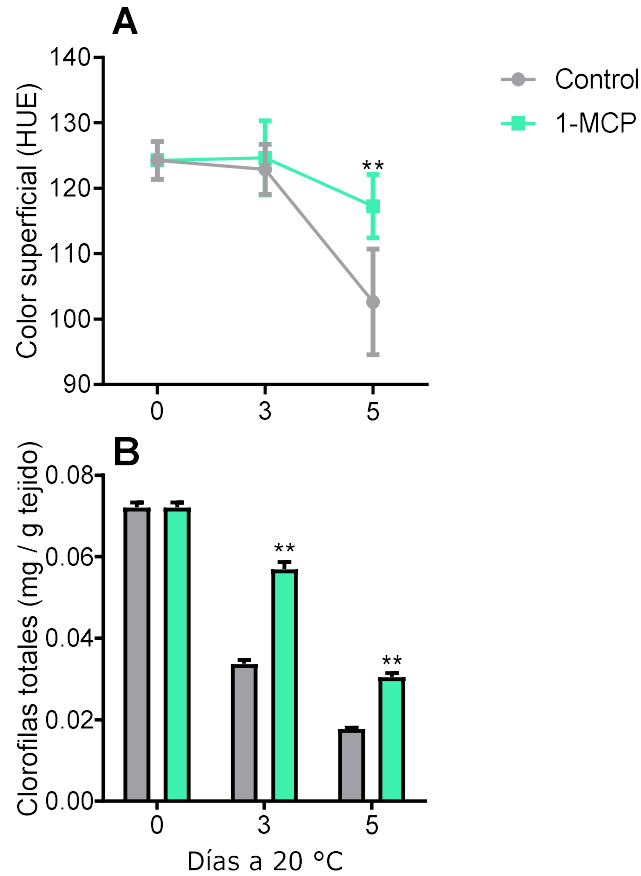
Uno de los métodos más utilizados en frutas y hortalizas para inhibir la síntesis y acción del etileno es el uso del 1-metilciclopropeno (1-MCP) (Paliyath, 2009). La aplicación de este compuesto en poscosecha ha resultado exitoso para retrasar la senescencia en una variedad de frutas como kiwi (Koukounaras y Sfakiotakis, 2007), manzana (Elfving y col., 2007), ciruela (Luo y col., 2009), higo (Freiman y col., 2012), entre otras. El 1-MCP es un compuesto gaseoso que inhibe la percepción del etileno, interactuando con los receptores de este de manera irreversible, lo que impide que se desencadene la respuesta al etileno. Por este modo de acción, es un método efectivo para prolongar la vida útil y la calidad de muchas frutas y hortalizas (Watkins, 2006).

Los efectos del 1-MCP dependen de la especie, el estado de madurez, el momento de aplicación, la concentración, la temperatura, la duración del tratamiento y el número de aplicaciones que se realicen. En la familia de las *Brassicas*, el tratamiento con 1-MCP en pak-choy (*Brassica rapa chinensis*) retrasa la senescencia y el amarillamiento de las hojas al mantener la integridad de los cloroplastos durante el almacenamiento a 20 °C (Able y col., 2002). En brócoli, ha sido reportada la aplicación poscosecha de 1-MCP para la extensión de la vida útil de esta hortaliza a temperatura ambiente y de refrigeración (Ku y Wills, 1999; Fan y col, 2000). Asimismo, se ha visto que el tratamiento con 1-MCP en brócoli mantiene los niveles de clorofilas totales, y retrasa la disminución de los carotenoides, ácido ascórbico y glucosinolatos durante la poscosecha (Yuan y col., 2010). También en brócoli se describió una inhibición de ACC sintasa y ACC oxidasa, enzimas claves en la biosíntesis de etileno, por acción del 1-MCP. Se detectó que este compuesto bloquea la inducción de la expresión de los genes codificantes de estas enzimas, *BoACS-1*, *BoACS-2* y *BoACO-1* y reduce los niveles de los transcriptos *BoETR1* y *BoETR2* que codifican para los receptores de etileno (Ma y col., 2008).

### 5.2.2 Resultados y discusión

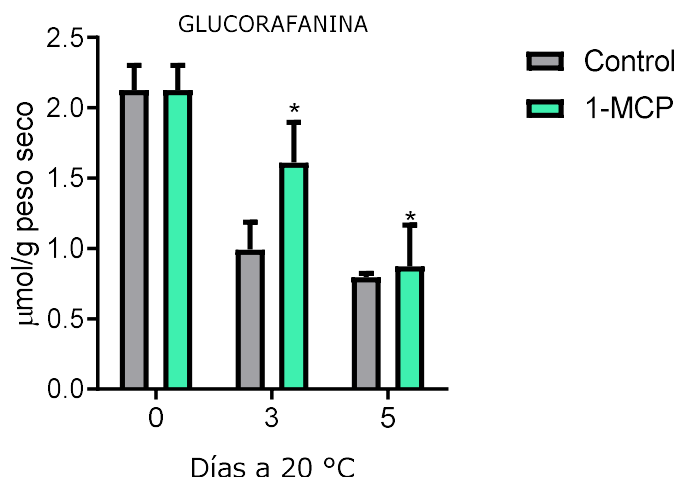
El tratamiento con 1-MCP causó un retraso en el amarillamiento de las cabezas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha, tal como se puede observar en la figura 5.2.1: A y B. El color superficial presentó diferencias significativas en las muestras tratadas con 1-MCP respecto de los controles al día 5 del almacenamiento a 20 °C, y también se observaron diferencias en el contenido de clorofilas totales al día 3 y al día 5. Previamente, se mencionó que el daño que se produce por la cosecha del brócoli y que desencadena la producción de etileno y a su vez el proceso de senescencia poscosecha. Este efecto puede ser retrasado por el tratamiento con 1-MCP al bloquear los receptores y por lo tanto la cascada de señalización de etileno. En este caso, se notó un retraso en el amarillamiento de las inflorescencias como consecuencia de una mayor retención de las clorofilas totales en aquellas muestras tratadas con 1-MCP respecto a los controles. Estos resultados son concordantes con lo que muestran estudios previos de nuestro grupo, en los que tanto la expresión génica de feofitinasasa (*BoPPH*) y feoforbida a oxigenasa (*BoPaO*), dos enzimas claves

en la degradación de la clorofila se ven reducidas con el tratamiento de 1-MCP (Gómez Lobato y col., 2012a, Gómez Lobato y col., 2012b).



**Figura 5.2.1: A.** Color superficial (ángulo HUE) y **B.** Contenido de clorofilas (mg clorofilas totales/ g tejido fresco) en las muestras control (gris) y tratadas con 1-MCP (verde) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

Se observó una disminución del contenido de glucorafanina a lo largo del almacenamiento poscosecha tanto en las muestras control como en aquellas tratadas con 1-MCP. Sin embargo, esta disminución fue menor en aquellas muestras tratadas, encontrando un mayor contenido de este glucosinolato (Figura 5.2.2) tanto al día 3 como al día 5 de almacenamiento poscosecha.

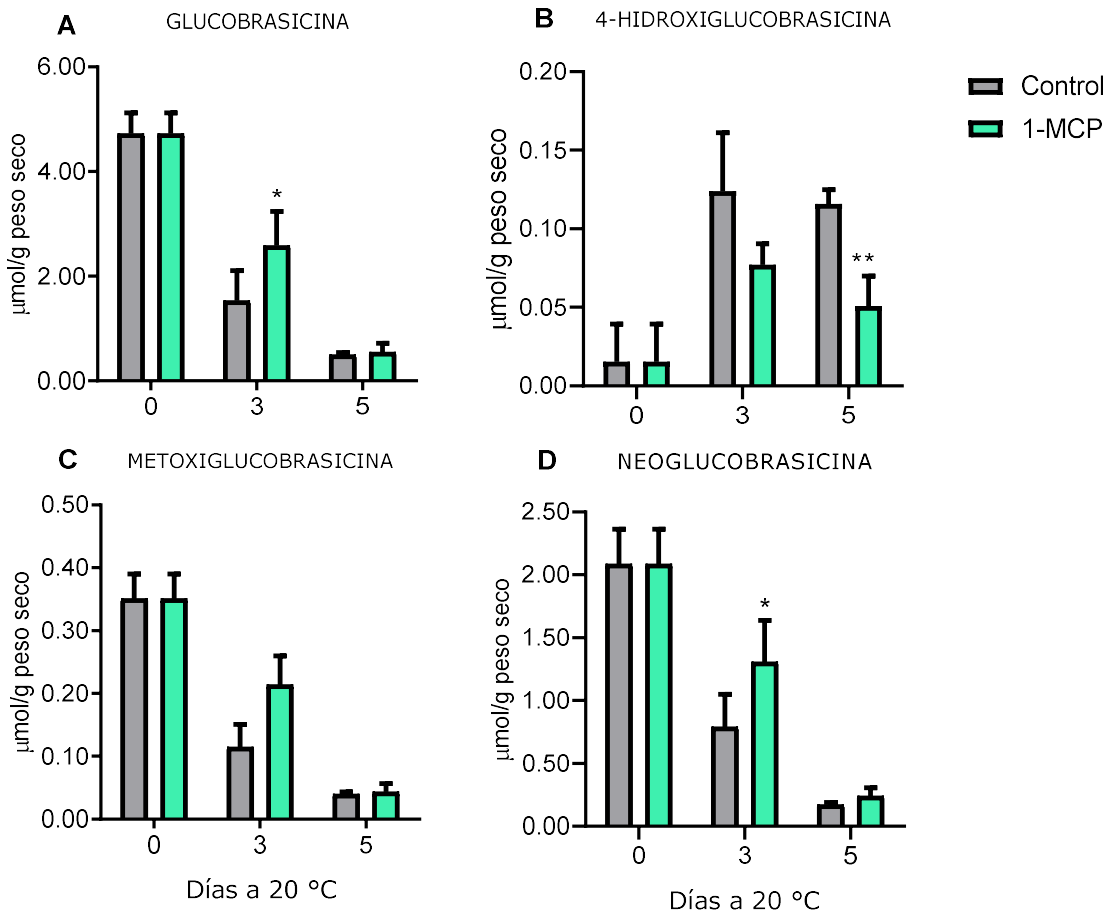


**Figura 5.2.2:** Contenido de glucorafanina expresado como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras control (gris) y tratadas con 1-MCP (verde) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

Previamente, cuando se analizó el efecto del etileno en el contenido de glucorafanina, se observó una disminución de la concentración de este glucosinolato en las muestras tratadas aún mayor que en los controles (Figura 5.2.3). Estos resultados, estarían en concordancia con el menor decaimiento de este glucosinolato a causa de la acción inhibitoria del 1-MCP. Otros autores reportaron un descenso del contenido de glucosinolatos alifáticos totales (71,2 %) después de 5 días de almacenamiento a 20 °C en floretes sin tratamientos, pero solo se redujeron en un 51,3 % en floretes tratados poscosecha con 2,5  $\mu\text{l/l}$  de 1-MCP (Yuan y col., 2010). Algo similar se informó con la concentración individual de la glucorafanina, con una disminución de un 78 % en las muestras control, pero de solo un 56 % en aquellas que fueron tratadas (Yuan y col., 2010). En cuanto al contenido de glucosinolatos indólicos, el tratamiento con 1-MCP causó una menor degradación de glucobrasicina, metoxiglucobrasicina y neoglucobrasicina (Figura 5.2.3: A, C y D), pero previno la acumulación de 4-hidroxiglucobrasicina hacia el final del almacenamiento (Figura 5.2.3, B). En las muestras tratadas con etileno, se había observado una disminución de los contenidos de los cuatro glucosinolatos indólicos estudiados tanto al día 3 como al día 5 de almacenamiento, sabiendo que el 1-MCP inhibe el efecto del etileno y a la vez la producción endógena del mismo que se podrá explicar una mayor retención de estos metabolitos por un menor avance de la senescencia a menor pérdida de la



integridad de las membranas, lo que lleva a una menor hidrólisis de los mismos ya que hay menos contacto con la enzima mirosinasa.



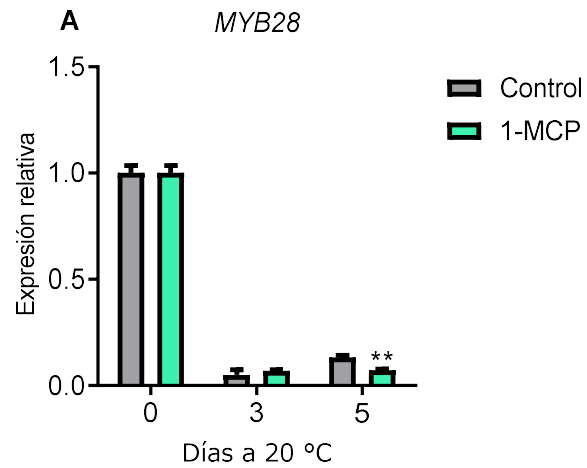
**Figura 5.2.3:** Contenido de glucosinolatos individuales expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras control (gris) y tratadas con 1-MCP (verde) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

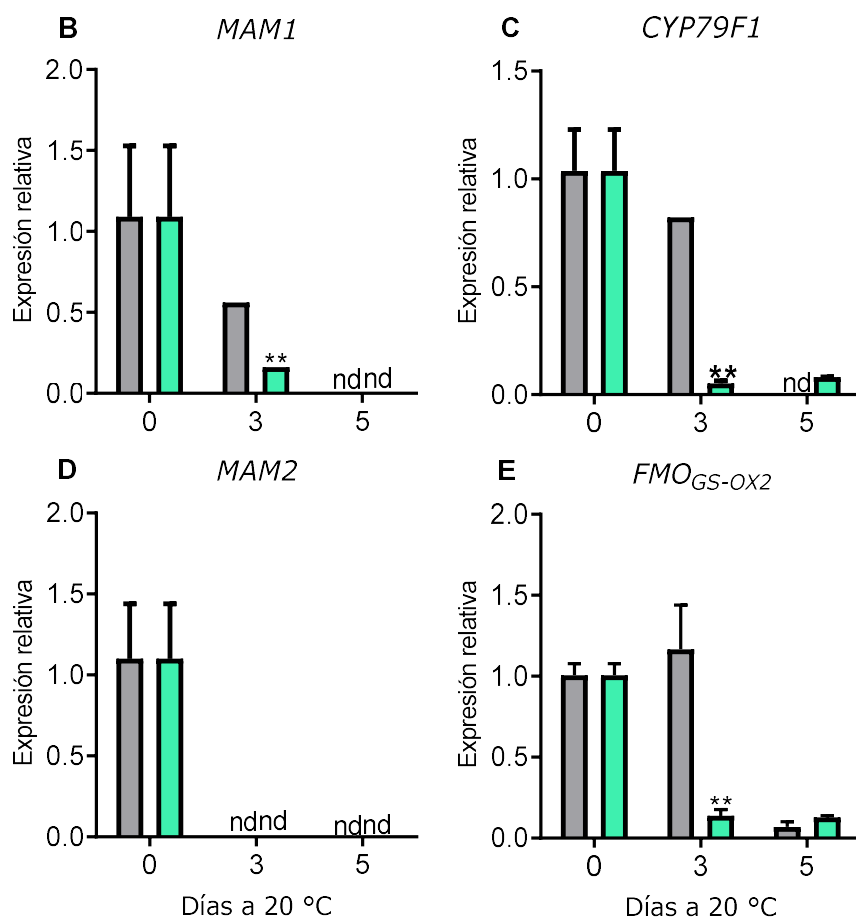
**A.** Glucobrasicina. **B.** 4-hidroxi-glucobrasicina. **C.** Metoxi-glucobrasicina. **D.** Neoglucobrasicina

Torres-Contreras y col. (2021) reportaron que la aplicación de 1-MCP causa una disminución en la acumulación de 4-hidroxi-glucobrasicina y metoxi-glucobrasicina. Estos autores propusieron que, en brócoli, la aplicación exógena poscosecha de 1-MCP ayuda a mantener la concentración de glucobrasicina mediante la inhibición de la 4-metilación de la glucobrasicina.

Al analizar la expresión de los genes vinculados con la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos, se encontró una fuerte disminución de los genes a lo largo

del almacenamiento, tanto en los controles como en aquellas muestras tratadas, siendo aún más baja esta expresión de los genes *MAM1*, *CYP79F1*, *FMO<sub>GS-OX2</sub>* en el día 3 en las muestras de 1-MCP y sin diferencias significativas hacia el día 5 entre el control y el tratamiento (Figura 5.2.4: B, C y E). En el caso del factor de transcripción *MYB28*, esta disminución de la expresión en las muestras tratadas se observa hacia el día 5 pero no al día 3 (Figura 5.2.4, A) y para el gen *MAM2*, se deja de detectar su expresión después del día de cosecha en los tiempos analizados (Figura 5.2.4, C)



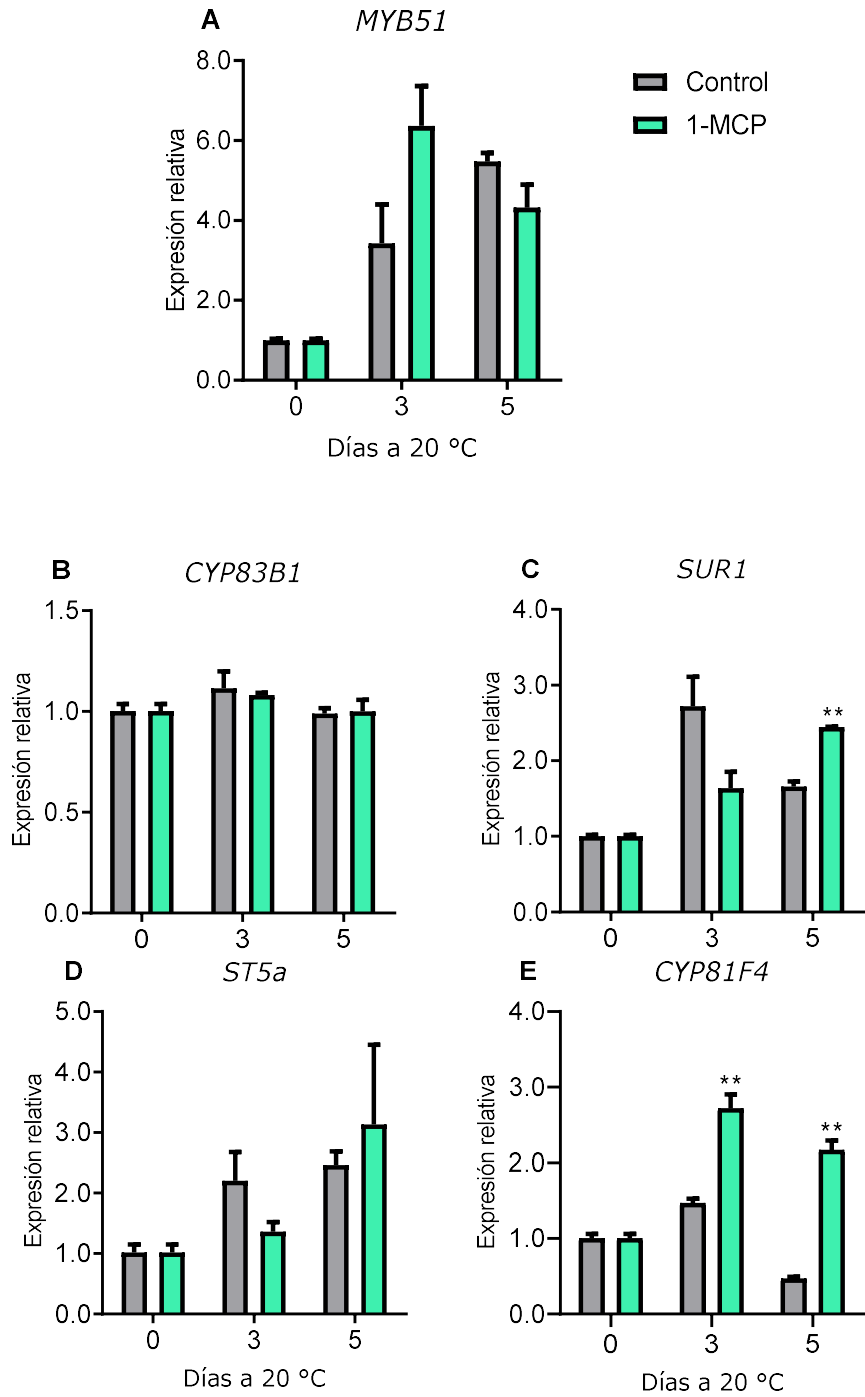


**Figura 5.2.4:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en las muestras control (gris) y tratadas con 1-MCP (verde) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMYB28*. **B.** *BoMAM1*. **C.** *BoCYP79F1*. **D** *BoMAM2*. **E.** *BoFMO<sub>GS-OX2</sub>*.

En el caso del estudio de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos, no se observaron diferencias en la expresión del factor de transcripción *MYB51*, ni en los genes *CYP83B1* y *ST5a* entre las muestras tratadas con 1-MCP y los controles a ninguno de los tiempos analizados (Figura 5.2.5: A, B y D). Ku y col. (2013) informaron que los genes de biosíntesis se regulan mediante señales mediadas por etileno y que el tratamiento con 1-MCP reduce la expresión de los genes de biosíntesis de GLS, incluido *CYP79B2* y *CYP83B1*, en nuestro caso observamos un aumento en la expresión del gen *CYP83B1* cuando fue tratado con etileno (Figura 5.2.5, B), pero no observamos una reducción significativa en las muestras tratadas con 1-MCP. Para el

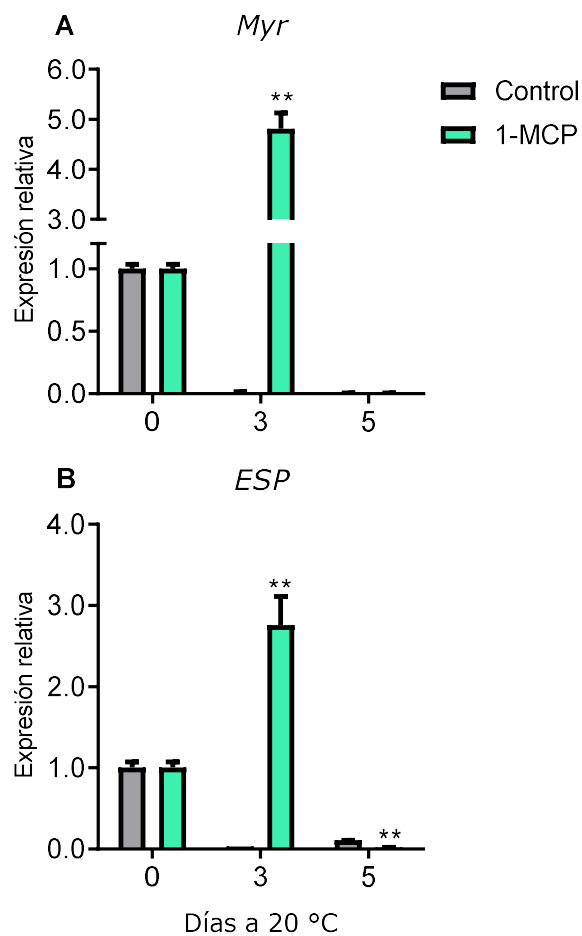
gen *SUR1* se vio un aumento en la expresión de este hacia el final del almacenamiento en las muestras tratadas, mientras que un aumento en la expresión del gen *CYP81F4* en las muestras tratadas se detectó tanto al día 3 como al día 5.



**Figura 5.2.5:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos en las muestras control (gris) y tratadas con 1-MCP (verde) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMYB51*. **B.** *BoCYP83B1*. **C.** *BoSUR1*. **D.** *BoST5a* **E.** *BoCYP81F4*

Finalmente, la expresión de los genes de degradación se vio afectada con el tratamiento con 1-MCP, con un aumento en la expresión del gen *Myr* (Figura 5.2.6, A) y el gen *ESP* (Figura 5.2.6, B) con valores fuertemente mayores a los iniciales.



**Figura 5.2.6:** Expresión relativa de los genes de degradación en las muestras control (gris) y tratadas con 1-MCP (verde) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMyr* **B.** *BoESP*

### 5.2.3 Conclusiones parciales

En general, el contenido total de los glucosinolatos decae marcadamente durante la senescencia poscosecha de brócoli. Aunque tomados individualmente el contenido de glucorafanina se mantiene, mientras que el de 4-hidroxiglucobrasicina (el glucosinolato que se encuentra en menor cantidad) aumenta. El tratamiento con etefón causa una mayor tasa de senescencia y, consecuentemente un mayor decaimiento del nivel de glucosinolatos. Por el contrario, aplicaciones de BAP y 1-MCP provocan un retraso en la senescencia y permiten mantener, en general, valores más altos de glucosinolatos. Trabajos previos sugieren que combinar el tratamiento de 1-MCP con 6-BAP, es una buena estrategia para extender la vida útil del brócoli, mantener la capacidad antioxidante y la biosíntesis de glucosinolatos en el almacenamiento poscosecha a 15 °C (Xu y col., 2012).

