

**Universidad Autónoma Metropolitana  
Iztapalapa**



**Casa abierta al tiempo**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Departamento de Biotecnología



**Regulación de la senescencia foliar poscosecha por aplicación de ciclos de  
luz oscuridad en berro (*Nasturtium officinale* R. Br.)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**I.A. JUAN PABLO CARREÓN HIDALGO**

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTORA:

DRA. CLARA PELAYO ZALDÍVAR

ASESORES:

DRA. LAURA J. PÉREZ FLORES

DR. FERNANDO DÍAZ DE LEÓN SÁNCHEZ

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA POSCOSECHA DE FRUTAS Y HORTALIZAS, UAM-I

LABORATORIO DE FISIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS, UAM-I

**MÉXICO D.F. A 8 DE SEPTIEMBRE DE 2017**

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, además de contar con el apoyo del mismo consejo, con el número de registro 0471-0”

Esta tesis se realizó en los Laboratorios de Biotecnología Poscosecha de Frutas y Hortalizas y Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la doctora Clara Pelayo Zaldívar y la asesoría de los doctores Laura Josefina Pérez Flores y Fernando Díaz de León Sánchez.



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00244  
Matrícula: 2153805293

REGULACIÓN DE LA SENESCENCIA FOLIAR POSCOSECHA POR APLICACIÓN DE CICLOS DE LUZ OSCURIDAD EN BERRO (*Nasturtium officinale* R. Br).

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 8 del mes de septiembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES  
DR. JOSE ALBERTO MENDOZA ESPINOZA  
DR. ANGEL ERNESTO BAÑUELOS HERNANDEZ  
DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: JUAN PABLO CARREON HIDALGO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**APROBAR**

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JUAN PABLO CARREON HIDALGO  
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES

VOCAL

DR. JOSE ALBERTO MENDOZA ESPINOZA

VOCAL

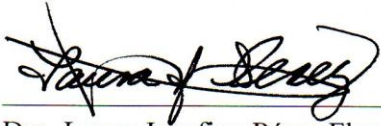
DR. ANGEL ERNESTO BAÑUELOS HERNANDEZ

SECRETARIO

DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

Los miembros del jurado de examen, designados por el posgrado en Biotecnología y abajo firmantes aprobaron la tesis **“Regulación de la senescencia foliar poscosecha por aplicación de ciclos de luz oscuridad en berro (*Nasturtium officinale* R. Br.)”**. Por Juan Pablo Carreón Hidalgo quien realizó la disertación pública el 8 de septiembre de 2017, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

**Presidente**



Dra. Laura Josefina Pérez Flores

**Secretario**



Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

**Vocal**



Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

**Vocal**



Dr. Ángel Ernesto Bañuelos Hernández

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca 592564.

Principalmente a la doctora Clara Pelayo Zaldívar. Si durante mi licenciatura no la hubiera conocido, posiblemente no habría decidido estudiar un posgrado. Muchas gracias por demostrar tanto entusiasmo y gusto por la ciencia durante sus clases, usted es y siempre será un ejemplo a seguir.

A los doctores Laura Josefina Pérez Flores y Fernando Díaz de León Sánchez, muchas gracias por todo su apoyo en la realización de mi proyecto, así como por todas sus enseñanzas.

A Hidai Beiza Macedo, por toda su ayuda en la realización de los experimentos y el cuidado de las plantas de *Arabidopsis thaliana*. Muchas gracias por todo tu tiempo y esfuerzo, este trabajo es tanto tuyo como mío.

A la doctora Marina Gavilanes Ruiz, así como a la técnica titular académica María del Consuelo Enríquez Arredondo, de la Facultad de Química de la UNAM, por su infinita ayuda y el préstamo del espacio en su invernadero para el cultivo de las plantas de *A. thaliana*.

A todos mis compañeros de los laboratorios S-156 y S-253. De todos y cada uno aprendí algo que me fue de utilidad durante mi trabajo de maestría.

A Leonardo Castillo Pelayo por su contribución con la traducción al inglés del resumen en esta tesis.