La acción del etileno debe ser tenida en cuenta de dos maneras posibles. El etileno es una hormona aceleradora de la senescencia, pero en condiciones de presenescencia puede ser un inductor de mecanismos de defensa, y, particularmente, de glucosinolatos. Al realizarse la cosecha, el corte ocasiona un daño mecánico que desencadena la producción de etileno, liberado principalmente en la zona de corte que es el tallo (Kato y col., 2002). A tiempos cortos, este etileno puede actuar como un desencadenante de mecanismos de defensa. Yuan y col. (2010) hallaron concentraciones contrastantes de glucosinolatos alifáticos entre cabezas de brócoli tratadas con 1-MCP y los respectivos controles, de acuerdo al tiempo de almacenamiento. A tiempos cortos detectaron mayores concentraciones de glucosinolatos en los controles, mientras que a mayores tiempos de almacenamiento fueron las muestras tratadas con 1-MCP las que mostraron mayores niveles de glucosinolatos. El 1-MCP probablemente causó la inhibición del etileno a tiempos cortos frenando la inducción de biosíntesis de glucosinolatos por el etileno generado en la cosecha, y posteriormente inhibió la senescencia y la consecuente degradación de glucosinolatos. En nuestro caso, al analizar el contenido luego de tres días, probablemente detectamos solamente el efecto del etileno en la concentración de glucosinolatos a través de su acción sobre la senescencia. El efecto del daño mecánico y el etileno sobre el metabolismo de glucosinolatos fue claramente demostrado por Torres-Contreras y col. (2021) quienes detectaron un fuerte incremento del contenido de glucosinolatos en brócoli procesado, lo que significa un

intenso daño mecánico en tiempos muy cortos (21 h), el cual fue además inhibido por el tratamiento con 1-MCP.

Los genes asociados a la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos mostraron un notable descenso de su expresión durante la poscosecha, tanto en las muestras control, como en las tratadas con etefón, BAP y 1-MCP. Por otro lado, en el caso de los genes vinculados con la biosíntesis de glucosinolatos indólicos se detectó una mayor expresión en las muestras tratadas con etileno y una menor expresión en las muestras tratadas con BAP, no mostrando correlación con el contenido de los respectivos glucosinolatos. El tratamiento con 1-MCP causó un efecto similar al BAP y contrario al etefón con expresiones iguales o menores que los controles luego de tres días de almacenamiento.



### ***Análisis del metabolismo de glucosinolatos en cabezas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha sometidas a tratamientos físicos***

#### **6.1 TRATAMIENTO CON LUZ VISIBLE CONTINUA**

##### *6.1.1 Introducción general*

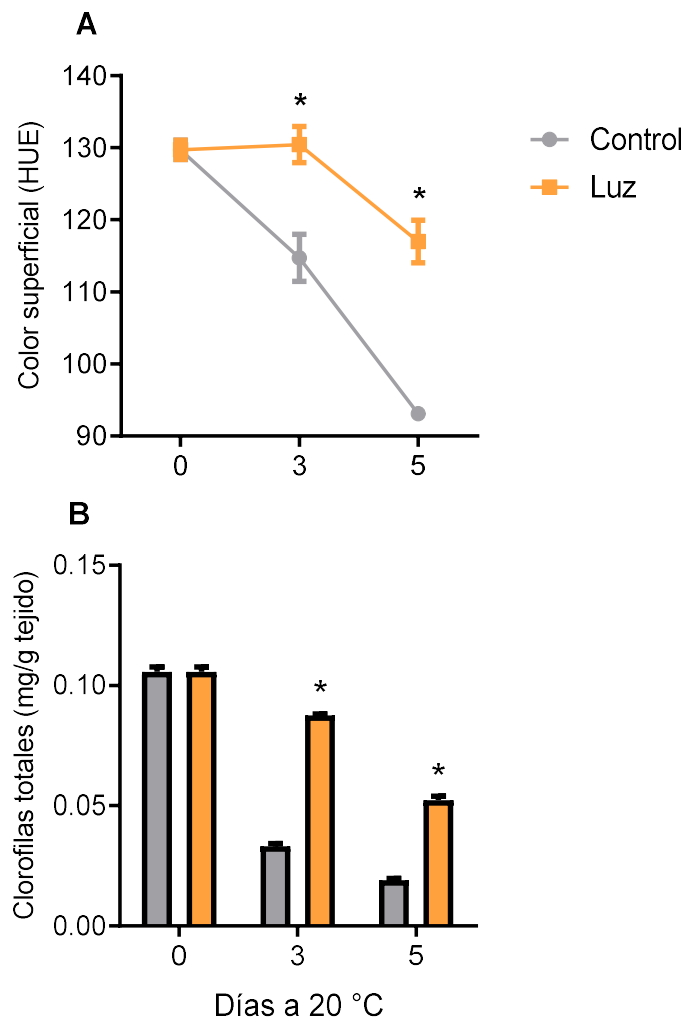
La regulación de la senescencia involucra factores medioambientales, tanto externos como internos. Después de la cosecha, las hojas mantienen la capacidad de responder a la luz, estimulando, y generando respuestas biológicas apropiadas, mediada por fotorreceptores (Woo y col., 2013). En hortalizas de hoja, se ha reportado que las hojas conservan la capacidad fotosintética y pueden responder a la luz una vez cosechadas (Liebsch y Keech, 2016). El beneficio o el daño de la luz durante la senescencia poscosecha, depende de la cantidad y la calidad de la irradiación utilizada, bajas intensidades de luz ( $5$  a  $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ) causan el incremento de la senescencia conocida como senescencia inducida por oscuridad, pero muy altas intensidades de luz pueden generar daño foto oxidativo debido a la ruptura del cloroplasto. Se ha observado que intensidades lumínicas cercanas a los  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , pueden ser utilizadas en distintos vegetales, para el retraso de la senescencia poscosecha. Se aplicaron tratamientos poscosecha con luz visible para la extensión de la vida útil de varios frutos y hortalizas, tales como melón (Filho y col., 2020), frutilla (Warner y col., 2021), kale (Bárcena y col., 2019), espinaca (Gergoff Grozeff y col., 2013), albahaca (Costa y col., 2013) y lechuga (Charles y col., 2018), entre otros.

Diversos estudios han mostrado que la exposición de las cabezas de brócoli a distintas calidades e intensidad de luz visible puede retrasar el avance de la senescencia, utilizando indistintamente lámparas fluorescentes (Charles y col., 2018; Büchert y col., 2011a; Jin y col., 2015a,b) o luces LED de diferentes longitudes de onda (Favre y col., 2018; Hasperué y col., 2016; Jiang y col., 2019) aplicadas de manera continua o a través de pulsos. Particularmente, el almacenamiento de cabezas de brócoli bajo luz visible continua de baja intensidad ( $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ),

tiene un efecto retardador de la senescencia durante la poscosecha (Büchert y col., 2011a).

### 6.1.2 Resultados y discusión

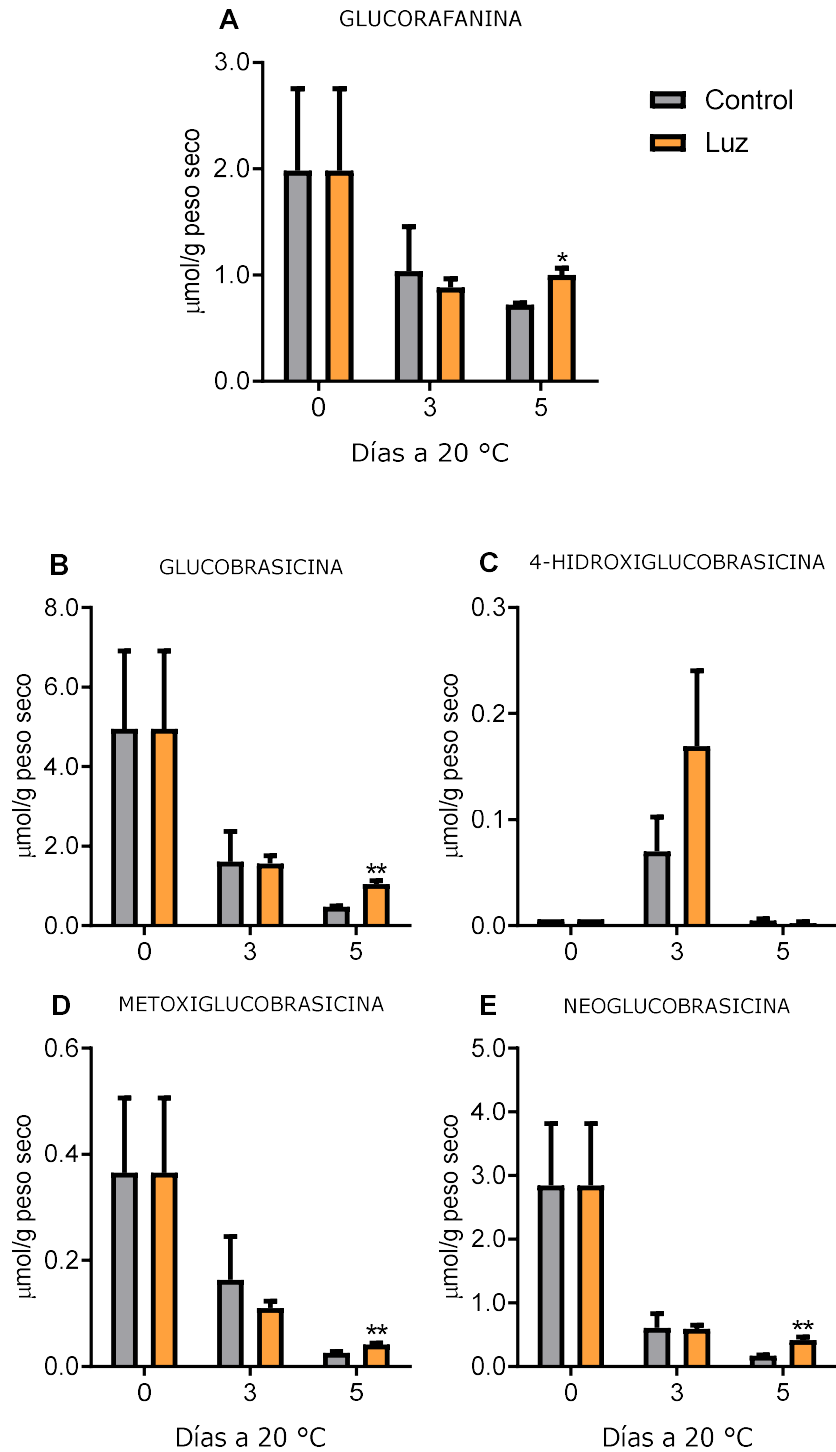
Para verificar la efectividad del tratamiento poscosecha utilizado, se midió el color superficial y el contenido de clorofilas totales. Como podemos observar en ambos gráficos (Figura 6.1.1: A y B), las muestras almacenadas bajo luz visible continua de baja intensidad mostraron una menor disminución de las clorofilas totales y por lo tanto una mayor retención del color verde durante el almacenamiento a 20 °C en comparación con aquellas que fueron almacenadas en oscuridad.



**Figura 6.1.1:** **A.** Color superficial (ángulo HUE) y **B.** Contenido de clorofilas (mg clorofilas totales/ g tejido fresco) en las muestras control (gris) y almacenadas bajo luz visible continua (naranja) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

Al analizar el contenido de glucosinolatos, se identificaron cinco glucosinolatos individuales, glucorafanina (alifático) y cuatro pertenecientes al grupo de indólicos: glucobrasicina, neoglucobrasicina, 4-hidroxi-glucobrasicina y metoxi-glucobrasicina.

Como se muestra en la Figura 6.1.2: A, B, D y E, se observó una importante disminución del contenido de glucorafanina, glucobrasicina, neoglucobrasicina y metoxi-glucobrasicina después de 3 días de almacenamiento, tanto para las muestras almacenadas en oscuridad (control) como las que se almacenaron bajo luz visible continua. De manera diferencial, el contenido de 4-hidroxi-glucobrasicina aumentó después de los tres días de almacenamiento, como ya se ha observado este perfil para este glucosinolato en tratamientos anteriores (Figura 6.1.2, C).



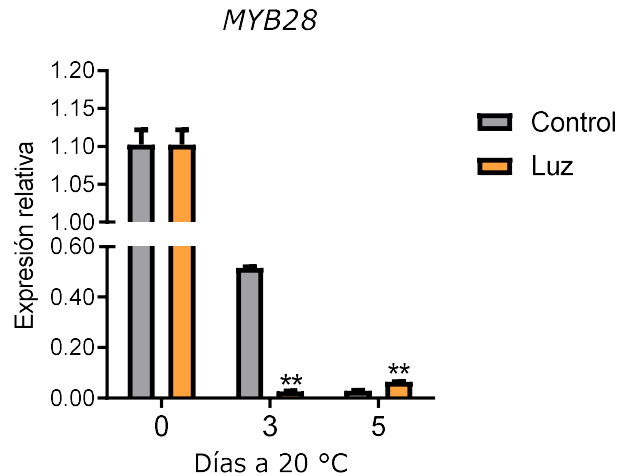
**Figura 6.1.2:** Contenido de glucosinolatos individuales expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras control (gris) y almacenadas bajo luz visible continua (naranja) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** Glucobrasicina. **B.** Glucobrasicina. **C.** 4-hidroxiglucobrasicina. **D.** Metoxiglucobrasicina. **E.** Neoglucobrasicina

A los cinco días de poscosecha, en las muestras controles, disminuyó el contenido de todos los glucosinolatos detectados. Las muestras tratadas con luz visible continua tienen un mayor contenido de glucorafanina, glucobrasicina, neoglucobrasicina y metoxiglucobrasicina que las muestras almacenadas en oscuridad hacia el final del almacenamiento. El impacto de la radiación visible, en el contenido de glucosinolatos ha sido estudiado durante el crecimiento. Neugart y col. (2018) describen un aumento en la biosíntesis de los glucosinolatos sujetos a una radiación media o alta, aunque también en algunos casos, radiación de baja intensidad induce un aumento de glucosinolatos indólicos como esta reportado para el caso de nabo (*Brassica rapa*) (Falovo y col., 2011) y brócoli (*Brassica oleracea*) (Schonhof y col., 2007a, 2007b).

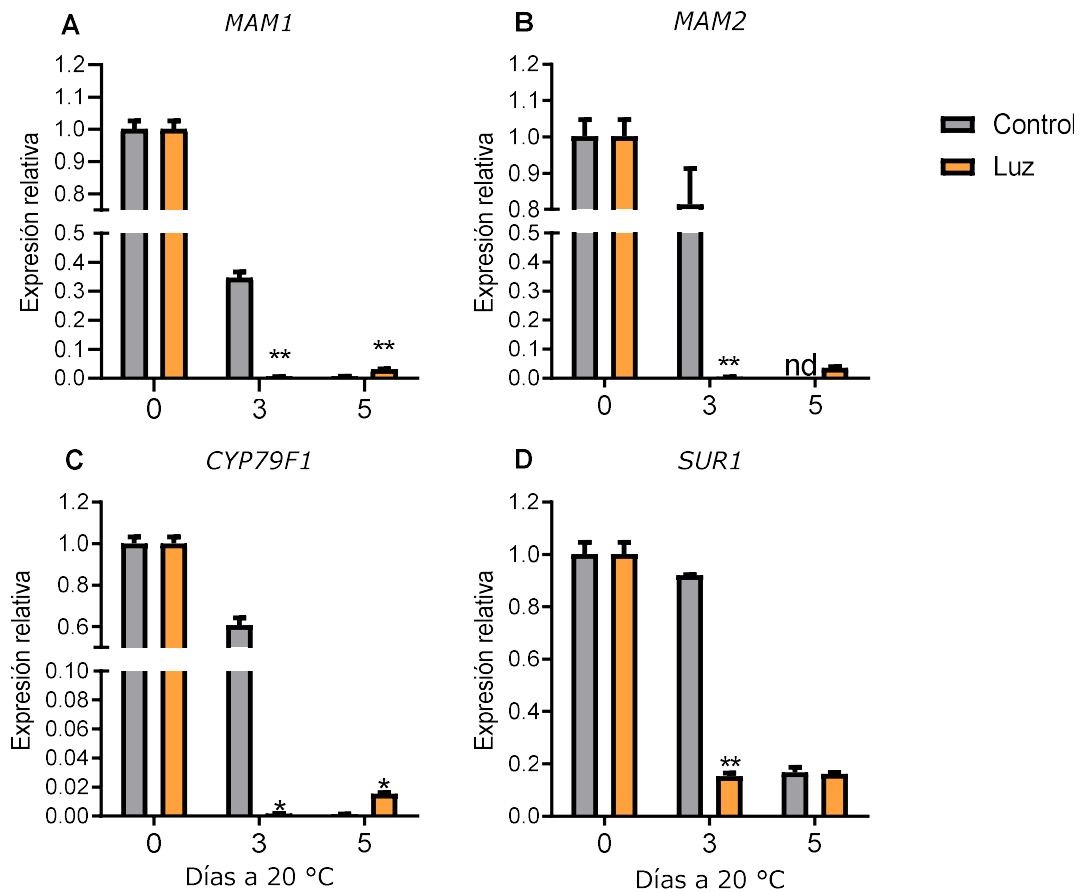
Rybarczyk-Plonska y col. (2016) mostraron que la aplicación de luz visible durante el almacenamiento a 10 o 18 °C, no tenía influencia en los niveles totales o individuales de glucosinolatos en las inflorescencias de brócoli. Jin y col. (2015a) encontraron que el almacenamiento poscosecha a 25 °C bajo luz verde LED puede usarse como una técnica que previene el decaimiento del contenido total de glucosinolatos en los floretes de brócoli. Por otro lado, Liu y col. (2015) señalaron que, tanto en kale como en coliflor, ciclos de luz-oscuridad permiten mayores niveles de glucosinolatos en comparación con el almacenamiento en oscuridad. Las respuestas variables a la radiación visible sugieren que el metabolismo de glucosinolatos podría estar sujeto a varios factores como la intensidad de radiación, la longitud de onda usada, y la temperatura a la que se realiza el almacenamiento de las cabezas. La expresión de los genes vinculados en la biosíntesis de glucosinolatos es regulada positivamente por la luz (Huseby y col., 2013; Schuster y col., 2006).

El factor de transcripción *MYB28* (Figura 6.1.3), mostró una menor expresión en las muestras almacenadas bajo luz en el día 3, pero esta tendencia se revirtió en el final del almacenamiento.



**Figura 6.1.3:** Expresión relativa del gen *BoMYB28* en las muestras control (gris) y almacenadas bajo luz visible continua (naranja) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

Se observó una disminución en la expresión de los genes *MAM1*, *MAM2* y *CYP79F1* luego de 3 días de almacenamiento y para todos los genes analizados a los cinco días en las muestras almacenadas en oscuridad (Figura 6.1.4: A, B y C). Las muestras irradiadas mostraron una mayor disminución en la expresión de todos los genes analizados después de 3 días con valores menores que sus controles, pero esta tendencia se revertió hacia el final del almacenamiento en la mayoría de los casos (*MAM1*, *MAM2*, *CYP79F1*), mientras que la expresión del gen *SUR1* (Figura 6.1.4, D) no varió. Schuster y col. (2006) observaron que el gen *MAM1* mostraba niveles de expresión más altos en las muestras que seguían almacenadas bajo luz visible continua respecto a aquellas en oscuridad. Un trabajo previo ha reportado que los genes biosintéticos de la vía de alifáticos son regulados de la misma manera que los genes de los factores de transcripción, incluyendo el gen *MYB28*, *MYB29* y *MYB76* (Huseby y col., 2013).

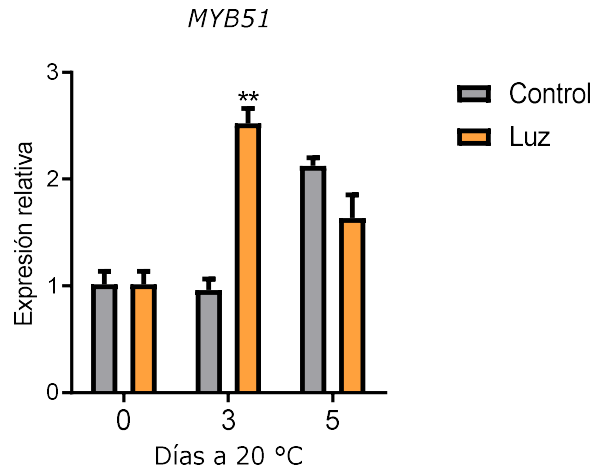


**Figura 6.1.4:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en las muestras control (gris) y almacenadas bajo luz visible continua (naranja) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMAM1*. **B.** *BoMAM2*. **C.** *BoCYP79F1*. **D.** *BoSUR1*

En el caso de la expresión de los genes de la biosíntesis de glucosinolatos indólicos, se encontró un aumento en la expresión para el factor de transcripción *MYB51* durante el almacenamiento poscosecha, siendo este aumento aún más marcado para el día 3 en las muestras irradiadas (Figura 6.1.5).

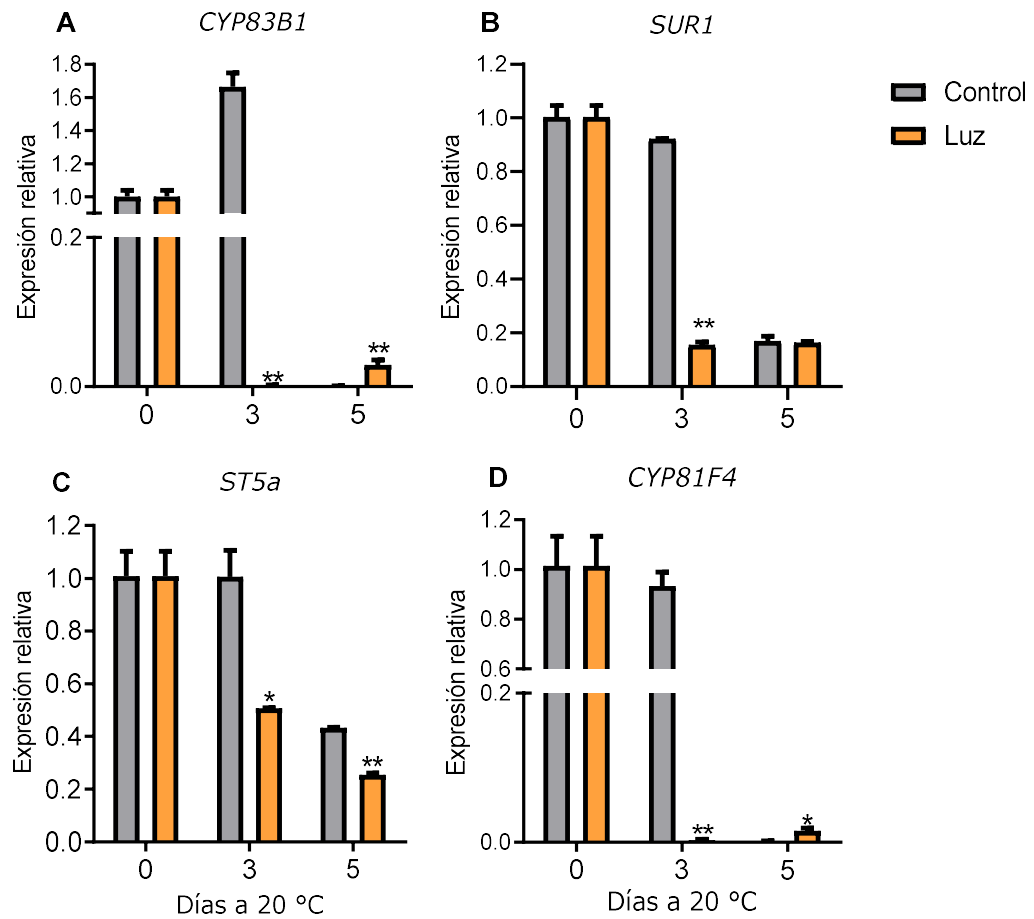
Asimismo, Huseby y col. (2013) encontraron que el principal factor de transcripción en la vía de GS indólicos, *MYB51* no presentó el mismo perfil de expresión en las muestras almacenadas bajo luz que los genes vinculados con esta vía de biosíntesis.



**Figura 6.1.5:** Expresión relativa del gen *BoMYB51* (A) en las muestras control (gris) y almacenadas bajo luz visible continua (naranja) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20°C.

Tal como se detectó en el caso de los genes vinculados con la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos, la expresión de los genes *CYP83B1*, *ST5a*, *CYP81F4* y *SUR1* disminuyeron su expresión hacia el día 3 en las cabezas que fueron almacenadas bajo iluminación con respecto a sus controles, y en el caso del gen *ST5a* esta tendencia se mantiene en el día 5. Este comportamiento se encuentra revertido hacia el final del almacenamiento, con una mayor expresión de los genes *CYP83B1* y *CYP81F4* (Figura 6.1.6: A, B, C y D)

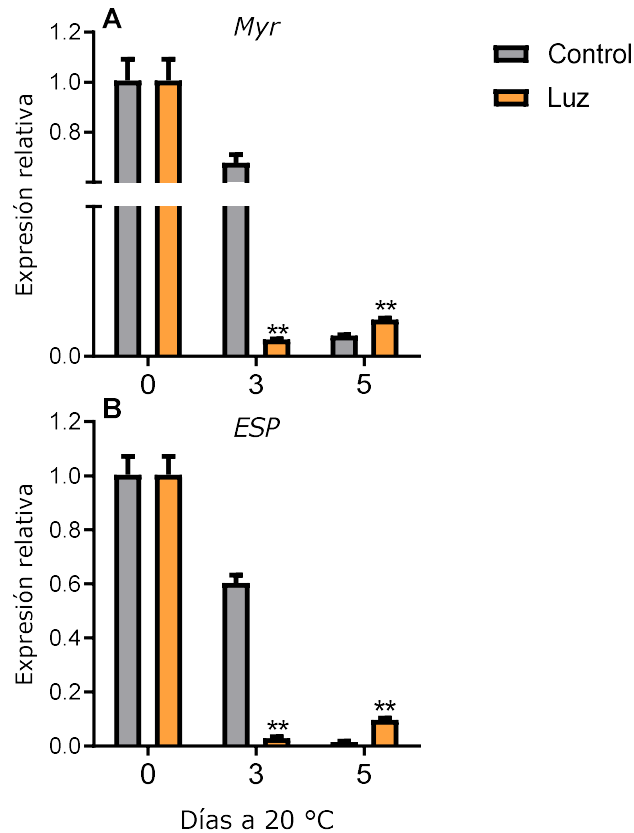




**Figura 6.1.6:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos en las muestras control (gris) y almacenadas bajo luz visible continua (naranja) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoCYP83B1*. **B.** *BoSUR1*. **C.** *BoST5a*. **D.** *BoCYP81F4*

En resumen, después de cinco días de almacenamiento, la expresión de la mayoría de los genes analizados fue mayor en las muestras tratadas respecto a sus controles. Un comportamiento similar se observó en los genes involucrados en la degradación de los glucosinolatos, *Myr* y *ESP* (Figura 6.1.7).



**Figura 6.1.7:** Expresión relativa de los genes de degradación en las muestras control (gris) y almacenadas con luz visible continua (naranja) al día 3 y día 5 de almacenamiento poscosecha a 20 °C.

A. *BoMyr* B. *BoESP*

Después de 3 días de almacenamiento, el contenido de glucosinolatos de las muestras almacenadas bajo luz visible continua no tiene diferencias significativas con los controles, mientras que la expresión de los genes involucrados en esta biosíntesis es menor. Las muestras almacenadas en oscuridad tienen una mayor expresión de los genes de biosíntesis, pero también es mayor la expresión de los genes de degradación. Una de las características de la senescencia, es la degradación de las membranas y por lo tanto la ruptura de la compartimentalización. Cuando la integridad de los tejidos se pierde, la mirosinasa puede entrar en contacto con su sustrato, los glucosinolatos e hidrolizar a los mismos. Jiang y col. (2019) mostraron que la peroxidación de lípidos, utilizada como un indicador del daño de membrana, es menor en el brócoli tratado con irradiación LED. Un menor deterioro de los tejidos en las

muestras almacenadas bajo luz (Büchert y col., 2011a, 2011b) puede resultar en una menor pérdida de la compartimentalización y un mayor contenido de glucosinolatos.

## **6.2 TRATAMIENTO CON RADIACIÓN UV-C**

### *6.2.1 Introducción general*

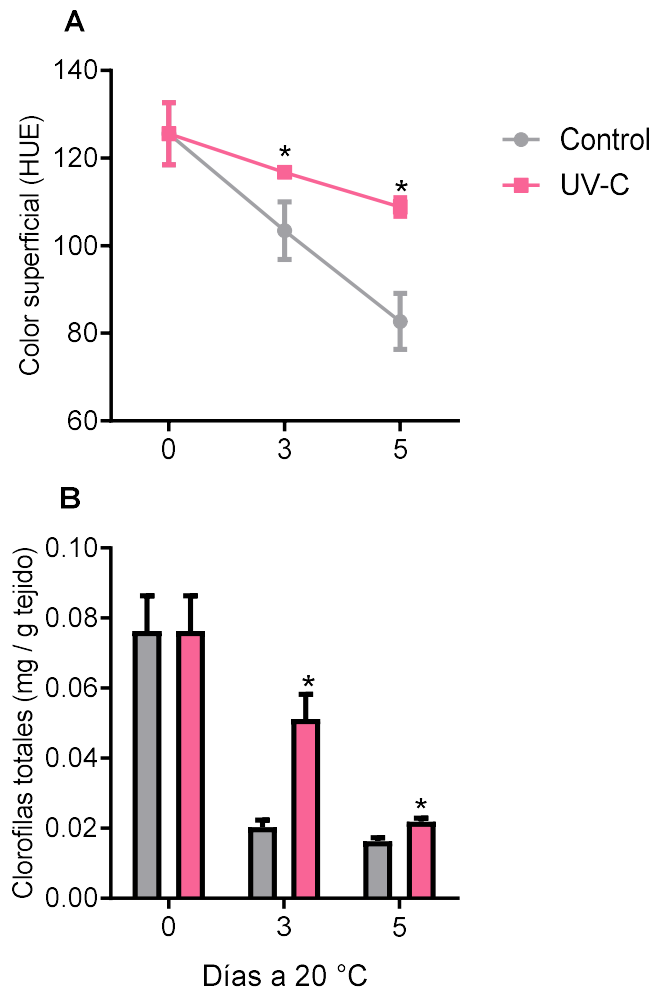
La radiación UV-C es una región de la radiación ultravioleta que abarca longitudes de onda entre los 200-280 nm, siendo la región más energética del espectro UV. La radiación UV-C posee fuertes propiedades germicidas, ya que produce daño en el ADN microbiano al formar dímeros entre las bases pirimidínicas impidiendo la replicación del material genético y siendo, de esta manera letal para los microorganismos (Esua y col., 2020). Aunque la radiación UV-C solar no puede alcanzar la superficie terrestre, ya que la misma es absorbida por el ozono, se conoce que la radiación ultravioleta es perjudicial para los tejidos vegetales. Sin embargo, la utilización de un agente que normalmente es perjudicial, puede ser empleado en bajas dosis, lo que en muchos casos permite obtener un efecto benéfico conocido como hormesis, y puede ser aplicado a la radiación UV-C. Ha sido reportado el uso de esta radiación como tratamiento poscosecha en muchos frutos y vegetales, para el control de enfermedades, el retardo de la senescencia y la maduración y para la reducción de daños (Civello y col., 2006). Las irradiaciones con UV-C se han mostrado eficaces para tratar las pérdidas poscosecha producidas por hongos en varios frutos (Cia y col., 2010), como son los casos de melón (Huang y col., 2015) y mango (George y col., 2016). Asimismo, se ha reportado que irradiaciones con UV-C disminuyen la actividad enzimática y la expresión génica que codifican para enzimas relacionadas con la degradación de componentes de la pared celular, y por lo tanto contribuyen a mantener la firmeza de ciertos frutos (Pombo y col., 2009; Liu y col., 2011). Estos tratamientos también han sido utilizados, para la inducción de la producción de metabolitos secundarios, como es el caso de los antioxidantes (Jagadeesh y col., 2011), inducción de fitoalexinas en cítricos (Palou, 2009), reducción en la velocidad de crecimiento de conidios (Pan y col., 2004), entre otras.

En brócoli se encontró que la aplicación de una dosis de 10 kJ/ m<sup>2</sup> de UV-C retrasa el amarillamiento de las cabezas cuando las mismas son almacenadas a 20

°C en oscuridad. Además, reduce el daño de los tejidos e incrementa la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos (Costa y col., 2006a).

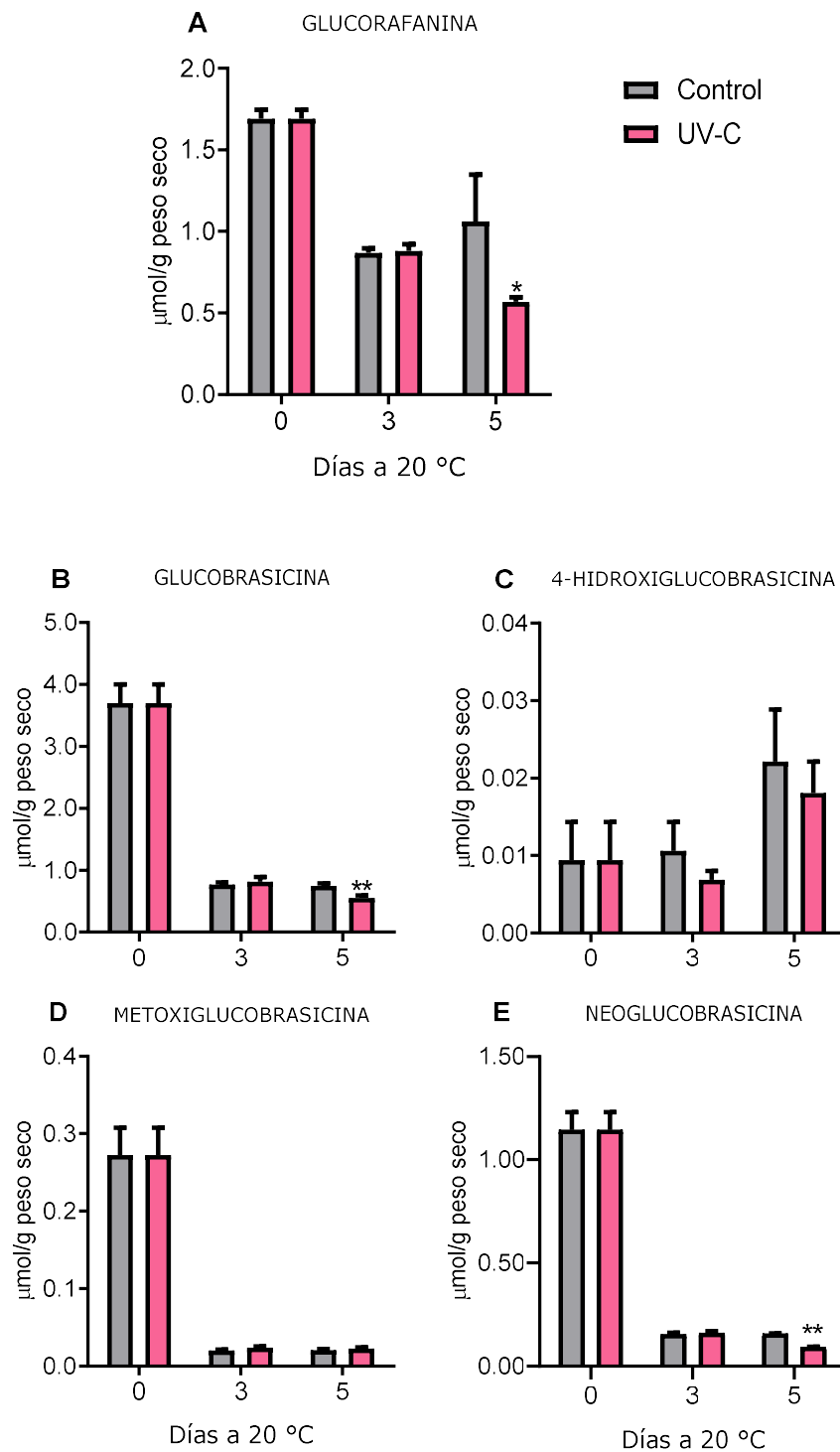
### *6.2.2 Resultados y discusión*

Las muestras irradiadas con UV-C, mostraron una menor degradación de las clorofilas (Figura 6.2.1, B) y un menor descenso de los valores de HUE (Figura 6.2.1, A), siendo significativas estas diferencias al día 3 y día 5 de almacenamiento. Costa y col. (2006a) mostraron que la irradiación de las cabezas con una dosis de  $10 \text{ kJ m}^{-2}$  retrasó no solo la degradación de las clorofilas a y b, sino también disminuyó la actividad de enzimas de la vía de degradación de las clorofilas como son las clorofilasas y clorofilas-peroxidasas, permitiendo la extensión de la vida útil de esta hortaliza.



**Figura 6.2.1: A.** Color superficial (ángulo HUE) y **B.** Contenido de clorofilas (mg clorofilas totales/ g tejido fresco) en las muestras control (gris) y tratadas con UV-C (fucsia) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

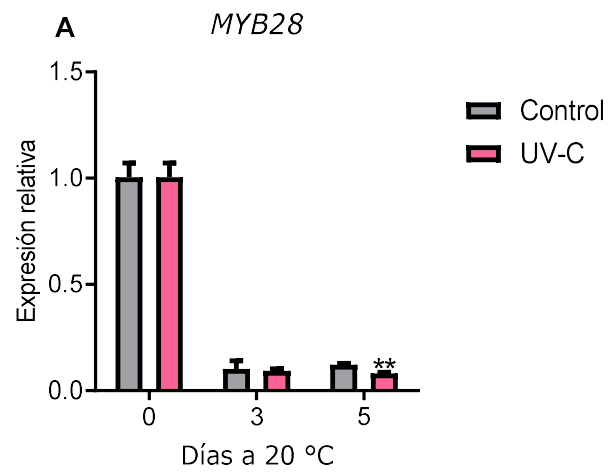
Para todos los glucosinolatos individuales identificados y cuantificados, no se observaron diferencias en los contenidos de glucorafanina, glucobrasicina, 4-hidroxi glucobrasicina, metoxi glucobrasicina y neogluco brasicina en el día 3 entre las muestras controles y aquellas irradiadas con UV-C (Figura 6.2.2: A, B, C, D y E). Hacia el final del almacenamiento, se encontraron diferencias en el contenido de glucorafanina, glucobrasicina y neogluco brasicina, encontrándose una menor concentración de estos glucosinolatos, y sin diferencias en las concentraciones de 4-hidroxi glucobrasicina y metoxi glucobrasicina.

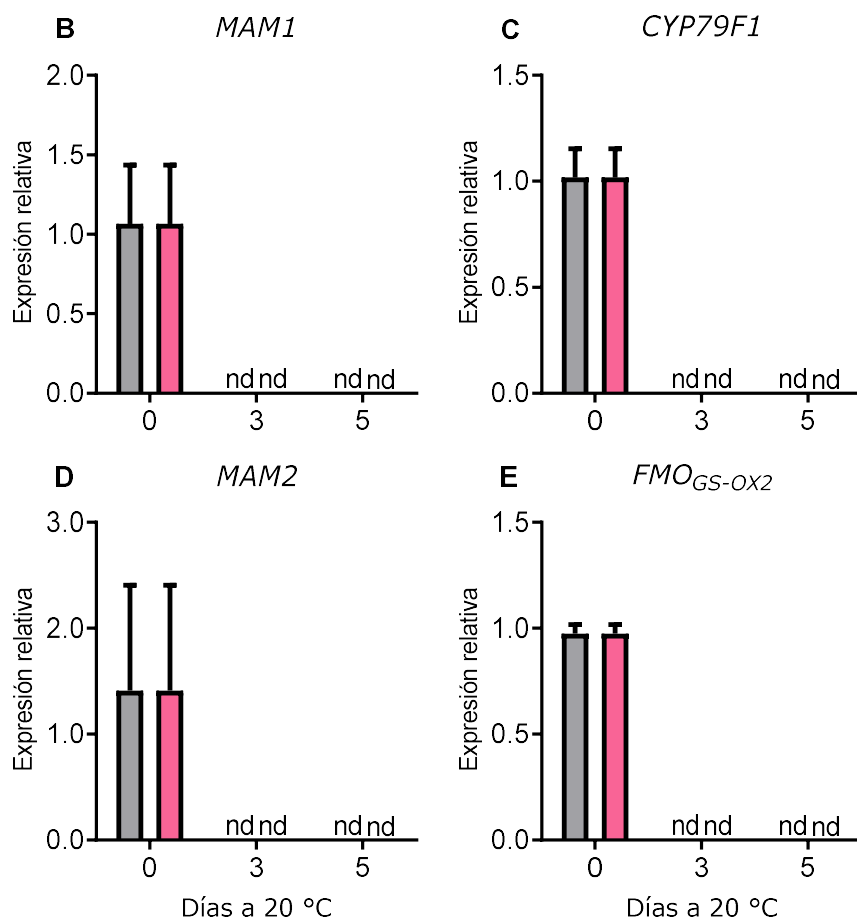


**Figura 6.2.2:** Contenido de glucosinatos individuales expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras control (gris) y tratadas con UV-C (fucsia) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** Glucorafanina. **B.** Glucobrasicina. **C.** 4-hidroxi-glucobrasicina. **D.** Metoxi-glucobrasicina. **E.** Neoglucobrasicina

En cuanto a los genes relacionados con la vía de biosíntesis de GLS alifáticos, no se detectó expresión de ninguno de los genes a lo largo del almacenamiento poscosecha tanto para las muestras control como para las tratadas (Figura 6.2.3: B ,C, D y E). En el caso del factor de transcripción *MYB28*, también se observó un fuerte decaimiento de la expresión respecto al valor inicial, y diferencias en la expresión en el día 5, siendo menor en la muestra irradiada con UV-C que en el control (Figura 6.2.3, A).





**Figura 6.2.3:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en las muestras control (gris) y tratadas con UV-C (fucsia) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

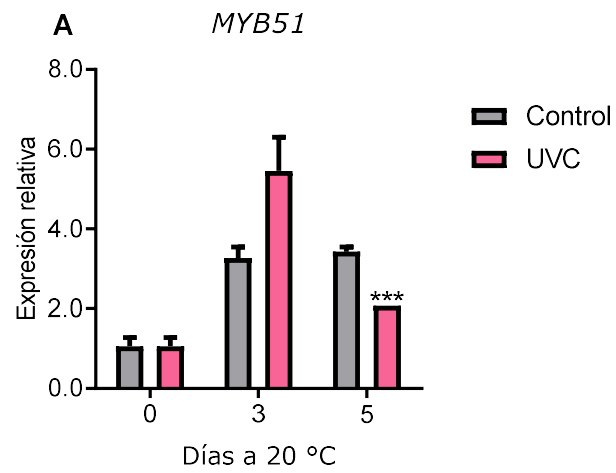
**A.** *BoMYB28*. **B.** *BoMAM1*. **C.** *BoCYP79F1*. **D.** *BoMAM2*. **E.** *BoFMO<sub>GS-OX2</sub>*

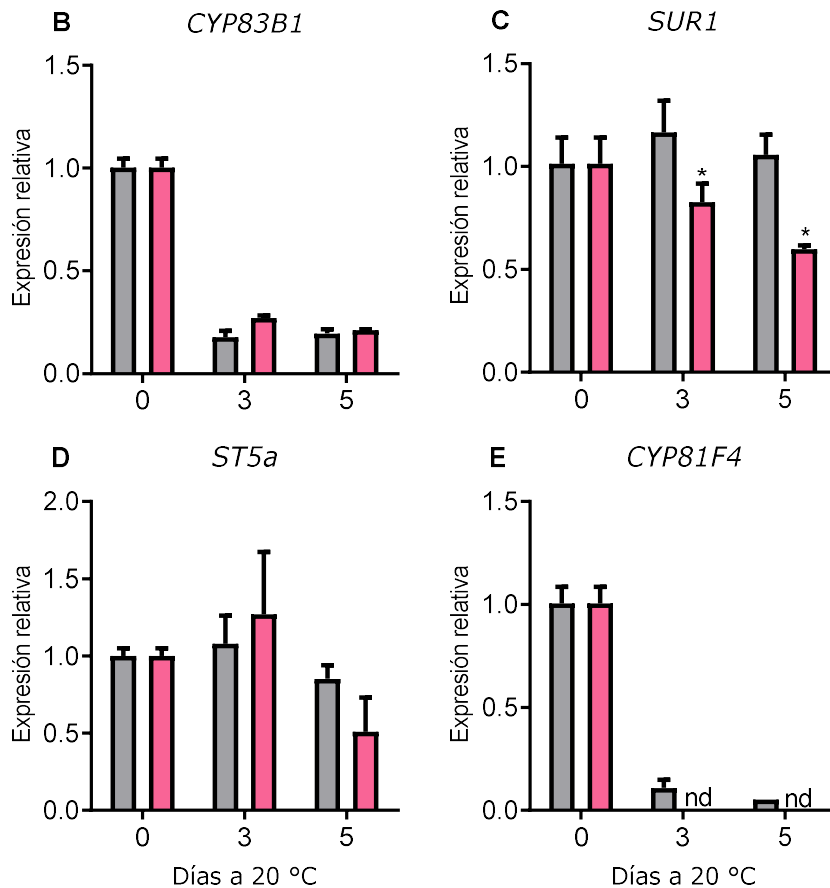
Asimismo, se observó una mayor expresión de los genes vinculados con la biosíntesis de GLS indólicos, en el caso del factor de transcripción *MYB51*, se observó un perfil similar que en el caso del gen *MYB28*, sin diferencias en el día 3, pero con una menor expresión en las muestras tratadas con UV-C respecto al control al final del almacenamiento (Figura 6.2.4, A).

Para el caso del gen *CYP83B1* se observó un decaimiento de la expresión conforme avanzó la senescencia, pero esta disminución fue similar entre los controles y las muestras irradiadas (Figura 6.2.4, B). El gen *ST5a* mostró un perfil de expresión muy similar entre el valor inicial y durante el almacenamiento (Figura 6.2.4, D) y en el



caso de los genes *SUR1* y *CYP81F4* (Figura 6.2.4: C, E), tanto en el día 3 como en el día 5 se encontró una menor expresión de los genes para las muestras irradiadas respecto a sus controles, siendo el caso del gen *CYP81F4* sin detectar expresión de este gen para las muestras de UV-C.



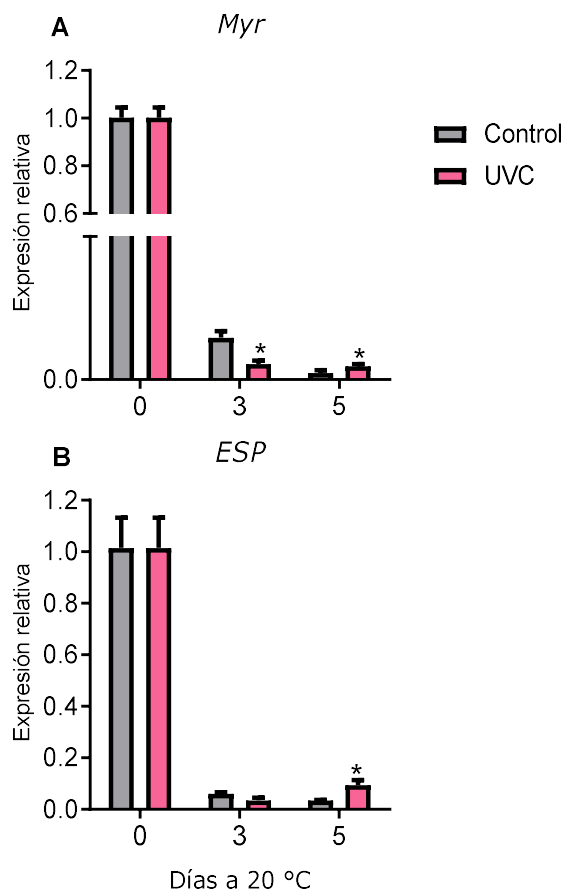


**Figura 6.2.4:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos en las muestras control (gris) y tratadas con UV-C (fucsia) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMYB51*. **B.** *BoCYP83B1*. **C.** *BoSUR1*. **D.** *BoST5a*. **E.** *BoCYP81F4*

**B.**

En los genes de degradación *Myr* y *ESP* (Figura 6.2.5: A, B) se observó una mayor expresión de dichos genes en las muestras tratadas con UV-C en el día 5 de almacenamiento a 20 °C. Tomando en conjunto la expresión observada en los factores de transcripción de ambas vías de biosíntesis, donde la expresión se ve disminuida en las muestras de UV-C y la degradación aumentada, se podría explicar la menor concentración de glucorafanina, glucobrasicina y neoglucobrasicina hacia el final del almacenamiento en aquellas muestras que fueron sometidas a la irradiación UV-C.