## **Dedicatorias**

*A mi familia, especialmente a mi mamá Cristina Dolores Hidalgo Hernández, a mi papá Gregorio Carreón Pérez y a mi hermano Diego Emilio Carreón Hidalgo. Ustedes son mi razón de ser.*

# Contenido

Agradecimientos .....	v
Dedicatorias .....	vi
Índice de figuras .....	xi
Índice de cuadros .....	xvi
Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
1. Marco teórico.....	5
1.1 Senescencia en plantas.....	5
1.2 Senescencia foliar y catabolismo de los diferentes componentes celulares durante esta etapa.....	7
1.2.1 Degradación de biomoléculas durante la senescencia foliar .....	9
1.2.1.1 Catabolismo de la clorofila.....	9
1.2.2.2 Metabolismos de carotenoides y otros pigmentos .....	11
1.2.2.3 Catabolismo de proteínas .....	12
1.2.2.4 Catabolismo de ácidos nucleicos y membranas celulares .....	12
1.3 Reversión de la senescencia .....	13
1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo.....	15
1.5 Expresión de genes en <i>A. thaliana</i> durante la senescencia.....	16
1.5.1 Genes asociados con la senescencia en <i>A. thaliana</i> .....	18
1.6 El efecto de la intensidad de la luz en la senescencia foliar .....	19

1.6.1 Variación en la expresión de genes de <i>A. thaliana</i> por efecto de las condiciones de iluminación .....	20
1.7 Radiación fotosintéticamente activa .....	21
1.8 Senescencia poscosecha de hortalizas y el efecto de la luz durante su almacenamiento a bajas temperaturas .....	22
1.8.1 Ciclos circadianos en estudios poscosecha.....	23
1.9 Composición del berro, métodos y condiciones recomendados para su almacenamiento .....	25
2. Justificación .....	29
3. Objetivo general .....	30
4. Objetivos particulares .....	30
5. Hipótesis .....	31
6. Materiales y métodos.....	32
6.1 Materiales .....	32
6.1.1 Material biológico .....	32
6.1.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
6.1.1.2 Berro .....	32
6.1.2 Instalación para evaluar el efecto de la luz.....	32
6.2 Diseño experimental.....	33
6.3 Metodologías .....	35
6.3.1 Corte y limpieza del material biológico .....	35
6.3.2 Pérdida de peso.....	35
6.3.3 Medición del color en la hoja .....	36
6.3.4 Concentración de clorofila y carotenoides totales.....	36



6.3.5 Cuantificación de proteína soluble .....	37
7. Resultados.....	38
7.1 Experimento con hojas de berro a 10 °C (22/Julio/2016).....	38
7.1.1 Clorofila total.....	38
7.1.2 Carotenoides totales.....	39
7.1.3 Concentración de proteína soluble .....	40
7.1.4 Color .....	41
7.1.5 Porcentaje de pérdida de peso .....	43
7.2 Experimento con hojas y manojos de berro a 4 °C (8/Noviembre/2016).....	44
7.2.1 Clorofila total.....	44
7.2.2 Carotenoides totales.....	45
7.2.3 Concentración de proteína soluble .....	46
7.2.3 Color .....	47
7.2.4 Porcentaje de pérdida de peso .....	49
7.3 Experimento con manojos de berro y plantas de <i>A. thaliana</i> a 10 °C (25/Noviembre/2016) .....	50
7.3.1 Clorofila total.....	50
7.3.2 Carotenoides totales.....	52
7.3.3 Concentración de proteína soluble .....	53
7.3.4 Color .....	54
7.3.5 Porcentaje de pérdida de peso .....	56
7.4 Experimento con manojos de berro y plantas de <i>A. thaliana</i> a 10 °C (5/Abril/2017) .....	57
7.4.1 Clorofila total.....	57

7.4.2 Carotenoides totales.....	59
7.4.3 Concentración de proteína soluble .....	60
7.4.4 Color .....	61
7.4.5 Porcentaje de pérdida de peso .....	63
8. Conclusiones.....	65
9. Perspectivas y recomendaciones .....	67
10. Literatura citada.....	68
11. Anexos.....	77
A.1 Formulación del medio de Hoagland.....	77