**Figura 6.2.5:** Expresión relativa de los genes de degradación en las muestras control (gris) y tratadas con UV-C (fucsia) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMyr*. **B.** *BoESP*

Se conoce que irradiaciones precosecha con UV-B, puede inducir la acumulación de algunos glucosinolatos en plantas del género *Brassica* (Reifenrath y Müller, 2007; Mewis y col., 2012). Hay reportes donde irradiaciones periódicas con UV-B precosecha permiten aumentar la concentración de los glucosinolatos en brotes de kale (Castillejo Montoya y col., 2021) y estudios con irradiaciones poscosecha UV-A y UV-B en brotes de brócoli que permiten aumentar la acumulación de compuestos fitoquímicos tales como fenoles y flavonoides y de glucosinolatos totales, siendo mayor el aumento de estos últimos compuestos en aquellos brotes irradiados con UV-B pasadas las 24 h de la cosecha (Moreira-Rodríguez y col., 2017).

### 6.2.3 Conclusiones parciales

El uso de luz visible durante el almacenamiento poscosecha de brócoli puede retrasar la senescencia y la pérdida del color verde (Büchert y col., 2011a).

Análogamente, un pulso de UV-C previo al almacenamiento poscosecha, puede otorgar los mismos beneficios. Estas técnicas poscosecha son potencialmente útiles para mantener la calidad organoléptica y un menor decaimiento del contenido de glucosinolatos después de cinco días de almacenamiento. Se ha reportado que los genes del metabolismo de GLS son altamente regulados por la luz, pero no de manera completamente coordinada (Huseby y col., 2013).

La mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis y degradación de los GLS mostraron una menor expresión después de 3 días de almacenamiento, pero esta tendencia se revierte después de cinco días en las cabezas de brócoli almacenadas bajo luz visible continua, permitiendo no solo mantener una mejor calidad visual sino también mayores contenidos de glucosinolatos. De manera contraria, la irradiación de las cabezas con UV-C, permite mantener la calidad organoléptica del brócoli, pero no contribuye a mantener el contenido de glucosinolatos durante el almacenamiento.

## 6.3 TRATAMIENTO TÉRMICO

### 6.3.1 Introducción general

Los tratamientos térmicos (TT) posteriores a la cosecha pueden constituir una aplicación útil para diversas problemáticas que surgen durante el almacenamiento poscosecha de frutas y hortalizas, como por ejemplo control de patógenos, retraso de maduración y senescencia y disminución de diversos tipos de desórdenes (Lurie y Pedreschi, 2014). En el caso de control de patógenos, los tratamientos térmicos han logrado reducir el desarrollo de hongos en mandarina (Queb-González y col., 2020), manzanas, peras, cítricos (Yun y col., 2013), durazno (Zhang y col., 2011), tomate (Luengwilai y col., 2012) y bayas (Sui y col., 2016), entre otras. Asimismo, esta metodología permite disminuir la producción de etileno y otros aspectos asociados a la maduración de frutos, retrasar el avance de la senescencia poscosecha de

hortalizas y disminuir el pardeamiento no enzimático en muchas frutas y hortalizas (Mahajan y col., 2014)

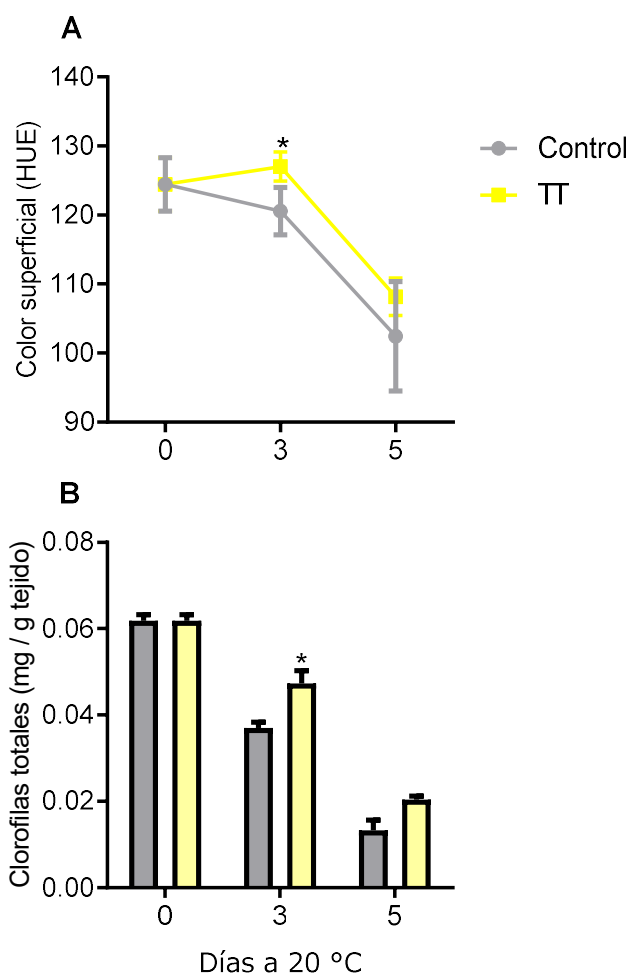
La temperatura y la duración del tratamiento térmico se determina empíricamente para cada cultivo a tratar en particular (Lurie y Pedreschi, 2014), pudiendo variar desde unas pocas horas, hasta varios días y en un amplio rango de temperaturas, con métodos como agua, vapor o aire caliente.

Los tratamientos térmicos provocan cambios moleculares, que incluso pueden ocurrir luego de que la exposición al calor ha terminado, como la acumulación de proteínas de estrés y defensas, conocidas como proteínas de choque térmico (HSP), así como también compuestos con capacidad antioxidante como los fenoles.

En brócoli, se ha descrito que los tratamientos térmicos contribuyen a disminuir la tasa de senescencia durante el almacenamiento poscosecha, causando particularmente un retraso en la degradación de clorofilas (Costa y col., 2005b; Lemoine y col., 2009; Duarte-sierra y col., 2017), además de una conservación de la capacidad antioxidante (Funamoto y col., 2002; Duarte-sierra y col., 2017).

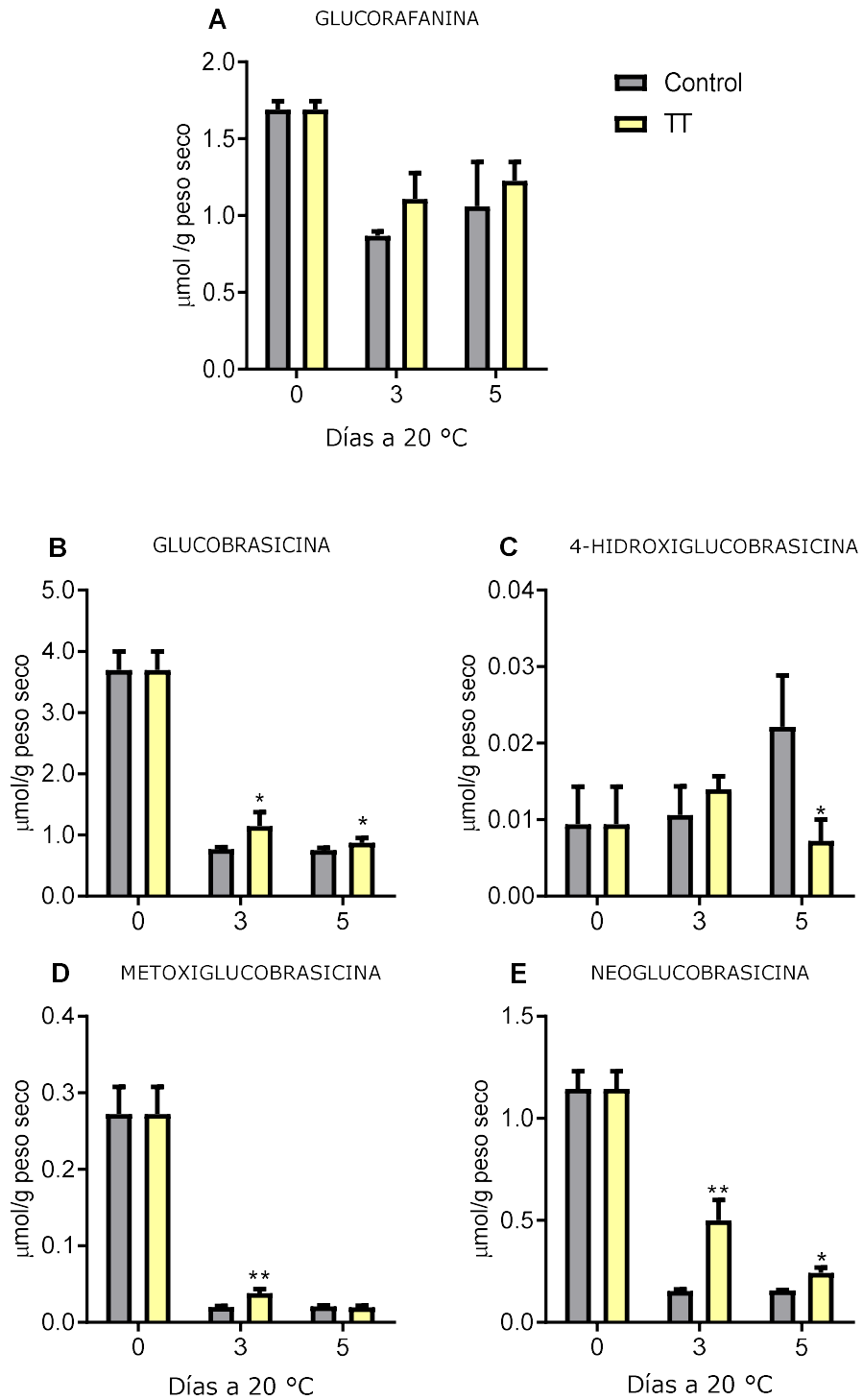
### *6.3.2 Resultados y discusión*

Se realizaron medidas del color superficial y contenido de clorofilas totales al tiempo inicial y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C (Figura 6.3.1). Se puede observar que las muestras tratadas térmicamente (TT) presentaron una mayor retención del contenido de clorofilas y conservación del color al día 3, mientras que no se observaron diferencias hacia el final del almacenamiento en ninguno de los dos parámetros analizados.



**Figura 6.3.1:** **A.** Color superficial (ángulo HUE) y **B.** Contenido de clorofilas (mg clorofilas totales/ g tejido fresco) en las muestras control (gris) y tratadas térmicamente (amarillo) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

Con respecto al contenido de glucosinolatos alifáticos, se identificó y cuantificó el glucosinolato glucorafanina, pero no se encontraron diferencias en el contenido durante el almacenamiento poscosecha (Figura 6.3.2, A).



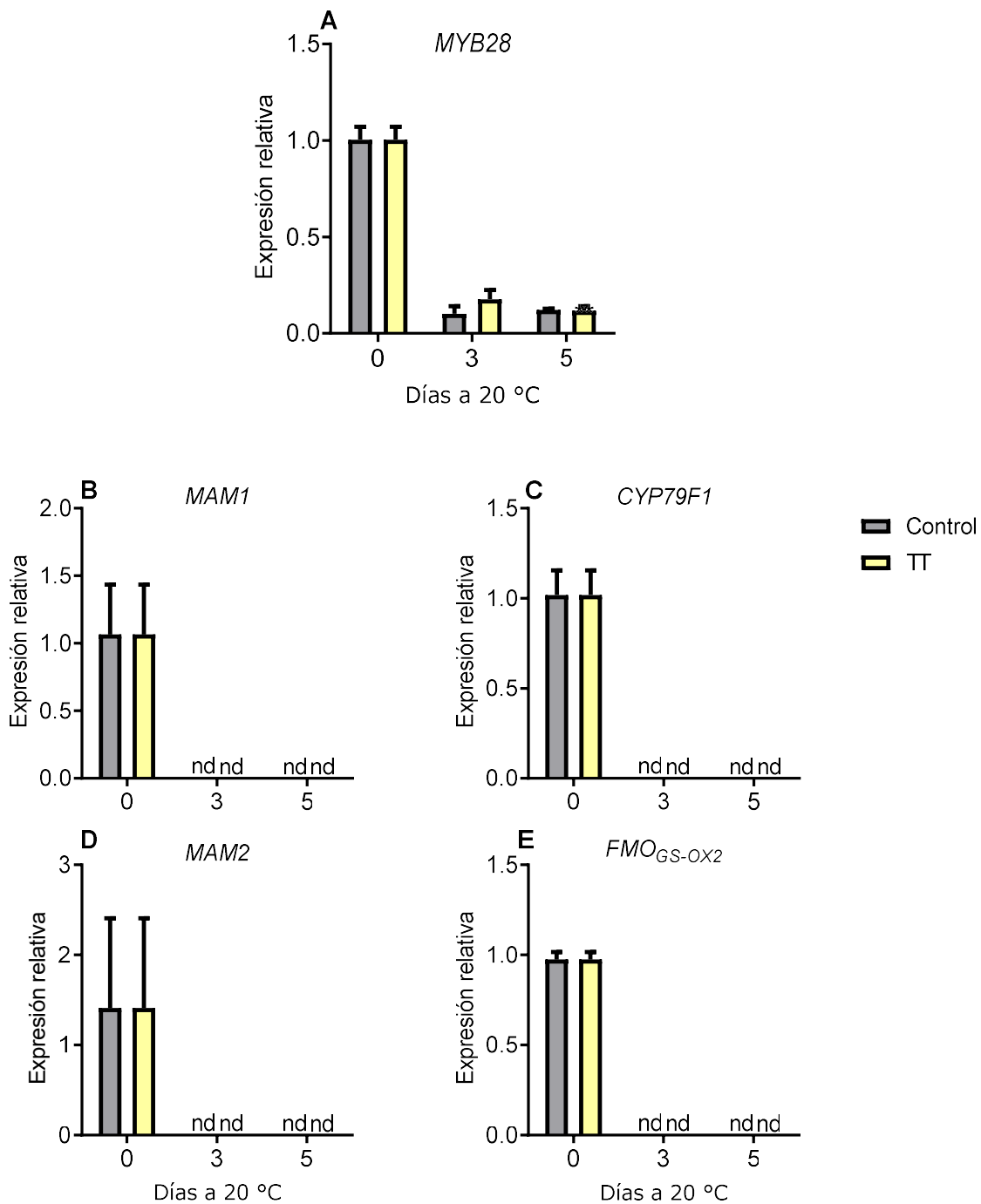
**Figura 6.3.2:** Contenido de glucosinatos individuales expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras control (gris) y tratadas térmicamente (amarillo) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** Glucorafanina. **B.** Glucobrasicina. **C.** 4-hidroxiglucobrasicina. **D.** Metoxiglucobrasicina. **E.** Neoglucobrasicina

Se detectó un descenso en el contenido de glucosinolatos indólicos, tales como glucobrasicina, metoxiglucobrasicina y neoglucobrasicina durante el almacenamiento a 20 °C. Sin embargo, las muestras que fueron sometidas al tratamiento térmico mostraron un mayor contenido de estos compuestos en este período. En el caso de 4-hidroxi-glucobrasicina no se detectaron diferencias en los valores iniciales ni al día 3, pero en el día 5 se encontró una menor concentración de este glucosinolato en aquellas muestras sometidas a altas temperaturas (Figura 6.3.2: B, C, D y E). Como se ha mencionado previamente, la acumulación de glucosinolatos puede verse afectada por la exposición a diferentes tipos de estrés abiótico, ya que estos metabolitos están implicados en una respuesta de defensa. Estudios previos, han reportado que la biosíntesis de glucosinolatos puede estar vinculada con el estrés por calor (Hara y col., 2013; Guo y col., 2016). Sin embargo, en nuestro caso, es probable que el mayor contenido de glucosinolatos en las muestras tratadas térmicamente sea ocasionado por el retraso general de la senescencia que provoca este tratamiento.

Con respecto a la expresión de los genes vinculados con la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos, se encontró una fuerte disminución del factor de transcripción *MYB28* durante el almacenamiento, sin diferencias entre las muestras control y tratadas (Figura 6.3.3, A). Los genes de biosíntesis solo mostraron expresión en el día de cosecha (día 0), sin poder detectar expresión de estos durante el almacenamiento poscosecha tanto para las muestras control como para las cabezas tratadas térmicamente (Figura 6.3.3: B, C, D y E)

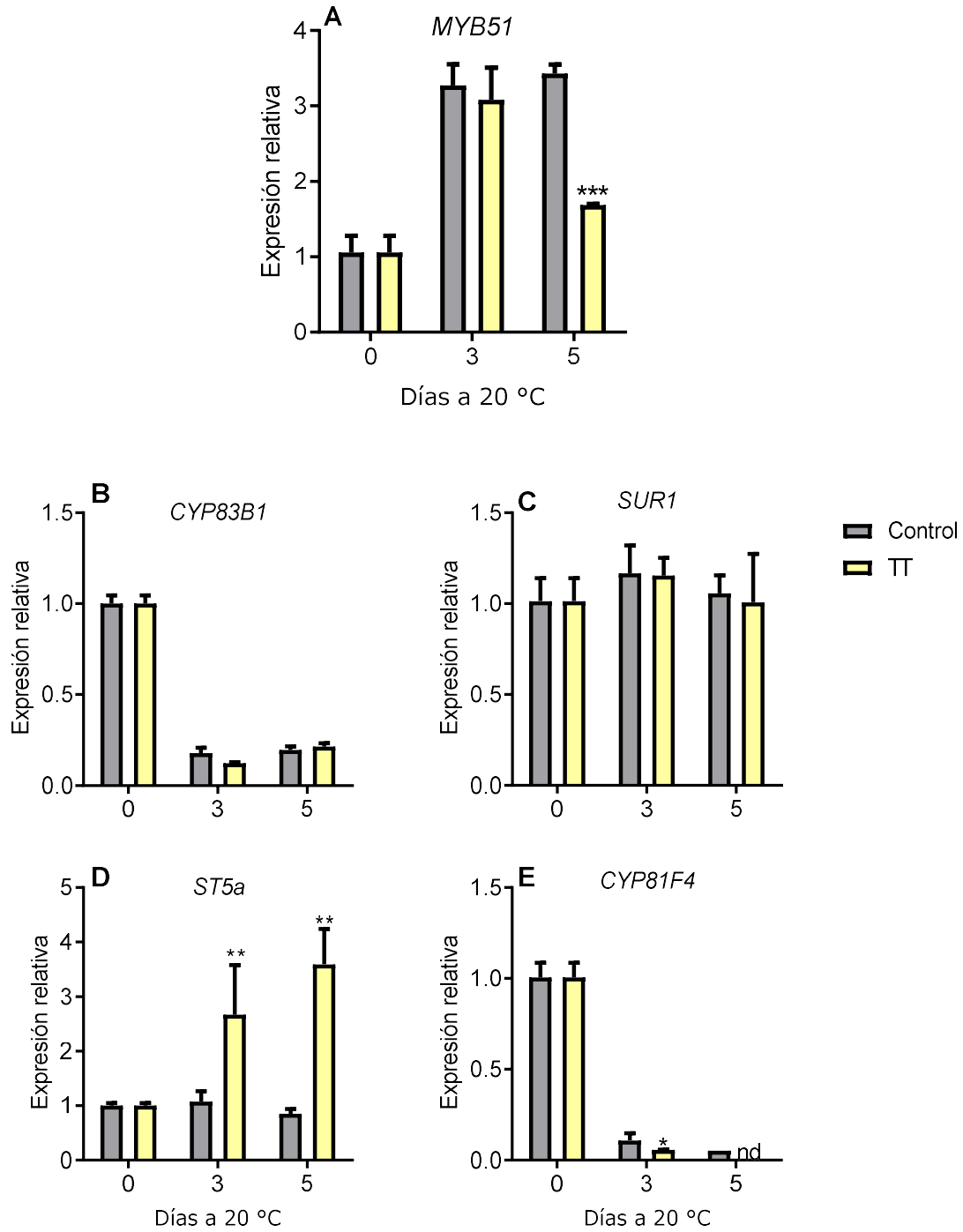




**Figura 6.3.3:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en las muestras control (gris) y tratadas térmicamente (amarillo) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMYB28*. **B.** *BoMAM1*. **C.** *BoMAM2*. **D.** *BoCYP79F1*. **E.** *BoSUR1*

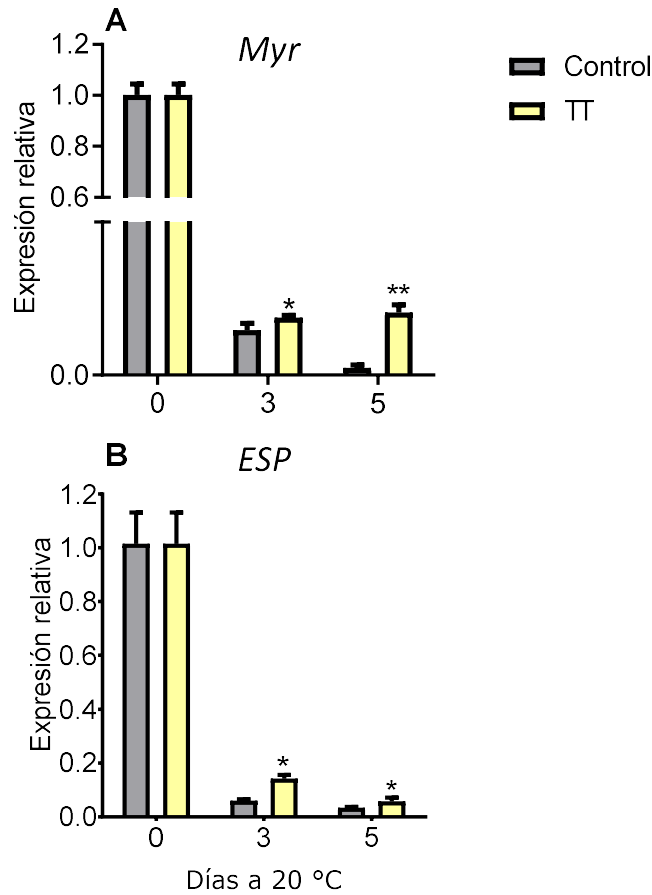
En el caso de la expresión de los genes asociados a la biosíntesis de glucosinolatos indólicos, en general no se detectó un descenso tan marcado en su expresión durante la senescencia poscosecha. El factor de transcripción *MYB51* mostró un aumento en su expresión a medida que transcurre la senescencia, sin encontrarse diferencias entre el control y el tratado al día 3, pero con una disminución de este gen en las muestras tratadas térmicamente al día 5 respecto a su control (Figura 6.3.4, A). El gen de biosíntesis *SUR1* no mostró cambios de expresión durante el almacenamiento y no se detectaron diferencias entre las muestras control y tratadas. Los genes de biosíntesis *CYP83B1* y *CYP81F4* presentaron un marcado descenso de expresión durante el almacenamiento, siendo solo la expresión de *CYP81F4* afectada por el tratamiento (Figura 6.3.4: B, C). Finalmente, el gen de biosíntesis *ST5a* (Figura 6.3.4, D) mostró un aumento en la expresión en las muestras tratadas en los dos tiempos estudiados.



**Figura 6.3.4:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos en las muestras control (gris) y tratadas térmicamente (amarillo) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMYB51*. **B.** *BoCYP83B1*. **C.** *BoSUR1*. **D.** *BoST5a*. **E.** *BoCYP81F4*

Respecto a los genes vinculados a la degradación de glucosinolatos, se detectó una disminución de la expresión de *Myr* y *ESP*, aunque este descenso fue menor en las muestras tratadas térmicamente (Figura 6.3.5: A, B).



**Figura 6.3.5:** Expresión relativa de los genes de degradación de glucosinolatos en las muestras control (gris) y tratadas térmicamente (amarillo) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMyr*. **B.** *BoESP*.

### 6.3.3 Conclusiones parciales

Está extensivamente documentado que los tratamientos térmicos de moderada intensidad pueden retrasar el avance de la senescencia en muy diversas especies de hortalizas, incluyendo brócoli (Lurie y Pedreschi, 2014). Sin embargo, en muy pocos

casos se han realizado estudios del efecto de estos tratamientos en el metabolismo de glucosinolatos. Tomando los resultados en conjunto se puede visualizar que las muestras sometidas al tratamiento térmico mostraron un menor descenso en el contenido de glucosinolatos. Sin embargo, no se detectó una correlación importante con los genes de biosíntesis, puesto que la expresión de los mismos en las muestras tratadas no fue sustancialmente diferente a la detectada en los controles, excepto en el caso del gen *ST5a*. Los genes de degradación mostraron una mayor expresión durante el almacenamiento en las muestras sometidas al estrés térmico, lo cual tampoco correlacionan con los datos de contenido de glucosinolatos. Sin embargo, teniendo en cuenta que el tratamiento térmico provoca un retraso general de la senescencia, es probable que los tejidos y células de las muestras control muestran una mayor desorganización y pérdida de compartimentalización, que inducirá una mayor degradación de glucosinolatos, aun en presencia de menor expresión de los genes asociados a la degradación.