## Índice de figuras

Figura 1. Las tres etapas de la senescencia en hojas y sus características fisiológicas (Yoshida, 2003). .....	8
Figura 2. Esquema propuesto que muestra las etapas de la senescencia en hojas, desde la señal de iniciación a la muerte celular (Buchanan et al., 2015). .....	9
Figura 3. Cambio gradual en el color de hojas de <i>A. thaliana</i> (ecotipo silvestre) tratadas con oscuridad continua con el objetivo de inducir la senescencia. d: días del tratamiento de oscuridad (Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016). .....	10
Figura 4. La ruta de degradación de clorofilas y su organización subcelular durante la senescencia. Las enzimas o reacciones se identifican como sigue: 1, SGR; 2, Clorofila b reductasa; 3, agente quelante; 4, feofitinasas; 5, feoforbido a oxigenasa; 6, RCC reductasa; 7, transportador de catabolitos dependiente de ATP; 8, transportador ABC (Buchanan et al., 2015). .....	11
Figura 5. Esquema del punto de no retorno durante la autofagia que se presenta en la muerte celular programada (Van Doorn, 2005). .....	14
Figura 6. Etapas durante el proceso de senescencia donde intervienen diferentes categorías de genes. Se trata de una clasificación conceptual, por lo que un solo gen podría estar dentro de más de dos categorías (Lim, 2003). .....	18
Figura 7. Estructura química de la zeaxantina y la luteína, carotenoides encontrados en el berro (Lichtenthaler, 1987). .....	26
Figura 8. Estructura de algunos glucosinolatos encontrados en hortalizas y plantas de la familia Cruciferae (crucíferas) (Ishida, Hara, Fukino, Kakizaki, & Morimitsu, 2014). .....	27
Figura 9. Representación visual de los parámetros L*, a*, b* y h* ( <i>Hue angle</i> ). .....	36

Figura 10. Clorofila total durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y HR =  $92 \pm 1.1\%$  de hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....38

Figura 11. Carotenoides totales durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y HR =  $92 \pm 1.1\%$  de hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....39

Figura 12. Proteína soluble durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y HR =  $92 \pm 1.1\%$  de hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....40

Figura 13. Parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $h^*$  durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y HR =  $92 \pm 1.1\%$  en hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....42

Figura 14. Porcentaje de pérdida de peso durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y HR =  $92 \pm 1.1\%$  en hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....43

Figura 15. Clorofila total durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  de hojas (A) y manojos (B) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....44

Figura 16. Carotenoides totales durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  de hojas (A) y manojos (B) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).  
 .....45

Figura 17. Proteína soluble durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  de hojas (A) y manojos (B) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).  
 .....46

Figura 18. Parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  y  $h^*$  durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  en hojas (A1-4) y manojos (B1-4) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).  
 .....48

Figura 19. Pérdida de peso durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  en manojos (B) y hojas (A) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).  
 .....49

Figura 20. Clorofila total durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y HR =  $90.6 \pm 1.6\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).  
 .....50

Figura 21. Carotenoides totales durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y HR =  $90.6 \pm 1.6\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....52

Figura 22. Proteína soluble durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y HR =  $90.6 \pm 1.6\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ )......53

Figura 23. Parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  y  $h^*$  durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y HR =  $90.6 \pm 1.6\%$  en plantas de *A. thaliana* (A1-4) y manojos de berro (B1-4) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....55

Figura 24. Pérdida de peso durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y HR =  $90.6 \pm 1.6\%$  en plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....56

Figura 25. Clorofila total durante el almacenamiento a  $9.9 \pm 1.4$  °C y HR =  $90.6 \pm 2.3\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....57

Figura 26. Carotenoides totales durante el almacenamiento a  $9.9 \pm 1.4$  °C y HR =  $90.6 \pm 2.3\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).....59

Figura 27. Proteína soluble durante el almacenamiento a  $9.9 \pm 1.4$  °C y HR =  $90.6 \pm 2.3\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).....60

Figura 28. Parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  y  $h^*$  durante el almacenamiento a  $9.9 \pm 1.4$  °C y HR =  $90.6 \pm 2.3\%$  en plantas de *A. thaliana* (A1-4) y manojos de berro (B1-4) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12h/12h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....62

Figura 29. Pérdida de peso durante el almacenamiento  $9.9 \pm 1.4$  °C y HR =  $90.6 \pm 2.3\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones + DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ). .....63

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Clases y cantidad de genes cuya expresión aumenta durante durante la senescencia natural de la hoja (Azcón-Bieto & Talón, 2003) .....	17
Cuadro 2. Composición nutricional del berro (Muñoz et al., 2010).....	25
Cuadro 3. Condiciones utilizadas para el cultivo en invernadero de <i>A. thaliana</i> .....	32
Cuadro 4. Condiciones establecidas en cuatro experimentos independientes con berro y/o <i>A. thaliana</i> .....	33
Cuadro 5. Distribución de las unidades experimentales (UE) utilizadas en cada experimento por especie (berro y <i>A. thaliana</i> ) o presentación (hojas y manojos de berro) .....	34



## Resumen

En el presente estudio se evaluó el efecto de la aplicación de ciclos 12 h/ 12 h luz oscuridad durante el almacenamiento poscosecha a 4 y 10 °C por siete días en hojas y manojos de berro (*Nasturtium officinale* R. Br.) sobre los niveles de clorofila total, carotenoides totales y proteína soluble, así como en variables poscosecha como el color (parámetros cromáticos a\*, b\*, L\* y h\*) y el porcentaje de pérdida de peso. El estudio se llevó a cabo de forma secuencial en cuatro experimentos con el objetivo principal de determinar el efecto de la aplicación de los ciclos luz oscuridad en diferentes presentaciones de berro (hoja y manojos) y condiciones de almacenamiento refrigerado (4 y 10 °C). En el experimento tres y cuatro los resultados obtenidos en berro fueron comparados con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

A una temperatura de almacenamiento refrigerado de 10 °C se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento de luz oscuridad y un control (oscuridad continua) para la mayor parte de las variables estudiadas tanto en hojas como en manojos de berro. En clorofila, carotenoides y proteína soluble se observó un retraso en la disminución del contenido de estos componentes en uno o más días de almacenamiento para el tratamiento de luz oscuridad. En los parámetros a\*, b\*, L\* y h\* se observó un paso más lento de tonalidades verdes a amarillas por el efecto de la aplicación de ciclos luz oscuridad, mientras que en el caso del porcentaje de pérdida de peso se registraron valores mayores para este mismo tratamiento, pero sin sobrepasar en el caso de manojos, el límite recomendado de pérdida de peso para berro (7%).

En *A. thaliana* almacenada a 10 °C y en hojas y manojos de berro almacenados a 4 °C se observaron diferencias en sólo en algunas variables, como en el caso de clorofila total y carotenoides totales, observándose una tendencia al retraso en la disminución del contenido de estos componentes por la aplicación de los ciclos luz oscuridad. La pérdida de peso mostró comportamientos similares en estos experimentos, con pérdidas mayores para el tratamiento de luz oscuridad. Estos resultados podrían indicar que a bajas temperaturas de almacenamiento refrigerado (4 °C) el efecto de los ciclos luz oscuridad deja de ser tan relevante debido a la reducción de la actividad metabólica.

## Abstract

In the present study, the effect of 12 h/12 h light/dark cycles on the postharvest quality of the watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) during storage at 4 and 10 °C was evaluated for a total of seven days. Specifically, values for parameters such as total chlorophyll, total carotenoids and total soluble protein, as well as those for postharvest variables such as color (measured in terms of a\*, b\*, L\* and h\* co-ordinates) and percentage weight loss, were determined both in individual leaves and stems tied in bundles. The study was carried out sequentially in four different experiments with the main objective being that of determining the effect of light-dark cycles on different presentations of watercress (leaves and bundles) and refrigerated storage conditions (4 and 10 °C). In experiments three and four, the results obtained with watercress were compared to those obtained with the model plant *Arabidopsis thaliana*.

At a refrigerated storage temperature of 10 °C, significant differences were obtained between light-dark treatments and controls (continuous darkness) for most of the variables studied in both leaves and bundles. For example, in all light-dark treatments a decrease in the content of chlorophyll, carotenoids and soluble protein could be delayed over the course of one or more days of storage, as could be the progression toward more yellowish tonalities (changes in a\*, b\*, L\* and h\* co-ordinates) from the original green coloration of samples. However, higher values were obtained for the same treatments in terms of percentage weight loss, although the recommended limit of 7% for watercress was never exceeded in all cases.

On the other hand, only some differences were observed between *A. thaliana* stored at 10 °C and the leaves and bundles of watercress stored at 4 °C. Specifically, a decrease in the content of chlorophyll and carotenoids in both organisms could be delayed after treatment with light-dark cycles. Percentage weight loss was also similar to that observed in previous experiments, with higher values obtained in light-dark treatments. These results suggest that at low refrigerated storage temperatures (i.e. 4 °C) the effect of light-dark cycles ceases to be relevant because of a decrease in the metabolic activity of the plant material.

## Introducción

Uno de los problemas que se dan durante el almacenamiento poscosecha de hortalizas es la pérdida de su calidad, lo que ocasiona el desperdicio y el desaprovechamiento de estos alimentos. En hortalizas de hoja verde el deterioro se acelera principalmente debido al corte hecho durante la cosecha, lo que ocasiona distintos tipos de estrés, y a lo que se suma el hecho de que las condiciones de iluminación no se toman en cuenta durante el almacenamiento, a pesar de que la luz juega un papel muy importante durante toda la vida de la planta, incluso después de ser cosechada (Goodspeed et al., 2013; Hassan & Mahfouz, 2010; Liu et al., 2015).