## **6.4 TRATAMIENTO DE ENVASADO CON ATMÓSFERAS MODIFICADAS**

### *6.4.1 Introducción general*

Los tratamientos de envasado en atmósferas modificadas (AM) consisten en el envasado hermético de un producto frutihortícola en una película plástica. Esta envoltura, tiene permeabilidad selectiva a los gases presentes en el aire, y en conjunto con la respiración propia del producto y la atmósfera externa, se genera una atmósfera de equilibrio de composición más baja en oxígeno y más rica en dióxido de carbono que la atmósfera exterior (Kader y col., 1989).

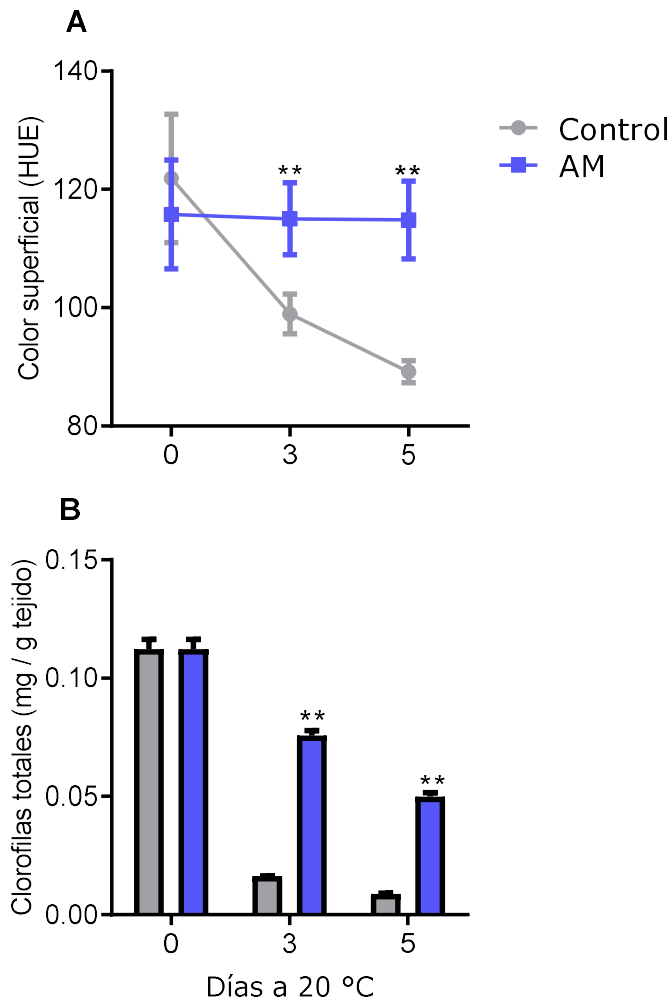
Entre algunas de las ventajas revisadas por Artés Calero. (2006) las bajas concentraciones de oxígeno disminuyen la actividad respiratoria del producto, y por lo tanto los síntomas de senescencia. Las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> disminuyen la síntesis de etileno, por lo que retardan la maduración de un fruto o el avance de la senescencia en una hortaliza verde. Asimismo, estas envolturas mantienen la humedad relativa alta y disminuyen las pérdidas de peso. El diseño de las envolturas plásticas usadas para el envasado en atmósferas modificadas, dependen de estudiar y analizar particularmente cada producto a envasar (Artés Calero, 2006) estudiado en

un amplio rango de frutos y vegetales desde cítricos, ciruela (Aguayo y col., 2006), durazno (Fernández-Trujillo, 1997), uvas (Martinez-Romero y col., 2003), granada y hortalizas tales como apio (Artés-Hernandez y col., 2005), cebolla, coliflor, espárrago, lechuga (Allende y col., 2001), pimiento (Conesa y col., 2005), tomate (Gil y col, 2000), entre otros.

En el caso del brócoli, las recomendaciones de las concentraciones gaseosas de equilibrio en un rango de temperatura óptimo de 0 °C a 5 °C se alcanzan con una concentración de oxígeno de 1–3 % (kPa) y una concentración de dióxido de carbono entre 5-10 % (kPa) (Artés-Hernandez y col., 2006), alcanzando a prolongar la vida útil del producto hasta 2 semanas cuando se almacena en refrigeración (Makhlouf y col., 1989a; Kader y col., 1989). Para este caso, se debe tener especial control a las concentraciones de oxígeno alcanzadas, ya que está reportado que el brócoli en condiciones de anaerobiosis puede producir compuestos volátiles no deseados tales como etanol, acetaldehído y etilacetato, causantes de malos olores y sabores (Di Pentima, 1995; Gillies y col., 1997). Las concentraciones de oxígeno no deberían estar debajo del 0,25 % (Lipton, 1974). El envasado en AM de las inflorescencias de brócoli permite una retención en el contenido de vitamina C, antioxidantes, además de una mantención del color verde, correspondiente a un mayor contenido de clorofilas (Barth y Zhuang, 1996).

#### *6.4.2 Resultados y discusión*

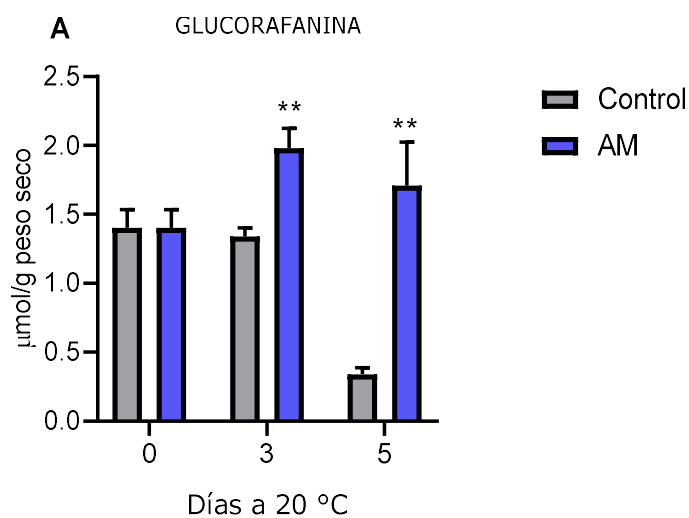
De manera análoga a lo reportado en bibliografía, el almacenamiento en atmósferas modificadas causó un retraso en la pérdida de color verde y en la degradación de clorofilas tal como se puede observar en la figura 6.4.1. En estudios previos han reportado una menor expresión de genes relacionados con el catabolismo de la clorofila (Büchert y col., 2011b; Gomez-Lobato y col., 2012a) en las muestras mantenidas en AM.



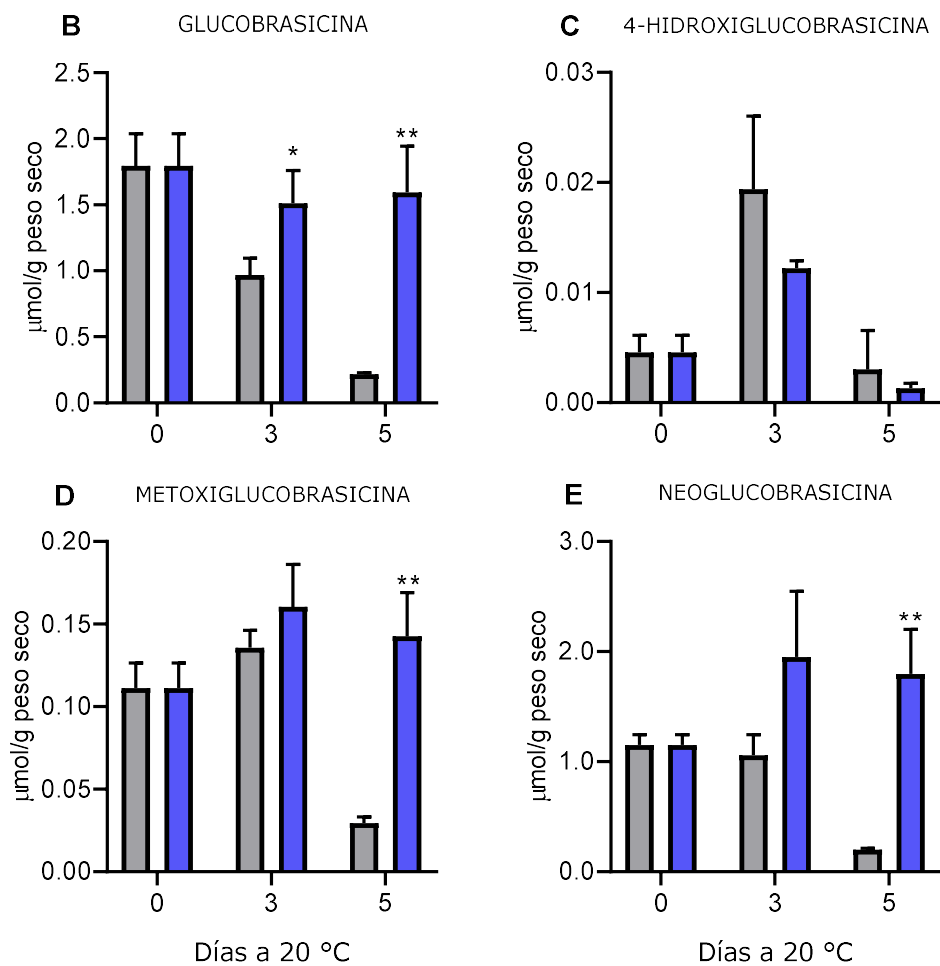
**Figura 6.4.1: A.** Color superficial (ángulo HUE) **y B.** Contenido de clorofilas (mg clorofilas totales/ g tejido fresco) en las muestras control (gris) y envasadas en atmósferas modificadas (azul) en el día de cosecha (día 0) y al día 3 y día 5 de almacenamiento a 20 °C.

Al analizar el metabolismo de glucosinolatos, se identificaron y cuantificaron cinco glucosinolatos individuales: glucorafanina (alifático) y glucobrasicina, neoglucobrasicina, 4-hidroxiglucobrasicina y 4-metoxiglucobrasicina (indólicos). Durante el almacenamiento poscosecha, el contenido de glucosinolatos individuales fue diferente en las cabezas almacenadas en condiciones AM en comparación con las muestras almacenadas en aire. En general, cuando las muestras fueron almacenadas bajo condiciones de atmósferas modificadas, se observó un mayor contenido de glucosinolatos (glucorafanina, glucobrasicina y neoglucobrasicina) los días 3 y 5 de poscosecha en comparación con las muestras control (Figura 6.4.2). En

el caso de la 4-metoxiglucobrasicina, no se detectaron diferencias en el día 3, pero se observó un incremento de 5 veces al final del almacenamiento poscosecha (día 5). En el caso de la 4-hidroxiglucobrasicina, no se observaron cambios significativos en ningún punto analizado. Estudios previos han reportado la relación entre el envasado de brócoli bajo atmósferas modificadas y el contenido de glucosinolatos. Bennett y Wallsgrove (1994) propusieron una síntesis de novo de glucosinolatos en respuesta al estrés causado por concentraciones bajas de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono. Xu y col. (2006) reportaron que una atmósfera rica en dióxido de carbono permite mantener el contenido de glucorafanina durante 20 días a 5 °C. Además, el mini brócoli almacenado bajo una atmósfera de 8% O<sub>2</sub> y 14% CO<sub>2</sub> permite mantener el contenido de glucosinolatos indólicos y alifáticos durante 7 días a 8 °C (Schreiner y col., 2006). Rangkadilok y col. (2002) recomiendan la combinación de AM y refrigeración como las mejores condiciones de almacenamiento para mantener el contenido de glucorafanina y la calidad visual de las cabezas de brócoli durante 10 días.



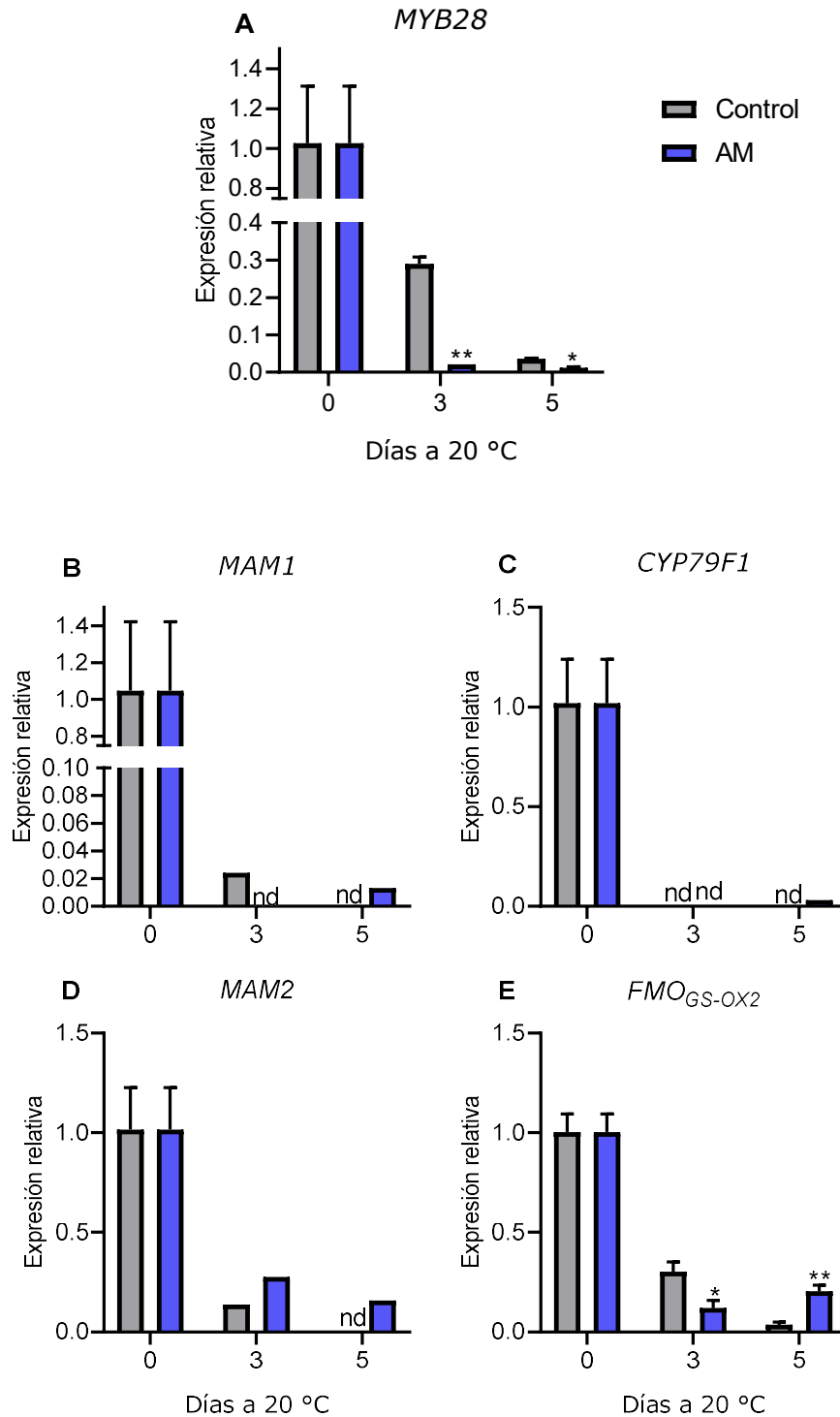




**Figura 6.4.2:** Contenido de glucosinolatos individuales expresados como  $\mu\text{mol/g}$  peso seco en las muestras control (gris) y envasadas en atmósferas modificadas (azul) al día 3 y día 5 de almacenamiento poscosecha a 20 °C.

**A.** Glucorafanina. **B.** Glucobrasicina. **C.** 4-hidroxi-glucobrasicina. **D.** Metoxiglucobrasicina. **E.** Neoglucobrasicina.

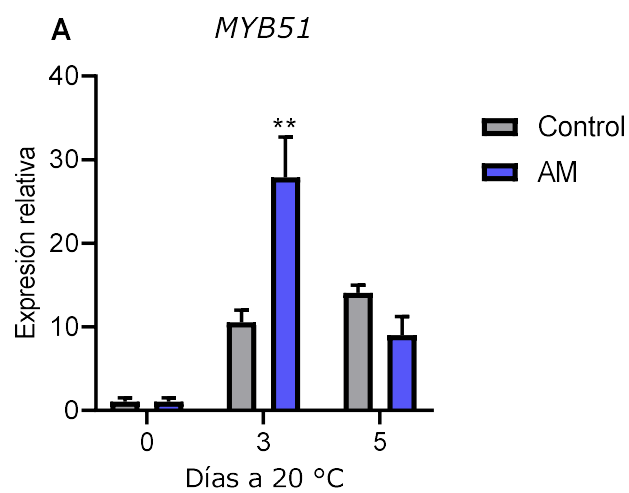
En las muestras control, la expresión relativa de los genes involucrados en la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos presentó una marcada disminución o no se detectó expresión durante el almacenamiento poscosecha (Figura 6.4.3). Del mismo modo, las muestras almacenadas en AM mostraron una expresión no detectada (*MAM1* y *CYP79F1*) o muy baja (*MAM2*, *MYB28*) después de tres días. Sin embargo, en el día 5, algunos genes presentaron una mayor expresión en comparación con los controles (*MAM2*, *CYP79F1* y *FMO<sub>GS-OX2</sub>*).

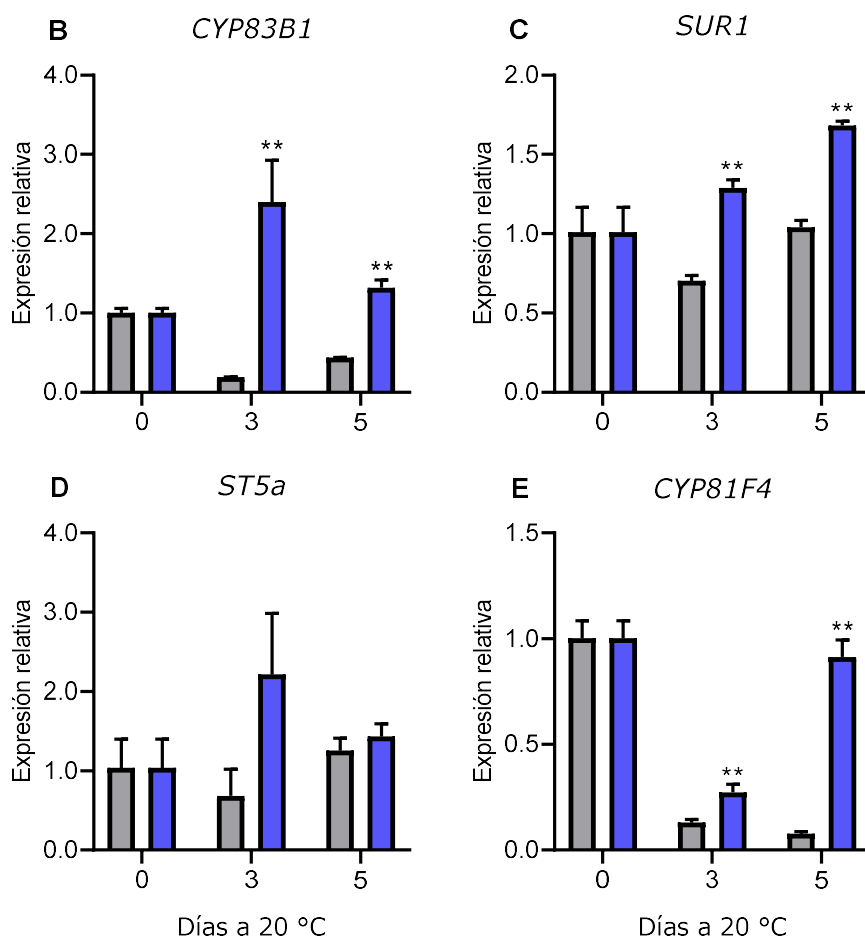


**Figura 6.4.3:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en las muestras control (gris) y envasadas en atmósferas modificadas (azul) al día 3 y día 5 de almacenamiento poscosecha a 20 °C.

**A.** *BoMYB28*. **B.** *BoMAM1*. **C.** *BoCYP79F1*. **D.** *BoMAM2*. **E.** *BoFMO<sub>GS-OX2</sub>*

La expresión de genes involucrados en la biosíntesis de glucosinolatos indólicos disminuyó (*CYP83B1*, *CYP81F4*) o no mostró cambios (*SUR1*, *ST5a*) durante el período poscosecha en las muestras de control (Figura 6.4.4). Sin embargo, el tratamiento con atmósferas modificadas provocó un incremento en la expresión de *CYP83B1*, *ST5a* y *SUR1* y un menor descenso de la expresión de *CYP81F4*. El factor de transcripción *MYB51* aumentó su expresión durante el almacenamiento poscosecha de las muestras de control. La expresión de este gen fue mayor el día 3, pero menor el día 5 en las muestras tratadas.

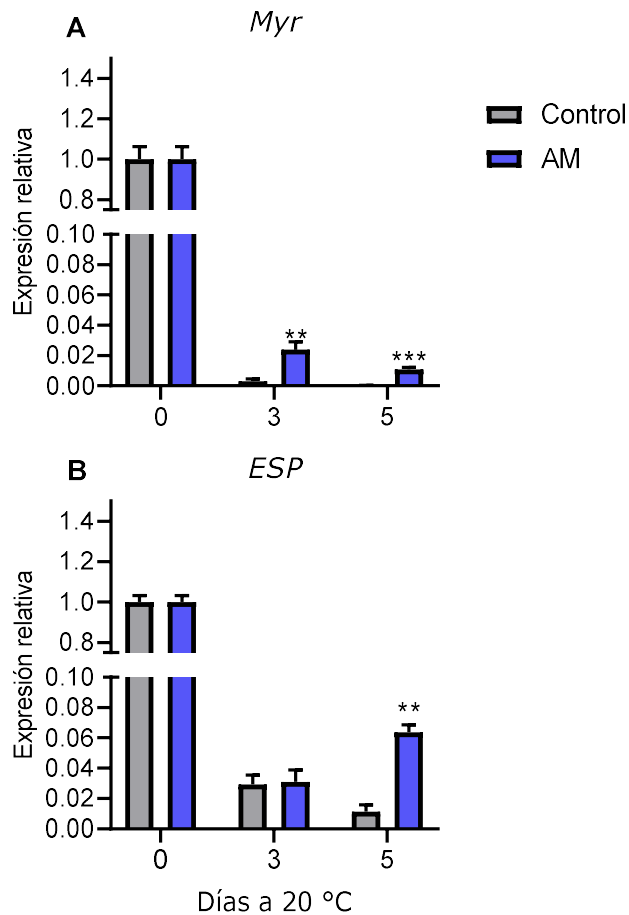




**Figura 6.4.4:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos en las muestras control (gris) y envasadas en atmósferas modificadas (azul) al día 3 y día 5 de almacenamiento poscosecha a 20 °C.

A. *BoMYB51*. B. *BoCYP83B1*. C. *BoSUR1*. D. *BoST5a*. E. *BoCYP81F4*.

Finalmente, la expresión de genes asociados a la degradación de glucosinolatos (*Myr* y *ESP*) presentó una drástica disminución durante el período de poscosecha en las muestras control, pero un descenso menor en las cabezas tratadas, lo que conduce a una mayor expresión de estos genes en las muestras almacenadas en atmósferas modificadas.



**Figura 6.4.5:** Expresión relativa de los genes de degradación en las muestras control (gris) y envasadas en atmósferas modificadas (azul) al día 3 y día 5 de almacenamiento poscosecha a 20 °C.

**A.** *BoMyr*. **B.** *BoESP*

### 6.4.3 Conclusiones parciales

Guo y col. (2013) demostraron que la peroxidación lipídica, un indicador del daño de la membrana, es menor en el brócoli almacenado en atmósferas controladas. En consecuencia, un menor deterioro de los tejidos de las muestras en atmósferas modificadas podría indicar una menor pérdida de compartimentación y una menor degradación de los glucosinolatos. Sin embargo, en el caso de los glucosinolatos indólicos, la atmósfera modificada provocó una fuerte inducción de genes asociados a su biosíntesis, lo que también podría contribuir a una acumulación de estos

compuestos. En el presente trabajo se observó que el uso de empaques de atmósfera modificada en cabezas de brócoli a temperatura ambiente no solo permitió mantener la calidad visual sino también mantener la calidad nutracéutica aportada por los glucosinolatos.