Se sabe que las condiciones de oscuridad continua en las hojas pueden inducir la senescencia en este órgano (Brouwer, Ziolkowska, Bagard, Keech, & Gardeström, 2012). De forma natural, este proceso se lleva a cabo con el objetivo de reciclar nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, y aprovecharlos en otros órganos o posteriormente en condiciones favorables para la planta. La senescencia es un proceso altamente regulado y genéticamente programado, que requiere la inhibición y expresión de muchos genes. Por ejemplo, se inhiben los genes relacionados con la fotosíntesis mientras que los genes que tienen que ver con la actividad catabólica o de transporte de nutrientes aumentan su expresión (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Buchanan, Gruiseem, & Jones, 2015; Buchanan, 2007; Page, Griffiths, & Buchanan-Wollaston, 2001; Taiz & Zeiger, 2002).

Las condiciones de iluminación durante el almacenamiento poscosecha pueden contribuir a retrasar las pérdidas de calidad nutricional y sensorial. Ya sea tomando en cuenta los ciclos circadianos (mediante la aplicación de ciclos luz oscuridad) o simplemente aplicando luz continua durante el almacenamiento refrigerado, se han reportado efectos benéficos al aplicar este tipo de tratamientos en hortalizas como brócoli, col, col rizada, lechuga, espinaca y albahaca. Todo esto en comparación con tratamientos de oscuridad continua (Ayala, Echáarri, Olarte, & Sanz, 2009; Costa, Millan Montano, Carrión, Rolny, & Guiamet, 2013; Lester, Makus, & Mark Hodges, 2010; Liu et al., 2015; Zhan, Hu, Li, & Pang, 2012).

El berro o cresón (*Nasturtium officinale* R. Br.) es una hortaliza de hoja verde que se sabe tiene un alto contenido de compuestos funcionales o bioactivos (metabolitos secundarios en las

plantas con propiedades farmacológicas o toxicológicas en humanos y animales [Azmir et al., 2013]) tales como glucosinolatos y carotenoides. Pertenece a la familia de las crucíferas al igual que otras hortalizas de importancia comercial como el brócoli y la planta modelo ampliamente estudiada *A. thaliana*. A pesar de esto, el berro es una hortaliza que se cultiva y consume poco en México, además de que la aplicación y el estudio de métodos para alargar su vida poscosecha son aún muy limitados (Comisión Nacional Forestal, 2010; Gonçalves, Cruz, Abreu, Brandão, & Silva, 2009).

El estudio de métodos de conservación poscosecha de especies con un alto contenido de compuestos funcionales podría contribuir a ampliar su comercialización, además de evitar el desperdicio de este tipo de alimentos. Debido a su importancia, la luz podría ser un factor potencial que ayudaría a aumentar la vida poscosecha del berro.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Senescencia en plantas

La senescencia es una forma de muerte celular programada (MCP) que se presenta en tejidos en fase terminal de desarrollo. Este proceso transcurre de forma relativamente lenta y difiere sustancialmente de otras formas de MCP, como la respuesta de hipersensibilidad que se da como resultado a la invasión de un patógeno (Buchanan et al., 2015). En plantas, la MCP puede involucrar la eliminación de órganos enteros, por ejemplo, las hojas que por muchas razones ya no son útiles para la planta pueden entrar en este proceso. Cuando la senescencia se inicia en la célula es un proceso que se desarrolla de manera gradual, lo que en algunas ocasiones y condiciones permite retrasarlo, o incluso revertirlo, antes de que ocurra la muerte celular (Buchanan et al., 2015; Sobieszczuk-Nowicka, Kubala, Zmienko, Małecka, & Legocka, 2016).

La senescencia y la subsecuente muerte son fases terminales en el desarrollo de todos los órganos en la planta, incluyendo hojas, tallos, raíces y flores. La senescencia remodela la forma de la planta debido a la eliminación de tejidos y células no deseadas mientras simultáneamente recicla nutrientes, en especial nitrógeno y fósforo, que posteriormente pueden ser reutilizados por otras partes de la planta (Balazadeh et al., 2014; Buchanan et al., 2015).