### ***Análisis del metabolismo de glucosinolatos durante el almacenamiento poscosecha en las diferentes secciones de la planta de brócoli***

#### *7.1 Introducción general*

Las plantas terrestres, como organismos sésiles, han desarrollado diversas estrategias para responder y adaptarse al entorno en el que viven, entre ellas la síntesis de numerosos metabolitos especializados cruciales para su supervivencia. Los requisitos de defensa en las diferentes partes de la planta se basan en su contribución a la aptitud y su vulnerabilidad a los herbívoros, y cambian durante toda la vida de la planta (McKey, 1974). La necesidad de resistencia de un tejido es dinámica y varía en respuesta a diferentes señales tanto internas como externas y como consecuencia, los compuestos de defensa se pueden sintetizar de novo en diferentes partes de la planta o redistribuirse entre los diferentes tejidos (Egevang Jørgensen y col., 2015). Como mencionamos anteriormente, los glucosinolatos son metabolitos secundarios de defensa, ya que sus productos de degradación volátiles son tóxicos para los insectos herbívoros, y se producen cuando se ponen en contacto los glucosinolatos con la enzima mirosinasa tras la ruptura de la compartimentalización (Barth y Jander, 2006).

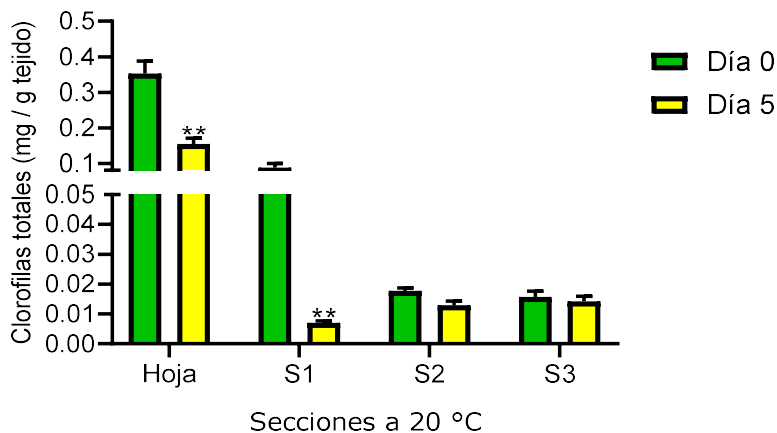
En los capítulos anteriores se analizó el metabolismo de glucosinolatos en las inflorescencias, siendo éstas solo una porción de todo el órgano cosechado, que incluye también tallos y pedúnculos. En todos los casos se detectó un descenso importante en el contenido de glucosinolatos totales (particularmente en las muestras no tratadas) durante la senescencia poscosecha de las inflorescencias, y también un descenso de la expresión de los genes de biosíntesis (particularmente de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos) y de degradación. El análisis de los tallos y pedúnculos durante el almacenamiento poscosecha del brócoli no es un procedimiento habitual, ya que la casi totalidad de los estudios se centran en las inflorescencias. Sin embargo, Kato y col. (2002) encontraron que la principal fuente de síntesis de etileno en el brócoli cosechado es la zona cercana al corte del tallo principal. Asimismo, Perini y col. (2017) demostraron que el tratamiento térmico realizado solo en la base del tallo

retrasa la senescencia de los floretes durante el almacenamiento poscosecha, probablemente por la inhibición de la síntesis de etileno. Además, Guo y col. (2018) determinaron que la longitud de los tallos puede afectar a la calidad de los floretes de brócoli durante el almacenamiento. En consecuencia, se decidió realizar un estudio del metabolismo de glucosinolatos no solo en las inflorescencias sino también en los pedúnculos y el tallo principal.

Se dividió el órgano cosechado en tres secciones tal como se detalla en la sección 3.2 de materiales y métodos. Paralelamente, se incluyó hoja de brócoli, de modo de comparar la senescencia poscosecha de este órgano con las inflorescencias. Se midió el contenido de glucosinolatos y se analizó la expresión génica en el día de cosecha (día 0) y hacia el final de almacenamiento poscosecha a 20 °C (día 5).

## 7.2 Resultados y discusión

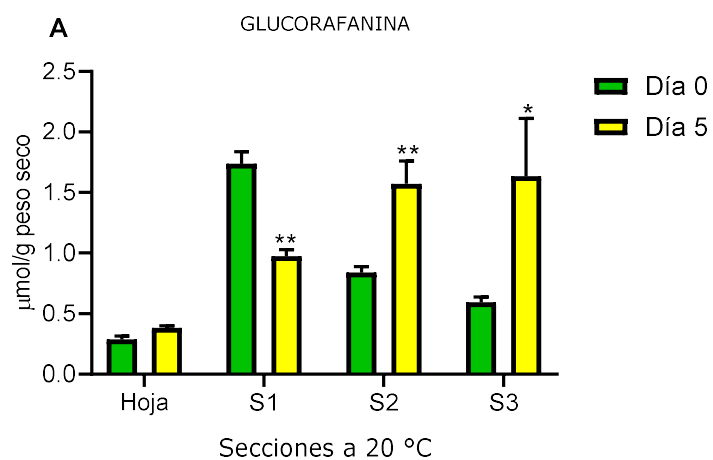
Para evaluar el avance de la senescencia, se determinó el contenido de clorofilas totales. Se halló un mayor contenido de clorofilas totales en hojas y en la sección 1, siendo estos dos tejidos fotosintéticamente activos; y se observó una disminución de este contenido en estas secciones hacia el día 5 de almacenamiento, pero sin cambios en las secciones 2 y 3 tal como se muestra en la figura 7.1:

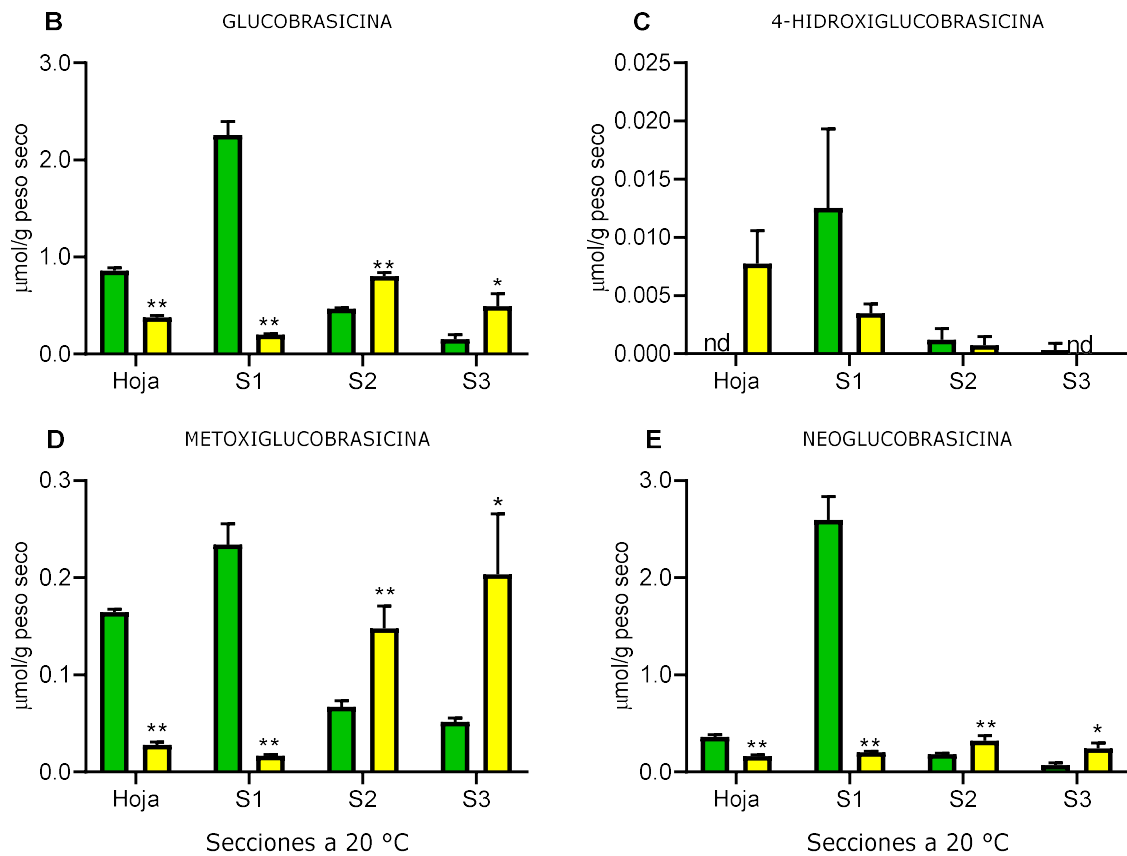


**Figura 7.1:** Contenido de clorofilas (mg clorofilas totales/ g tejido fresco) en hojas y en las tres diferentes secciones en el día de cosecha (día 0) (verde) y al día 5 (amarillo) de almacenamiento a 20 °C



En relación con el contenido de glucosinolatos, se identificaron y cuantificaron cinco glucosinolatos, un glucosinato alifático (glucorafanina) (Figura 7.2, A); y cuatro glucosinolatos indólicos: glucobrasicina, 4-hidroglucobrasicina, neoglucobrasicina, y 4-metoxibrasicina (Figura 7.2: B, C, D y E).





**Figura 7.2:** Contenido de glucosinolatos individuales en hojas y en las tres diferentes secciones en el día de cosecha (día 0) (verde) y al día 5 (amarillo) de almacenamiento a 20 °C

**A.** Glucorafanina. **B.** Glucobrasicina. **C.** 4-hidroxiglucobrasicina. **D.** Metoxiglucobrasicina. **E.** Neoglucobrasicina.

Como podemos observar, se detectó un aumento en el contenido de los glucosinolatos individuales (excepto para el caso de 4-hidroxiglucobrasicina) en las secciones 2 y 3 mientras que se observó una disminución del contenido en las hojas y las inflorescencias senescentes (nuevamente exceptuando el caso de 4-hidroxiglucobrasicina) cuando se compararon el día inicial (día 0) respecto el final del almacenamiento poscosecha (día 5).

Como se muestra en la tabla 7.1, los incrementos en las secciones 2 y 3 variaron entre un 34 y 294% dependiendo del glucosinolato en particular y las disminuciones de los contenidos en las hojas y las secciones 1 entre un 43 y 92 %. Al analizar el contenido de los glucosinolatos totales, se observó una disminución del 77,8 % en las inflorescencias (sección 1) y del 42,7 % en las hojas. Sin embargo, se

observó un incremento en el contenido de glucosinolatos totales de 82,7 % en la sección 2 y de 191 % en la sección 3.

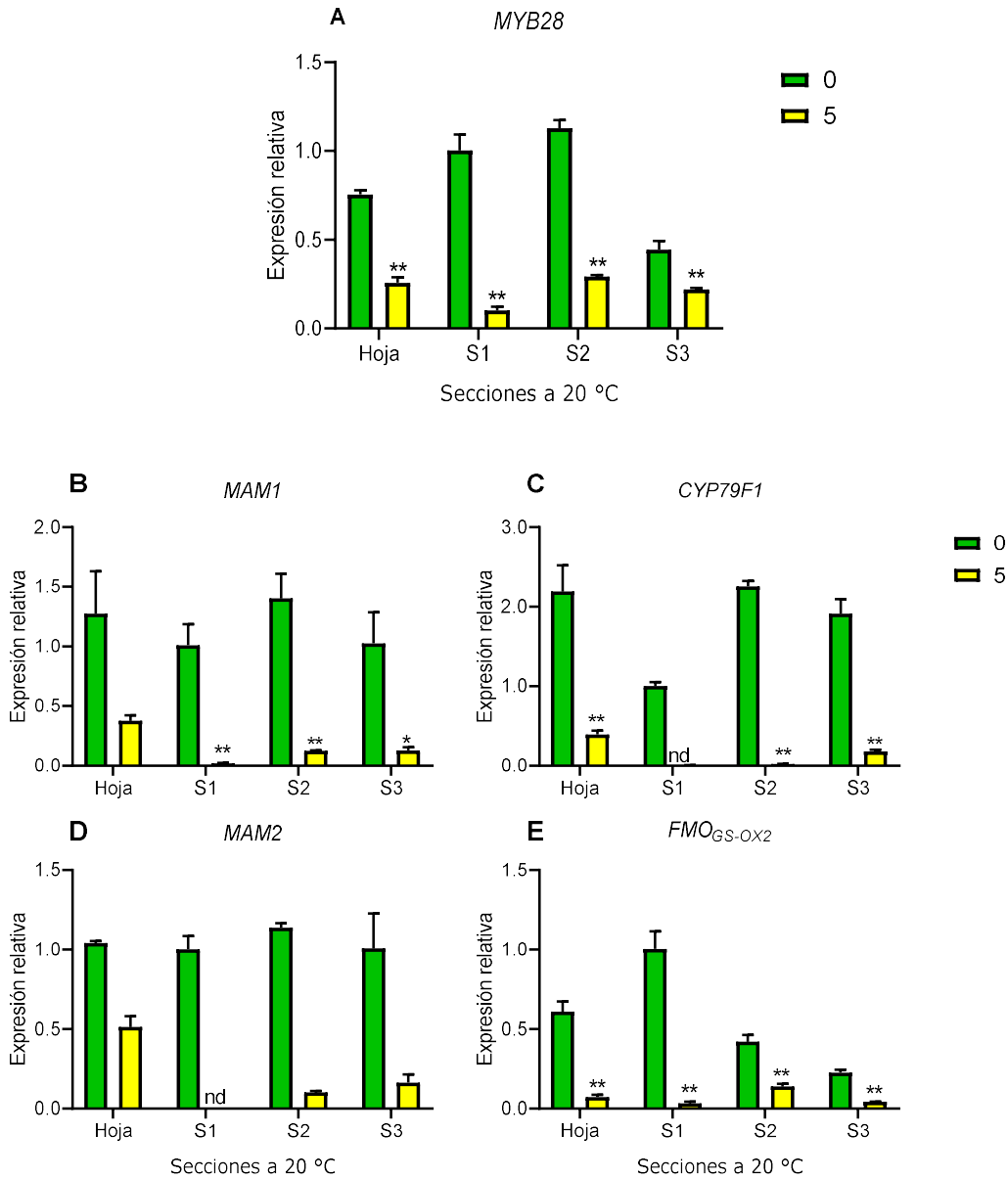
**Tabla 7.1:** Porcentajes de incremento (positivo) o disminución (negativo) de los glucosinolatos individuales y los glucosinolatos totales en hoja, y las tres secciones cuando se comparó el tiempo final (día 5) respecto al tiempo inicial

Glucosinolato	Hoja	Sección 1	Sección 2	Sección 3
glucorafanina	34,1 %	-43,9 %	79,4%	169,5%
glucobrasicina	-56,3 %	-91,2 %	72,7 %	220,6 %
4-metoxiglucobrasicina	-83,2 %	-92,9 %	120,9 %	294,6 %
neoglucobrasicina	-54,6 %	-92,2 %	77,2 %	238,2 %
4-hidroxiglucobrasicina	No detectado	-72 %	-30 %	No detectado
Total	-42,7 %	-77,8 %	82,7 %	191 %

Fue descripto que la concentración de glucosinolatos decae durante el almacenamiento poscosecha en las inflorescencias de brócoli a 20 °C (Rodrigues y Rosa, 1999; Jones y col., 2006) y que tanto el contenido total como individual de los glucosinolatos puede variar entre las distintas partes de la planta (Raham, 1986). Rangkadilok y col. (2002) describió una pérdida del 82 % de glucorafanina en las inflorescencias luego de 5 días de almacenamiento poscosecha a 20 °C. Asimismo, Aires y col. (2011) informaron una pérdida de aproximadamente 50 % de glucosinolatos totales y de los glucosinolatos individuales (excepto 4-hidroxiglucobrasicina) a 3 días de almacenamiento. Varios trabajos han reportado que aún en períodos de almacenamiento cortos a temperatura ambiente, se detectan grandes pérdidas en el contenido de los glucosinolatos en las inflorescencias y, por lo tanto, en el valor nutricional de las mismas.

Por otro lado, se analizó la expresión de los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis, degradación y transporte de glucosinolatos en las hojas y en las diferentes secciones al tiempo 0 y 5 días. En la figura 7.3 se muestra la expresión de genes involucrados en la vía de biosíntesis de GLS alifáticos, un factor de transcripción: *MYB28* y 4 genes codificantes de enzimas: *MAM1*, *MAM2*, *CYP79F1* Y *FMO<sub>GS-OX2</sub>* y de genes involucrados en la vía de biosíntesis de GLS indólicos, un factor de transcripción: *MYB51* y cuatro genes codificantes de enzimas: *CYP83B1*,

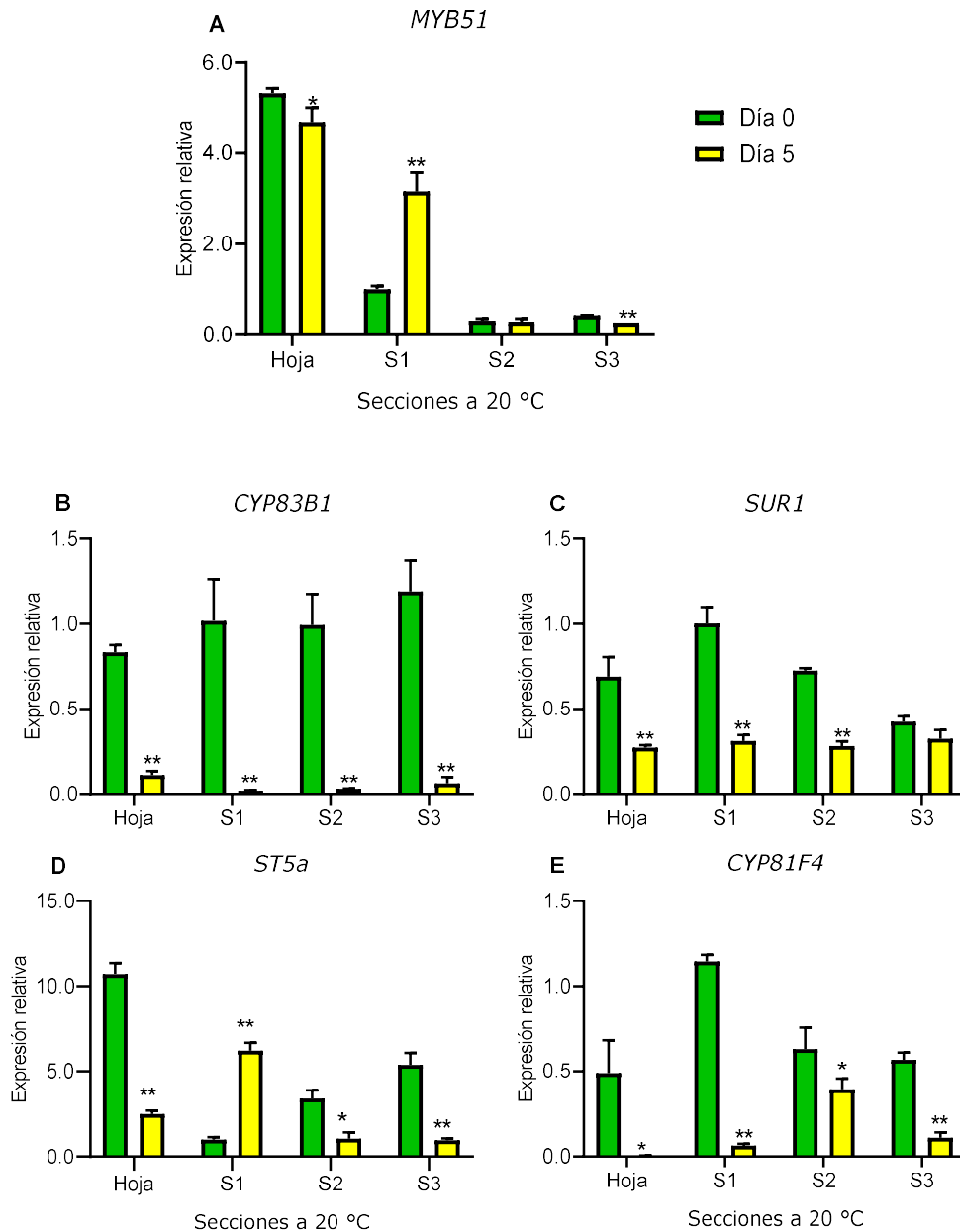
*ST5a*, *CYP81F4* y *SUR1*. En el caso de la vía de glucosinolatos alifáticos, se observó una importante disminución de la expresión de todos los genes hacia el día 5 de almacenamiento poscosecha, en las hojas y en las diferentes secciones de la inflorescencia.



**Figura 7.3:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos alifáticos en hojas y en las tres diferentes secciones en el día de cosecha (día 0) (verde) y al día 5 (amarillo) de almacenamiento a 20 °C

**A.** *BoMYB28*. **B.** *BoMAM1*. **C.** *BoCYP79F1*. **D.** *BoMAM2*. **E.** *BoFMO<sub>GS-ox2</sub>*

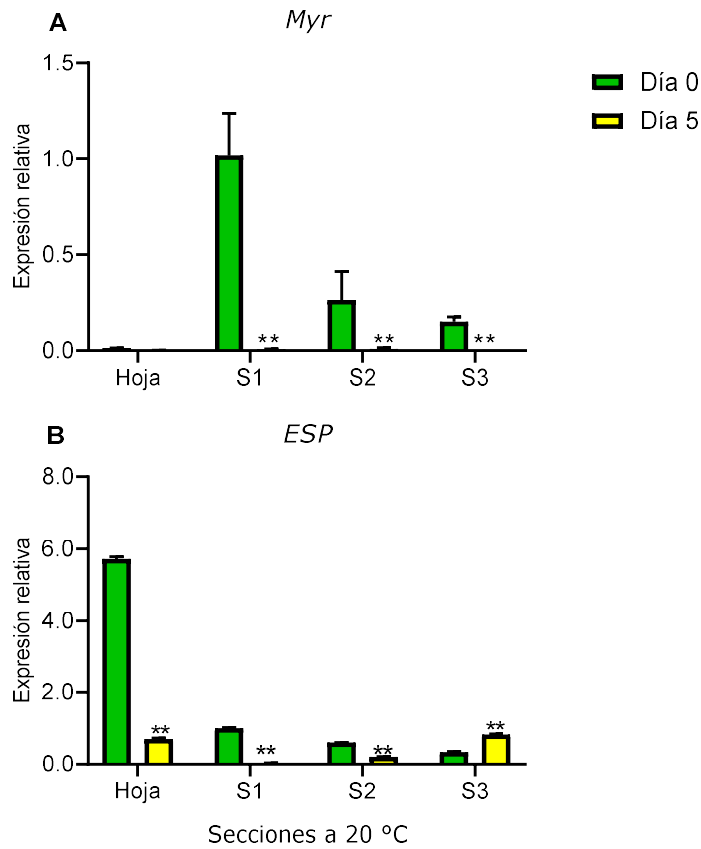
Se observó un descenso similar en la mayoría de los genes involucrados en el metabolismo de glucosinolatos indólicos, excepto el factor de transcripción *MYB51* y el gen *ST5a* (Figura 7.4), los cuales presentan un aumento de expresión hacia el día 5 en las inflorescencias.



**Figura 7.4:** Expresión relativa de los genes de biosíntesis de glucosinolatos indólicos en hojas y en las tres diferentes secciones en el día de cosecha (día 0) (verde) y al día 5 (amarillo) de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoMYB51*. **B.** *BoCYP83B1*. **C.** *BoSUR1*. **D.** *BoST5a*. **E.** *BoCYP81F4*

Se analizó también la expresión de genes involucrados en la degradación de glucosinolatos: *Myr* y *ESP* (Figura 7.5). Similarmente, se detectó una marcada caída de dichas expresiones con el avance de la senescencia en las hojas y en las 3 secciones de la inflorescencia, excepto en el caso del gen *ESP* en la sección 3, que se detectó un aumento significativo en el día 5 respecto al tiempo inicial.



**Figura 7.5:** Expresión relativa de los genes de degradación de glucosinolatos en hojas y en las tres diferentes secciones en el día de cosecha (día 0) (verde) y al día 5 (amarillo) de almacenamiento a 20 °C

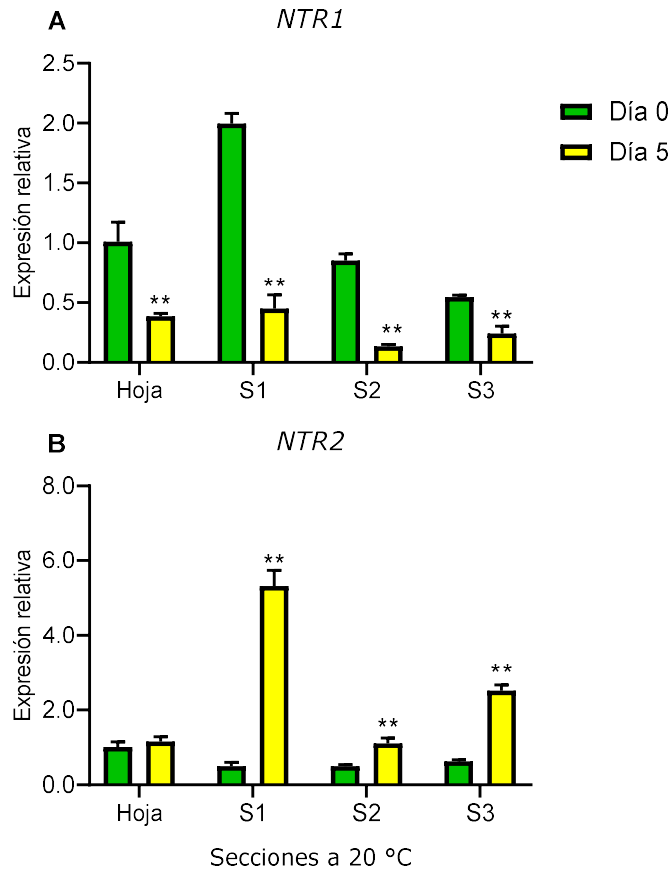
**A.** *BoMyr*. **B.** *BoESP*.

Tomando en conjunto los resultados analizados, la baja expresión de los genes involucrados tanto en la biosíntesis como en la degradación de los glucosinolatos indólicos y alifáticos en los tejidos senescentes, se podría sugerir que no habría síntesis de novo ni degradación de estos metabolitos en los diferentes tejidos estudiados. Sin embargo, el hecho de que el contenido de glucosinolatos disminuya

en la sección 1 y aumente en las secciones 2 y 3 sugiere fuertemente que se podría estar en presencia de traslocación de metabolitos.

Se ha descrito una gran familia de transportadores transmembrana conocida como NRT/PTR (NPF) ampliamente distribuida en la mayoría de las familias vegetales, en los cuáles se encuentran las proteínas transportadoras de nitratos, péptidos y diferentes metabolitos secundarios (Andersen y col., 2013). Recientemente, dentro de esta gran familia de transportadores, en *Arabidopsis thaliana* (Nour-Eldin y col., 2012) y en *Brassica napus* (Wen y col., 2020), se han descrito proteínas transportadoras específicas para los glucosinolatos. Particularmente, en *Arabidopsis thaliana*, los transportadores GTR1 (AtNPF2.10) y GTR2 (AtNPF2.11) han sido identificados como los transportadores claves para los glucosinolatos tanto indólicos como alifáticos. Asimismo, se ha realizado la caracterización de estos dos genes y sus proteínas correspondientes en *Arabidopsis Thaliana* (Jørgensen y col., 2015). La expresión de dichos genes ha sido detectada en hojas y en raíces, sugiriendo su rol en la carga de los glucosinolatos en el floema y permitiendo el transporte a diferentes tejidos sumideros.

En nuestro caso, a partir de las secuencias descriptas y halladas en bibliografía en *Arabidopsis thaliana*, se realizó una búsqueda de los genes homólogos para *Brassica oleracea*, usando las herramientas de blast y la información encontrada en distintas bases de datos genómicas. Se hallaron los genes de la familia NTR involucrados en el transporte de glucosinolatos para la especie *Brassica oleracea* que fueron denominados NTR1 y NTR2 para los homólogos de GTR1 y GTR2 respectivamente. En la figura 7.6, se muestra la expresión de estos genes durante el almacenamiento poscosecha



**Figura 7.6:** Expresión relativa de los genes involucrados en el transporte de glucosinolatos en hojas y en las tres diferentes secciones en el día de cosecha (día 0) (verde) y al día 5 (amarillo) de almacenamiento a 20 °C.

**A.** *BoNTR1*. **B.** *BoNTR2*.

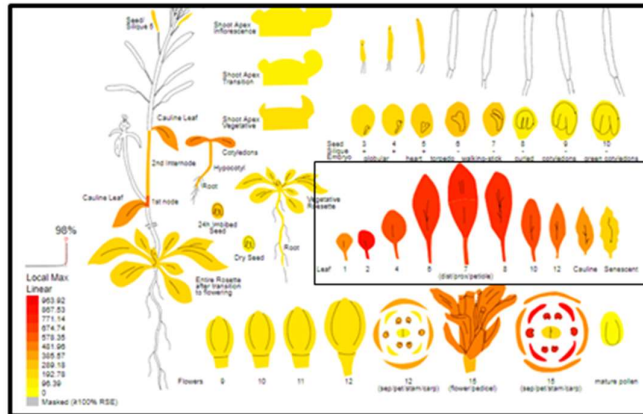
Se observa una disminución de la expresión del gen *NTR1* en las hojas y en las tres secciones conforme avanza la senescencia, mientras que por el contrario la expresión del gen *NTR2* se ve aumentada en los tejidos senescentes. De acuerdo con nuestro conocimiento, estos son los primeros resultados de expresión de genes transportadores de glucosinolatos en brócoli.

Por otro lado, el conjunto de datos públicos de expresión génica de *Arabidopsis*, *ePlant* (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>) permite explorar los patrones de expresión génica en órganos en diferentes etapas del desarrollo. De esta manera analizamos los perfiles de expresión global de *AtNPF2.10* (*NTR1*) y *AtNPF2.11* (*NTR2*) y se observó que la expresión de *AtGTR2* tiene un fuerte incremento durante

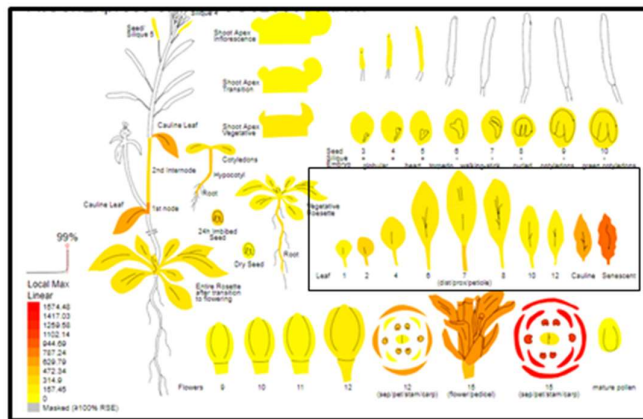


la senescencia de la roseta y una marcada expresión particularmente en el peciolo de la hoja ya senescente. Por el contrario, AtGTR1 tiene su máxima expresión en la hoja joven y disminuye con el avance de la senescencia, siendo acorde con los perfiles de expresión de los genes ortólogos encontrados para brócoli (Figura 7.7)

AtNPF2.10



AtNPF2.11



**Figura 7.7:** Perfiles de expresión global de los genes AtNPF2.10 (NTR1) y AtNPF2.11 (NTR2), tomados de la base de datos de expresión génica de Arabidopsis, *ePlant* (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>)

### 7.3 Conclusiones parciales

Los procesos de transporte de metabolitos, incluidos aquellos involucrados en la defensa, son de importancia fundamental para las plantas, ya que, de esta manera, se busca optimizar los gastos energéticos mediante la reasignación de compuestos a diferentes tejidos. Los metabolitos secundarios de las plantas a menudo son

transportados, como es el caso de la nicotina, cafeína y citoquinina que son sintetizados en las raíces y traslocados a las hojas (Chen y col., 2001).

Teniendo en cuenta que el objetivo central de la senescencia es la removilización y el reciclado de los nutrientes tales como monosacáridos, aminoácidos y nucleótidos, entre otros, que se transportan vía floema para ser utilizados en otros tejidos biosintéticamente activos (Kuai y col., 2018), la disminución del contenido de glucosinolatos en las inflorescencias y la acumulación de estos en los tallos durante la poscosecha de las cabezas florales, sumado a los patrones de expresión de genes de biosíntesis, degradación y transporte de glucosinolatos, sugiere fuertemente una movilización de estos compuestos desde las inflorescencias hacia los tallos, más que una biosíntesis de novo en tallos o degradación en inflorescencias.

Los tallos de brócoli tienen valores nutricionales equivalentes a los que poseen las inflorescencias, con grandes cantidades de fibra dietaria (Schäfer y col., 2017), pero desde un punto de vista comercial los tallos son descartados tanto en el uso doméstico como en el procesamiento industrial. Es importante destacar que se estima que solo un 10 % de la biomasa se encuentra en las inflorescencias, mientras que el otro 90 % que se reparte entre las hojas, los tallos o las inflorescencias secundarias que habitualmente son descartadas y se convierten en pérdidas (Dominguez-Perles, R y col., 2010). Esto constituye una gran cantidad de residuos, que conllevan un efecto negativo en el medio ambiente tanto agrícola como de los centros urbanos. Un creciente número de publicaciones sugiere que los desechos de los alimentos vegetales y partes no comestibles de plantas como tallos, pedúnculos, pecíolos y hojas son una fuente prometedora de compuestos nutricionales y funcionalmente importantes, tales como los compuestos fenólicos, carotenoides, fibras dietéticas, tocoferoles y vitaminas (Drosou y col., 2015). Teniendo en cuenta la acumulación de glucosinolatos en los tallos y hojas ya cosechados y que se convertirán en un deshecho no utilizado y una pérdida económica, se podría pensar en el potencial reciclado de estos tejidos de modo de obtener componentes bioactivos con el fin de mejorar los valores nutricionales de diferentes productos alimenticios o para el agregado de valor en la industria farmacéutica.

## 8. Conclusiones finales

Los estudios vinculados a tratamientos poscosecha estuvieron históricamente centrados en desarrollos que tuvieran impacto en la extensión de la vida poscosecha de frutas y hortalizas. El brócoli, es una hortaliza ampliamente cultivada y consumida mundialmente, sin embargo su vida poscosecha es breve por lo que muchas tecnologías están orientadas a mejorar este aspecto. En los últimos años, las crucíferas se han revalorizado por su enorme calidad nutricional. El brócoli, particularmente, puede aportar importantes cantidades de antioxidantes a la dieta humana. Adicionalmente, las crucíferas poseen elevadas concentraciones de glucosinolatos, cuyos productos de hidrólisis, resultan anticancerígenos. En el presente trabajo se decidió analizar de qué manera, diferentes tratamientos poscosecha, habitualmente empleados para mantener la calidad organoléptica del brócoli, pueden afectar también el valor nutricional, centrándonos en el metabolismo de los glucosinolatos.

A lo largo de todos los ensayos realizados se detectó que el contenido de glucosinolatos totales tanto indólicos como alifáticos disminuye conforme avanza la senescencia durante el almacenamiento poscosecha, aunque el grupo de los glucosinolatos alifáticos tiene un descenso más marcado que el correspondiente a los indólicos. Asimismo, la expresión de los genes vinculados a la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos decae más fuertemente que la de los correspondientes indólicos durante este período.

Como se ha visto y mencionado, el perfil cuantitativo y cualitativo de los glucosinolatos depende de numerosos factores, y uno de ellos es el momento del día en el cual se realiza la cosecha de las cabezas. El contenido de glucosinolatos indólicos disminuye con la hora de la cosecha en el día mientras que los glucosinolatos alifáticos sólo muestran una disminución moderada. En cuanto a la poscosecha, esta práctica permite diferenciar el avance de la senescencia durante el almacenamiento, siendo las muestras cosechadas en horas más tardías del día las que senescen más lentamente. El almacenamiento afecta de forma diferente a los metabolismos de los glucosinolatos indólicos y alifáticos. El contenido de alifáticos disminuye durante la poscosecha de manera similar en las muestras cosechadas en diferentes momentos. Por el contrario, en el caso de los indólicos, se detecta un menor

descenso en las muestras cosechadas hacia el mediodía o la tarde. El momento del día de cosecha también influye en la expresión de los genes asociados tanto a la biosíntesis y a la degradación.

Con respecto a los tratamientos poscosecha, los efectos han sido variables, mostrando que los tratamientos con agentes químicos (BAP y 1-MCP) en general permiten mantener, contenidos más altos de glucosinolatos durante el almacenamiento, respecto a los tratamientos físicos.

En este trabajo se realizaron tratamientos físicos que han sido largamente probados por nuestro grupo como retardantes de la senescencia poscosecha. Dentro de estas metodologías se destacan los tratamientos con radiación electromagnética, luz visible y UV-C, que permiten retrasar la senescencia y la degradación de clorofilas. El tratamiento con luz visible continua de baja intensidad permite retrasar el decaimiento del contenido de glucosinolatos, manteniendo una ligera mayor expresión de los genes de biosíntesis en las muestras irradiadas. Este efecto no se pudo lograr con UV-C. De manera contraria, la irradiación de las cabezas con UV-C no contribuye a mantener el contenido de glucosinolatos durante el almacenamiento, indicando que en algunos tratamientos podría dissociarse el proceso de senescencia respecto a la disminución del contenido de glucosinolatos

Los tratamientos térmicos, ampliamente conocidos como retardantes de la senescencia provocan un mantenimiento del contenido de glucosinolatos tanto alifáticos como indólicos, que no se ve correlacionado con la expresión de los genes de biosíntesis. El envasado de las cabezas de brócoli en atmósferas modificadas durante la poscosecha además de retrasar la senescencia y el desverdizado, permite mantener un mayor contenido de glucosinolatos. Nuevamente, los valores de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de glucosinolatos son mayores en las muestras tratadas.

Un factor común en todos los ensayos realizados fue el descenso del contenido de glucosinolatos en las inflorescencias durante el almacenamiento poscosecha. Este descenso fue más o menos marcado según el tratamiento realizado. Llamativamente, la expresión de los genes asociados a la biosíntesis y degradación de glucosinolatos también mostraron un marcado descenso. Esta aparente falta de correlación nos llevó a realizar un estudio del metabolismo de glucosinolatos no solo en las inflorescencias sino también en los pedúnculos y el tallo principal durante el almacenamiento poscosecha. La senescencia es un proceso metabólicamente orientado al reciclado

de nutrientes, y se ha verificado que las rutas metabólicas que se activan en la senescencia de órganos cosechados son básicamente iguales a las que ocurren en los órganos unidos que permanecen unidos a la planta. En consecuencia, y teniendo en cuenta que el contenido de un determinado compuesto en un órgano está determinado por el balance de su biosíntesis, degradación y transporte, incluimos el análisis de genes que codifican para proteínas transportadoras de glucosinolatos. Los resultados obtenidos muestran que el contenido de glucosinolatos disminuye en las inflorescencias durante la poscosecha, pero simultáneamente aumenta el contenido en los tallos. Estos resultados, en conjunto con los análisis de expresión de genes que codifican biosíntesis, degradación y transporte sugieren que los glucosinolatos mayormente se transportarían desde las inflorescencias hasta los tallos durante la senescencia poscosecha.

Desde el punto de vista comercial, los tallos de brócoli suelen desecharse y no se utilizan para la alimentación. Sin embargo, la acumulación de glucosinolatos en los tallos es un factor importante a tener en cuenta a la hora de contemplar la posibilidad de utilizar comercialmente esta parte de la planta.

## 9. Referencias Bibliográficas

Able, A. J., Wong, L. S., Prasad, A., O'Hare, T. J. (2002). 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *chinensis*). *Postharvest Biology and Technology*, 26(2), 147-155.

Aguayo, E., Jansasithorn, R., Kader, A. A. (2006). Combined effects of 1-methylcyclopropene, calcium chloride dip, and/or atmospheric modification on quality changes in fresh-cut strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 40(3), 269-278.

Aharoni, N. (1985). Modified atmospheres to delay senescence and decay of broccoli. In *Proceedings of the 4th National Controlled Atmosphere Conference*, Department of Horticultural Science, Raleigh, NC. Hort. Rep, 126, 169-177.

Ahlawat, Y., Li, S., Timilsena, P. R., Pliakoni, E. D., Brecht, J. K., Liu, T. (2022). Identification of senescence-associated genes in broccoli (*Brassica oleracea*) following harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 183, 111729.

Aiamla-or, S., Yamauchi, N., Takino, S., Shigyo, M. (2009). Effect of UV-A and UV-B irradiation on broccoli (*Brassica oleracea* L. *Italica* Group) floret yellowing during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 54(3), 177-179.

Aires, A., Dias, C. S., Carvalho, R., Oliveira, M. H., Monteiro, A. A., Simões, M. V., Rosa, E., Bennett, R.N., Saavedra, M. J. (2011). Correlations between disease severity, glucosinolate profiles and total phenolics and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* inoculation of different Brassicaceae. *Scientia Horticulturae*, 129(3), 503-510.

Andersen, T. G., Nour-Eldin, H. H., Fuller, V. L., Olsen, C. E., Burow, M., & Halkier, B. A. (2013). Integration of biosynthesis and long-distance transport establish organ-specific glucosinolate profiles in vegetative *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(8), 3133-3145.

Angelino, D., Jeffery, E. (2014). Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*, 7, 67-76.

Artes Calero, F. (2006). El envasado en atmósfera modificada mejora la calidad de consumo de los productos hortofrutícolas intactos y mínimamente procesados en fresco. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, 7(2), 61-85.

Artés-Hernández, F., Tomás-Barberán, F. A., Artés, F. (2006). Modified atmosphere packaging preserves quality of SO<sub>2</sub>-free 'Superior seedless' table grapes. *Postharvest Biology and technology*, 39(2), 146-154.

Ávila, F., Faquin, V., Yang, Y., Ramos, S., Guilherme, L., Thannhauser, T, Li, L. (2013). Assessment of the anticancer compounds Se-Methylselenocysteine and glucosinolates in Se-biofortified broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) sprouts and florets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6216-6223.

Ayele, M., Haas, B. J., Kumar, N., Wu, H., Xiao, Y., Van Aken, S., Utterback, R., Wortman, J., White, O., Town, C. D. (2005). Whole genome shotgun sequencing of *Brassica oleracea* and its application to gene discovery and annotation in *Arabidopsis*. *Genome research*, 15(4), 487-495.

Bárcena, A., Martínez, G., Costa, L. (2019). Low intensity light treatment improves purple kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) postharvest preservation at room temperature. *Heliyon*, 5(9), e02467.

Baron, C., Maradei, F.E., Bares, C. (1996). Manejo Post Cosecha de Brócoli. Publicación de la Corporación del Mercado Central de Buenos Aires, Inspección de Frutas y Hortalizas, p. 18.

Barth, MM., Zhuang, H. (1996). Packaging design affects antioxidant vitamin retention and quality of broccoli florets during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 9(2), 141–150.

Barth, C., Jander, G. (2006). *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *The Plant Journal*, 46(4), 549-562.

Bártoli, C., Yu, J., Gómez, F., Fernández, L., McIntosh, L., Foyer, C. (2006). Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1621–1631.

Bennett, R. N., Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4), 617-633.

Biswal, B. (1995). Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 30, 3–13.

Bläsing, O., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W., Stitt, M. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17, 3257–3281.

Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C. E., Burow, M., Rollin, P., Agerbirk, N. (2020). Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*, 169, 112100.

Bones, A. M., & Rossiter, J. T. (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, 97(1), 194-208.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates  
Chang A., Jeske L., Ulbrich S., Hofmann J., Koblitz J., Schomburg I., Neumann-Schaal M., Jahn D., Schomburg D., *Nucleic Acids Res.*, 49: D498-D508.

Brown, P., Tokuhiya, J., Reichelt, M., Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62, 471-481.

Brudenell A.J.P., Griffiths H., Rossiter J.T., Baker D.A. (1999). The phloem mobility of glucosinolates. *Journal of Experimental Botany*, 50, 745–756.

Burow, M., Losansky, A., Muller, R., Plock, A., Kliebenstein, D. J., Wittstock, U. (2009). The genetic basis of constitutive and herbivore-induced ESP-independent nitrile formation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(1), 561-574.

Büchert, A.M., Civello, P. M., Martínez, G.A. (2011a). Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytylation during senescence of broccoli. *Journal of Plant Physiology*, 168, 337–343.



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

Cantwell, M. I., Kasmire, R. F. (2002). Handling systems: Flower, leafy, and stem vegetables. *Postharvest technology of horticultural crops*, 423-432.

Cargnel, M., Demkura, P., Ballaré, C. (2014). Linking phytochrome to plant immunity: low red:far-red ratios increase *Arabidopsis* susceptibility to *Botrytis cinerea* by reducing the biosynthesis of indolic glucosinolates and camalexin. *New Phytologist*, 204, 342-354.

Cartea González, M. E., Francisco Candeira, M., Abilleira Ambroa, R., Velasco Pazos, P. (2008). Los glucosinatos como factor de calidad en las brásicas: degradación desde el campo hasta la mesa.

Castillejo Montoya, N., Martínez Zamora, L., Gómez di Marco, P. A., Artés Calero, F., Artés Hernández, F. D. A. (2021). Efecto de la iluminación UV-B en el crecimiento del hipocótilo durante la germinación de semillas de col roja.

Chang, A., Yang, T., Riskowski, G. (2013). Ascorbic acid, nitrate, and nitrite concentration relationship to the 24-hour light/dark cycle for spinach grown in different conditions. *Food Chemistry*, 138, 382–388.

Charles, F., Nilprapruck, P., Roux, D., Sallanon, H. (2018). Visible light as a new tool to maintain fresh-cut lettuce post-harvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, 135, 51-56.

Chen, S., Andreasson, E. (2001). Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant physiology and biochemistry*, 39(9), 743-758.

Chen, S., Petersen, B. L., Olsen, C. E., Schulz, A., Halkier, B. A. (2001). Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127(1), 194-201.

Chen, B., 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), 1915-1921.

Cia, P., Benato, E. A., Pascholati, S. F. (2010). Use of irradiation in postharvest disease management: problems and solutions. *Stewart Postharvest Review*, 6(4).

Civello, P. M., Vicente, A. R., Martínez, G. A. (2006). UV-C technology to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Recent advances in alternative postharvest technologies to control fungal diseases in fruits and vegetables*, 71-102.

Clarke, S. F., Jameson, P. E., Downs, C. (1994). The influence of 6-benzylaminopurine on post-harvest senescence of floral tissues of broccoli (*Brassica oleracea* var *Italica*). *Plant growth regulation*, 14(1), 21-27.

Clarkson, G., Rothwell, S., Taylor, G. (2005). End of day harvest extends shelf life. *HortScience*, 40, 1431–1435.

Clossais-Besnard, N., Larher, F. (1991). Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56(1), 25-38.

Costa, M. L., Civello, P. M., Chaves, A. R., Martínez, G. A. (2005b). Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*Brassica oleracea* L var *Italica*) heads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(7), 1154-1160.

Costa, L., Vicente, A. R., Civello, P. M., Chaves, A. R., Martinez, G. A. (2006a). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 39(2), 204-210.

Costa, M. L., Civello, P. M., Chaves, A. R., Martínez, G. A. (2006b). 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*, 86(7), 1125-1131.

Costa, L., Montano, Y. M., Carrión, C., Rolny, N., Guiamet, J. J. (2013). Application of low intensity light pulses to delay postharvest senescence of *Ocimum basilicum* leaves. *Postharvest biology and technology*, 86, 181-191.

Dangl, J., Dietrich, R., Thomas, H. (2000). Senescence and programmed cell death. In B. Buchanan, B. Grisse, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 925–982). Rockville, MD: American Society of Plant Biologists

Darré, M., Valerga, L., Araque, L. C. O., Lemoine, M. L., Demkura, P. V., Vicente, A. R., Concellón, A. (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*, 128, 76-82.

Di Pentima, J. H., Rios, J. J., Clemente, A., Olias, J. M. (1995). Biogenesis of off-odor in broccoli storage under low-oxygen atmosphere. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5), 1310-1313.

Del Pino, M. (2014). *Guía de cultivo y manejo del Brócoli*. Curso de Horticultura y Floricultura. FCAyF. Material editado por el Centro de Estudiantes de la Facultad de Cs. Agrarias y Forestales.

Domínguez-Perles, R., Martínez-Ballesta, M. C., Carvajal, M., García-Viguera, C., Moreno, D. A. (2010). Broccoli-derived by-products—A promising source of bioactive ingredients. *Journal of Food Science*, 75(4), C383-C392.

Downs, C. G., Somerfield, S. D., Davey, M. C. (1997). Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 11(2), 93–100.

Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141-149.

Duarte-Sierra, A., Forney, C. F., Michaud, D., Angers, P., Arul, J. (2017). Influence of hormetic heat treatment on quality and phytochemical compounds of broccoli florets during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 128, 44-53.

Elfving, D. C., Drake, S. R., Reed, A. N., & Visser, D. B. (2007). Preharvest applications of sprayable 1-methylcyclopropene in the orchard for management of apple harvest and postharvest condition. *HortScience*, 42(5), 1192-1199.

Esua, O. J., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Sukor, R. (2020). A review on individual and combination technologies of UV-C radiation and ultrasound in postharvest handling of fruits and vegetables. *Processes*, 8(11), 1433.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56 (1), 5–51.

Falovo, C., Schreiner, M., Schwarz, D., Colla, G., Krumbein, A. (2011). Phytochemical changes induced by different nitrogen supply forms and radiation levels in two leafy Brassica species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 4198–4207.

Fan, X., Argenta, L., Mattheis, J. P. (2000). Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots. *Postharvest Biology and Technology*, 20(2), 135-142.

FAO (2011) *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Rome.

Favre, N., Bárcena, A., Bahima, J. V., Martínez, G., Costa, L. (2018). Pulses of low intensity light as promising technology to delay postharvest senescence of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 142, 107-114.

Fernández-León, M., Fernández-León, A., Lozano, M., Ayuso, M., González-Gómez, D. (2013). Different postharvest strategies to preserve broccoli quality during storage and shelf life: Controlled atmosphere and 1-MCP. *Food Chemistry*, 138, 564–573.

Fernández-Trujillo, J. P., Artes, F. (1997). Quality improvement of peaches by intermittent warming and modified-atmosphere packaging. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 205(1), 59-63.

Filho, F. O., Silva, E. D. O., Lopes, M. M. D. A., Ribeiro, P. R. V., Oster, A. H., Guedes, J. A. C., de Souza Zampieri, D., do Nascimento Bordallo, P., Zocolo, G. J. (2020). Effect of pulsed light on postharvest disease control-related metabolomic variation in melon (*Cucumis melo*) artificially inoculated with *Fusarium pallidoroseum*. *Plos one*, 15(4), e0220097.

Foyer, C., Shigeoka, S. (2011). Update on oxidative stress and photo- synthesis understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155, 93–100.

Franzke, A., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M. A., Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in plant science*, 16(2), 108-116.

Freiman, Z. E., Rodov, V., Yablovitz, Z., Horev, B., Flaishman, M. A. (2012). Preharvest application of 1-methylcyclopropene inhibits ripening and improves keeping quality of 'Brown Turkey' figs (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae*, 138, 266-272.

Frerigmann, H., Gigolashvili, T. (2014). MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 7(5), 814-828.

Funamoto, Y., Yamauchi, N., Shigenaga, T. (2002). Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L). *Postharvest Biology and Technology*, 24, 163–170.

Garrido, Y., Tudela, J. A., 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*, 110, 9–17.

George, D. S., Razali, Z., Santhirasegaram, V., Somasundram, C. (2016). Effect of postharvest ultraviolet-C treatment on the proteome changes in fresh cut mango (*Mangifera indica* L. cv. Chokanan). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(8), 2851-2860.

Gil, M. I., Conesa, M. A., Artés, F. (2000). Modified atmosphere packaging of fresh-cut tomato. In *IV International Conference on Postharvest Science* 553 (pp. 703-704).

Gillies, S. L., Cliff, M. A., Toivonen, P. M. A., King, M. C. (1997). EFFECT OF ATMOSPHERE ON BROCCOLI SENSORY ATTRIBUTES IN COMMERCIAL MAP AND MICROPERFORATED PACKAGES 1. *Journal of food quality*, 20(2), 105-115.

Gergoff Grozeff, G. E. G., Chaves, A. R., Bartoli, C. G. (2013). Low irradiance pulses improve postharvest quality of spinach leaves (*Spinacia oleracea* L. cv Bison). *Postharvest biology and technology*, 77, 35-42.

Gómez-Lobato, M. E., Hasperué, J. H., Civello, P. M., Chaves, A. R., Martínez, G. A. (2012a). Effect of 1-MCP on the expression of chlorophyll degrading genes during senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Scientia Horticulturae*, 144, 208-211.

Gomez-Lobato, M. E., Civello, P. M., Martínez, G. A. (2012b). Effects of ethylene, cytokinin and physical treatments on BoPaO gene expression of harvested broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(1), 151-158.

Graser, G., Oldham, N. J., Brown, P. D., Temp, U., Gershenzon, J. (2001). The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 57(1), 23-32.

Grubb, C. D., Abel, S. (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in plant science*, 11(2), 89-100.

Guo, Y., Gao, Z., Li, L., Wang, Y., Zhao, H., Hu, M., Li, M., Zhang, Z. (2013). Effect of controlled atmospheres with varying O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> levels on the postharvest senescence and quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) florets. *European Food Research and Technology*, 237(6), 943-950.

Guo, L., Yang, R., Zhou, Y., Gu, Z. (2016). Heat and hypoxia stresses enhance the accumulation of aliphatic glucosinolates and sulforaphane in broccoli sprouts. *European Food Research Technology*, 242(1):107–16.

Guo, Y., Wang, L., Chen, Y., Yun, L., Liu, S., Li, Y. (2018). Stalk length affects the mineral distribution and floret quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) heads during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 145, 166-171.

Halkier, B., Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 303-333.

Hara, M., Harazaki, A., Tabata, K. (2013). Administration of isothiocyanates enhances heat tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 69(1), 71–7.

Hasperué, J. H., Chaves, A. R., Martínez, G.A. (2011). End of day harvest delays postharvest senescence of broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 64–70.

Hasperué, J. H., Gómez-Lobato, M. E., Chaves, A. R., Civello, P. M., Martínez, G. A. (2013). Time of day at harvest affects the expression of chlorophyll degrading genes during postharvest storage of broccoli. *Postharvest biology and technology*, 82, 22-27.

Hasperué, J. H., Guardianelli, L., Rodoni, L. M., Chaves, A. R., Martínez, G. A. (2016). Continuous white–blue LED light exposition delays postharvest senescence of broccoli. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 495-502.

Huang, K., Zou, Y., Luo, J., Liu, Y. (2015). Combining UV-C treatment with biocontrol yeast to control postharvest decay of melon. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 14307-14313.

Huber, D. J. (1987) Postharvest senescence: an introduction to the symposium. HortScience (USA).

Huseby, S., Koprivova, A., Lee, B. R., Saha, S., Mithen, R., Wold, A. B., Gunnar, B., Kopriva, S. (2013). Diurnal and light regulation of sulphur assimilation and glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 64(4), 1039-1048.

Ivanov, B. (2014). Role of ascorbic acid in photosynthesis. *Biochemistry*, 79, 282–289.

Jagadeesh, S. L., Charles, M. T., Garipey, Y. (2011). Influence of Postharvest UV-C Hormesis on the Bioactive Components of Tomato during Post-treatment Handling, 1463–1472.

Jiang, A., Zuo, J., Zheng, Q., Guo, L., Gao, L., Zhao, S., Wang, Q., Hu, W. (2019). Red LED irradiation maintains the postharvest quality of broccoli by elevating antioxidant enzyme activity and reducing the expression of senescence-related genes. *Scientia Horticulturae*, 251, 73-79.

Jin, H., Jin, S., Chen, L., Cen, S., Yuan, K. (2015a). Research on the lighting performance of LED street lights with different color temperatures. *IEEE Photonics Journal*, 7(6), 1–9.

Jin, P., Yao, D., Xu, F., Wang, H., Zheng, Y. (2015b). Effect of light on quality and bioactive compounds in postharvest broccoli florets. *Food Chemistry*, 172, 705–709.

- Jørgensen, M. E., Nour-Eldin, H. H., Halkier, B. A. (2015). Transport of defense compounds from source to sink: lessons learned from glucosinolates. *Trends in plant science*, 20(8), 508-514.
- Kader, A. A. (1985). Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. *HortScience*, 20(1), 54-57.
- Kader, A. A., Zagory, D., Kerbel, E. L., Wang, C. Y. (1989). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 28(1), 1-30.
- Kader, A. A. (2002). *Postharvest technology of horticultural crops* (Vol. 3311). University of California Agriculture and Natural Resources.
- Kato, M., Kamo, T., Wang, R., Nishikawa, F., Hyodo, H., Ikoma, Y., Sugiura M., Yano, M. (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(1), 69-78.
- King, G.A., Morris, S.C. (1994). Physiological changes of broccoli during early postharvest senescence and through the preharvest/ postharvest continuum. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 270–275.
- Koukounaras, A., Sfakiotakis, E. (2007). Effect of 1-MCP prestorage treatment on ethylene and CO<sub>2</sub> production and quality of 'Hayward' kiwifruit during shelf-life after short, medium and long term cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 46(2), 174-180.
- Ku, V. V. V., Wills, R. B. H. (1999). Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 17(2), 127-132.
- Ku, K. M., Choi, J.-H., Kushad, M. M., Jeffery, E. H., Juvik, J. A. (2013). Pre-harvest methyl jasmonate treatment enhances cauliflower chemoprotective attributes without a loss in postharvest quality. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(2), 113–117.
- Kuai, B., Chen, J., Hörtensteiner, S. (2018). The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *Journal of Experimental Botany*, 69(4), 751-767.



- Lai, A., Doherty, C., Mueller-Roeber, B., Kay, S., Schippers, J., Dijkwel, P. (2012). Circadian clock-associated 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 17129–17134.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In R. D. Lester Packer (Ed.), *Methods in enzymology*, 148, 350–382.
- Liebsch, D., Keech, O. (2016). Dark-induced leaf senescence: new insights into a complex light-dependent regulatory pathway. *New Phytologist*, 212(3), 563-570.
- Lipton, W. J. (1974). Controlled atmosphere effects on the market quality of stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Journal of American Society of Horticulture Science*, 99(3), 200-205.
- Liu, C., Cai, L., Han, X., Ying, T. (2011). Temporary effect of postharvest UV-C irradiation on gene expression profile in tomato fruit. *Gene*, 486(1-2), 56-64.
- Liu, H., Cao, J., Jiang, W. (2015). Changes in phenolics and antioxidant property of peach fruit during ripening and responses to 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 108, 111–118.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265.
- Luo, Z., Xie, J., Xu, T., Zhang, L. (2009). Delay ripening of 'Qingnai' plum (*Prunus salicina* Lindl.) with 1-methylcyclopropene. *Plant Science*, 177(6), 705-709.
- Lurie, S., Pedreschi, R. (2014). Fundamental aspects of postharvest heat treatments. *Horticulture Research*, 1.
- Ma, G., Zhang, L., Kato, M., Yamawaki, K., Asai, T., Nishikawa, F., Ikoma, Y., Matsumoto, H. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene on the expression of genes for ascorbate metabolism in postharvest broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 58, 121–128.
- Ma, G., Zhang, L., Kato, M., Yamawaki, K., Asai, T., Nishikawa, F., Ikoma, Y., Kamisako, T. (2012). Effect of electrostatic atomization on ascorbate metabolism in postharvest broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 74, 19–25.

Ma, N., Xue, J., Li, Y., Liu, X., Dai, F., Jia, W., Gao, J. (2008). Rh-PIP2; 1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant physiology*, 148(2), 894-907.

Mahajan, P. V., Caleb, O. J., Singh, Z., Watkins, C. B., Geyer, M. (2014). Postharvest treatments of fresh produce. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 372(2017), 20130309.

Makhlouf, J., Castaigne, F., Arul, J., Willemot, C., Gosselin, A. (1989a). Long-term storage of broccoli under controlled atmosphere. *HortScience*, 24 (4), 637-639.

Makhlouf, J., Willemot, C.; Arul, J., Castaigne, F., Emond, J.- P. (1989b). Regulation of ethylene biosynthesis in broccoli flower buds in controlled atmospheres. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114 (6), 955-958.

Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., Valero, D., Serrano, M. (2003). Modified atmosphere packaging maintains quality of table grapes. *Journal of Food Science*, 68(5), 1838-1843.

Masclaux-Daubresse C., Havé M., Marmagne A., Chardon F. (2016). Nitrogen remobilisation during leaf senescence: lessons from *Arabidopsis* to crops. *Journal of Experimental Botany*, 68 (10), 2513–2529.

McKey, D. (1974). Adaptive patterns in alkaloid physiology. *The American Naturalist*, 108(961), 305-320.

Mellon, F. A., Bennett, R. N., Holst, B., Williamson, G. (2002). Intact glucosinolate analysis in plant extracts by programmed cone voltage electrospray LC/MS: Performance and comparison with LC/MS/MS methods. *Analytical Biochemistry*, 306 (1), 83–91.

Mewis, I., Schreiner, M., Nguyen, C. N., Krumbein, A., Ulrichs, C., Lohse, M., Zrenner, R. (2012). UV-B irradiation changes specifically the secondary metabolite profile in broccoli sprouts: induced signaling overlaps with defense response to biotic stressors. *Plant and Cell Physiology*, 53(9), 1546-1560.

Mikkelsen, M. D., Petersen, B. L., Glawischnig, E., Jensen, A. B., Andreasson, E., Halkier, B. A. (2003). Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant physiology*, 131(1), 298-308.

Moreira-Rodríguez, M., Nair, V., Benavides, J., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. A. (2017). UVA, UVB light, and methyl jasmonate, alone or combined, redirect the biosynthesis of glucosinolates, phenolics, carotenoids, and chlorophylls in broccoli sprouts. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2330.

Mukherjee, S., Gangopadhyay, H., Das, D. K. (2008). Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(2), 609-617.

Namesny, A. (1993). Post-recolección de hortalizas. Vol I-Hortalizas de hoja, tallo y flor. Ediciones de horticultura. Reus, España. 329 pp.

Namesny, A. Brócoli. In Post-recolección de hortalizas; Ediciones de Horticultura: Reus, Spain, 1996; Vol. 1., pp 281- 298.

Neugart, S., Baldermann, S., Hanschen, F. S., Klopsch, R., Wiesner-Reinhold, M., Schreiner, M. (2018). The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 460–478.

Noodén LD (1988a). The Phenomena of Senescence and Aging. En: *Senescence and Aging in Plants*. Noodén LD, Leopold AC, (Eds), Academic Press, pp. 2- 38.

Nour-Eldin, H. H., Andersen, T. G., Burow, M., Madsen, S. R., Jørgensen, M. E., Olsen, C. E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D., Halkier, B. A. (2012). NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature*, 488(7412), 531-534.

Page, T., Griffiths, G., Buchanan-Wollaston, V. (2001). Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiology*, 125(2), 718-727.

Paliyath,G. (2008). Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers. xii. Ames, IA: Wiley-Blackwell. 482 pp.

Palou, L. (2009). Control of citrus postharvest diseases by physical means. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 3, 127-142.

Pan, J., Vicente, A. R., Martínez, G. A., Chaves, A. R., Civello, P. M. (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), 1831-1838.

Perini, M. A., Sin, I. N., Jara, A. M. R., Lobato, M. E. G., Civello, P. M., Martínez, G. A. (2017). Hot water treatments performed in the base of the broccoli stem reduce postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var *italica*) heads stored at 20 C. *LWT*, 77, 314-322.

PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences  
Magali Lescot, Patrice Dhais, Gert Thijs, Kathleen Marchal, Yves Moreau, Yves Van de Peer, Pierre Rouz and Stephane Rombauts  
*Nucleic Acids Res.* 2002 Jan 1;30(1):325-327.

Pogson, B. J., Downs, C. G., Davies, K. M. (1995). Differential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes in broccoli after harvest. *Plant Physiology*, 108(2), 651-657.

Pogson, B. J., Morris, S. C. (2004). Postharvest Senescence of Vegetables and its Regulation. *Plant Cell Death Processes*. Noodén L.D. (Eds). Elsevier Academic Press., 319–329.

Pombo, M. A., Dotto, M. C., Martínez, G. A., Civello, P. M. (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), 141-148.

Prange, R. K., Ramin, A. A., Daniels-Lake, B. J., DeLong, J. M., Braun, P. G. (2006). Perspectives on postharvest biopesticides and storage technologies for organic produce. *HortScience*, 41(2), 301-303.

Prieto, M. A., López, C. J., Simal-Gandara, J. (2019). Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Advances in food and Nutrition Research*, 90, 305-350.

Queb-González, D. B., Lopez-Malo, A., Sosa-Morales, M. E., Villa-Rojas, R. (2020). Postharvest heat treatments to inhibit *Penicillium digitatum* growth and maintain quality of Mandarin (*Citrus reticulata* blanco). *Heliyon*, 6(1), e03166.

Raham, G. (1986). Pill bug biology: A spider's spinach, but a biologist's delight. *The American Biology Teacher*, 48(1), 9-16.

Ramos, S. J., Yuan, Y., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Li, L. (2011). Evaluation of genotypic variation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in response to selenium treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3657–3665.

Rangkadilok, N., Tomkins, B., Nicolas, M. E., Premier, R. R., Bennett, R. N., Eagling, D. R., Taylor, P. W. (2002). The effect of post-harvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7386-7391.

Raseetha, S., Leong, S., Burritt, D., Oey, I. (2013). Understanding the degradation of ascorbic acid and glutathione in relation to the levels of oxidative stress biomarkers in broccoli (*Brassica oleracea* L. *italica* cv. Bellstar) during storage and mechanical processing. *Food Chemistry*, 138, 1360–1369.

Reifenrath, K., Müller, C. (2007). Species-specific and leaf-age dependent effects of ultraviolet radiation on two Brassicaceae. *Phytochemistry*, 68(6), 875-885.

Rodman, J. E. (1991). A taxonomic analysis of glucosinolate-producing plants, part 2: cladistics. *Systematic Botany*, 619-629.

Rushing, J. W. (1990). Cytokinins Affect Respiration, Ethylene Production, and Chlorophyll Retention of Packaged Broccoli Florets. *Horticulture Science*, 25(1), 88–90.

Rybarczyk-Plonska, A., Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Bengtsson, G. B., Hansen, M. K., Wold, A.-B. (2016). Glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) as affected by postharvest temperature and radiation treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 116, 16–25.

Sawada, Y., Kuwahara, A., Nagano, M., Narisawa, T., Sakata, A., Saito, K., Yokota Hirai, M. (2009). Omics-based approaches to methionine side chain elongation in *Arabidopsis*:

characterization of the genes encoding methylthioalkylmalate isomerase and methylthioalkylmalate dehydrogenase. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1181-1190.

Schäfer, J., Stanojlovic, L., Trierweiler, B., & Bunzel, M. (2017). Storage related changes of cell wall based dietary fiber components of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) stems. *Food Research International*, 93, 43-51.

Schreiner, M., Peters, P., Krumbein A. (2006). Glucosinolates in mixed-packaged mini broccoli and mini cauliflower under modified atmosphere. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2218–2222.

Schonhof, I., Klaring, H. P., Krumbein, A., Claußen, W., Schreiner, M. (2007). Effect of temperature increase under low radiation conditions on phytochemicals and ascorbic acid in greenhouse grown broccoli. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 119(1), 103–111.

Schuster, J., Knill, T., Reichelt, M., Gershenzon, J., Binder, S. (2006). BRANCHEDCHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 18(10), 2664–2679.

Siddiqui, M. W., Singh, J. P., Nayyer, M., Barman, K., Ahmad, M. S., Kumar, V. (2015). 6-Benzylaminopurine affects lipid peroxidation and membrane permeability and thereby preserves curd quality and antioxidants during storage of cauliflower. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(5), 1-8.

Simkin, A., Zhu, C., Kuntz, M., Sandmann, G. (2003). Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160, 439–443.

Serrano, M., Martinez-Romero, D., Guillen, F., Castillo, S., Valero, D. (2006). Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 39(1), 61-68.

Soengas, P., Cartea, M. E., Velasco, P., Francisco, M. (2018). Endogenous circadian rhythms in polyphenolic composition induce changes in antioxidant properties in *Brassica* cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(24), 5984-5991.

Sønderby, I. E., Burow, M., Rowe, H. C., Kliebenstein, D. J., Halkier, B. A. (2010). A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 153(1), 348-363.

Stoppani, M. I., Francescangeli, N. (2000). El brócoli y su potencial: hortaliza top del tercer milenio. INTA EEA San Pedro.

Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology*, 4(5), 447-456.

Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J. (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 & Technology*, 51, 34-40.

Textor, S., De Kraker, J. W., Hause, B., Gershenzon, J., Tokuhsa, J. G. (2007). MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 144(1), 60-71.

Tian, M.S., Davies, L., Downs, C.G., Liu, X.F., Lill, R.E. (1995). Effects of floret maturity, cytokinin and ethylene on broccoli yellowing after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 6, 29–40.

Torres-Contreras, A. M., Nair, V., Senés-Guerrero, C., Pacheco, A., González-Agüero, M., Ramos-Parra, P. A., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. A. (2021). Chemical Genetics Applied to Elucidate the Physiological Role of Stress-Signaling Molecules on the Wound-Induced Accumulation of Glucosinolates in Broccoli. *Plants*, 10(12), 2660.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M., Van Loey, A. (2007). Kinetics of the stability of broccoli (*Brassica oleracea* Cv. *Italica*) myrosinase and isothiocyanates in broccoli juice during pressure/temperature treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2163-2170.

Villarreal-García, D., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., 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. *Frontiers in plant science*, 7, 45.

- Wan, C.-Y., Wilkins, T. A. (1994). A modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Analytical Biochemistry*, 7–12.
- Wang, C.Y. (1977). Effect of aminoethoxy analog of rhizobitoxine and sodium benzoate on senescence of broccoli. *HortScience*, 12, 54–56.
- Wang, Y., Yang, C., Chen, Y., Lin, Y., Shaw, J. (2004). Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 663–670.
- Wang, W. K., Schaal, B. A., Chiou, Y. M., Murakami, N., Ge, X. J., Huang, C. C., Chiang, T. Y. (2007). Diverse selective modes among orthologs/paralogs of the chalcone synthase (Chs) gene family of *Arabidopsis thaliana* and its relative *A. halleri* ssp. *gemmaifera*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(2), 503-520.
- Wang, J., Gu, H., Yu, H., Zhao, Z., Sheng, X., Zhang, X. (2012). Genotypic variation of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) florets from China. *Food Chemistry*, 133(3), 735–741.
- Warner, R., Wu, B. S., MacPherson, S., Lefsrud, M. (2021). A review of strawberry photobiology and fruit flavonoids in controlled environments. *Frontiers in Plant Science*, 33.
- Watkins, C. B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, 24(4), 389–409.
- Wei, Y., Liu, Z., Su, Y., Liu, D., Ye, X. (2011). Effect of salicylic acid treatment on postharvest quality, antioxidant activities, and free polyamines of asparagus. *Journal of food science*, 76(2), 126-132.
- Wen, J., Li, P. F., Ran, F., Guo, P. C., Zhu, J. T., Yang, J., Zhang, L.L., Chen, P., Li, J., Du, H. (2020). Genome-wide characterization, expression analyses, and functional prediction of the NPF family in *Brassica napus*. *BMC genomics*, 21(1), 1-17.
- Wittstock, U., Halkier, B. A. (2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in plant science*, 7(6), 263-270.



Wittstock, U., Burow, M. (2007). Tipping the scales-specifier proteins in glucosinolate hydrolysis. *Plant Life*, 59(12), 744-751.

Woo, H., Cho, S., Han, Y., Chae, W. S., Ahn, D. R., You, Y., Nam, W. (2013). Synthetic control over photoinduced electron transfer in phosphorescence zinc sensors. *Journal of the American Chemical Society*, 135(12), 4771-4787.

Xu, C. J., Guo, D. P., Yuan, J., Yuan, G. F., Wang, Q. M. (2006). Changes in glucoraphanin content and quinone reductase activity in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) florets during cooling and controlled atmosphere storage. *Postharvest biology and technology*, 42(2), 176-184.

Xu, F., Yang, Z., Chen, X., Jin, P., Wang, X., Zheng, Y. (2012). 6- Benzylaminopurine delays senescence and enhances health-promoting compounds of harvested broccoli. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 234–240.

Xu, D., Hanschen, F. S., Witzel, K., Nintemann, S. J., Nour-Eldin, H. H., Schreiner, M., Halkier, B. A. (2017). Rhizosecretion of stele-synthesized glucosinolates and their catabolites requires GTR-mediated import in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 68(12), 3205-3214.

Xue, M., Long, J., Jiang, Q., Wang, M., Chen, S., Pang, Q., He, Y. (2015). Distinct patterns of the histone marks associated with recruitment of the methionine chain-elongation pathway from leucine biosynthesis. *Journal of experimental botany*, 66(3), 805-812.

Yi, G., Robin, A., Yang, K., Park, J., Hwang, B., Nou, I. (2016). Exogenous methyl jasmonate and salicylic acid induce subspecies-specific patterns of glucosinolate accumulation and gene expression in *Brassica oleracea* L. *Molecules*, 21, 1417.

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

Zimmermann, N. S., Gerendas, J., Krumbein, A. (2007). Identification of desulphoglucosinolates in Brassicaceae by LC/MS/MS: Comparison of ESI and atmospheric pressure chemical ionisation-MS. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(12), 1537–1546.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Wu, J. (1999). The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64, 555–559.

Zhuang, H., Barth, MM., Hildebrand DF. (1994). Packaging influenced total chlorophyll, soluble protein, fatty acid composition and lipoxygenase activity in broccoli florets. *Journal of Food Science*, 59(6), 1171–1174.