Esta etapa del desarrollo está genéticamente programada y altamente regulada. Requiere la inducción e inhibición de la expresión de muchos genes y la interacción entre muchas rutas de señalización, al igual que la inactivación y activación de muchas rutas metabólicas (Buchanan, 2007; Guo, 2013; Page et al., 2001). Dependiendo del órgano y de los estímulos que dan inicio a este proceso, se pueden presentar los siguientes tipos de senescencia (Taiz & Zeiger, 2002):

- Monocárpica.
- De brotes aéreos en herbáceas perennes.
- En hojas por estación (como en árboles y arbustos caducifolios).
- Secuencial en hojas (la muerte de las hojas al alcanzar cierta edad).
- En frutas (maduración de consumo).
- En órganos florales.

- En células especializadas (tricomas, por ejemplo).

La senescencia puede ocurrir en la planta completa, como en la senescencia monocárpica, o en un órgano individual, como en la senescencia foliar. Los estímulos que dan lugar a cada tipo de senescencia pueden ser endógenos, como el estado de desarrollo de la planta, o exógenos, como la variación ambiental de horas luz y temperatura (Ay, Janack, & Humbeck, 2014; Taiz & Zeiger, 2002).

Entre los factores endógenos se encuentran la edad, el desarrollo reproductivo y los niveles de diversos reguladores de crecimiento. Así, para un tejido como la hoja, en ausencia de factores externos, es su propia edad la que tiene una influencia importante en el inicio de la senescencia. En cuanto al estado reproductivo de la planta, éste puede determinar el inicio de la senescencia en partes vegetativas en primer lugar y, posteriormente, el de las propias estructuras reproductivas. Es el caso de muchas especies anuales, en las que el número de hojas que entran en senescencia aumenta durante la floración y el desarrollo de las semillas (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

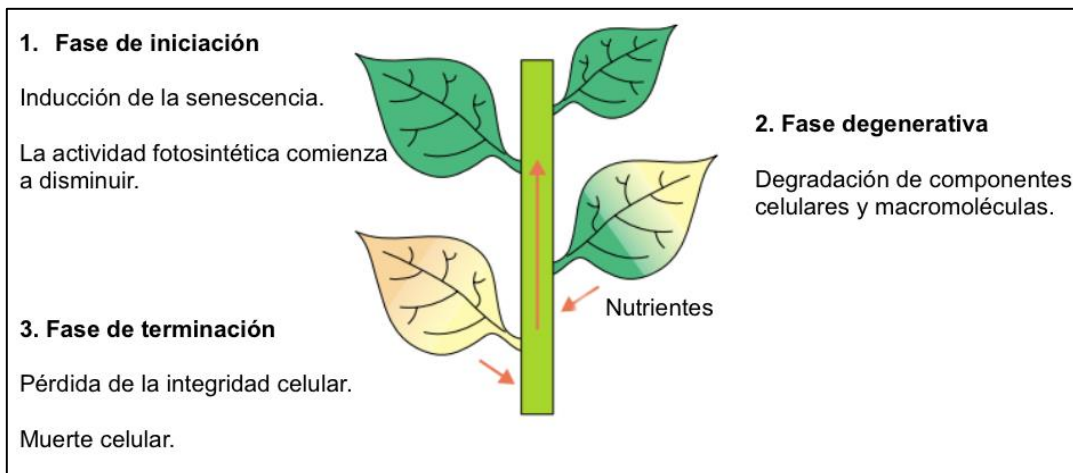
En relación con el tercer elemento de control endógeno, hay hormonas vegetales que están involucradas directamente en varios eventos dentro de la senescencia. De forma general, se puede decir que mientras las auxinas, las citocininas y las giberelinas inhiben la senescencia, el ácido abscísico y el etileno la promueven. Otros compuestos, como el ácido jasmónico, el salicílico y los brasinoesteroides, también suelen actuar como promotores de la senescencia, mientras que las poliamidas actúan en sentido contrario (Guo, 2013).

La senescencia no sólo es una etapa terminal en el desarrollo, también puede ser inducida por factores ambientales como las altas temperaturas, la sequía, el estrés oxidante, la deficiencia de nutrientes, la infección por patógenos, el daño mecánico y la falta de luz. Un caso extremo de estrés se da cuando la planta crece en completa oscuridad. La inducción de la senescencia foliar por este método ha sido aprovechada por los investigadores para estudiar la senescencia de este tejido, sin embargo, este tipo de senescencia presenta diferencias con respecto a la senescencia natural (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Khanna-Chopra, 2012).

## 1.2 Senescencia foliar y catabolismo de los diferentes componentes celulares durante esta etapa

Al igual que la senescencia en otros órganos de la planta, la senescencia foliar no es sólo un proceso degenerativo, sino también un proceso de reciclaje en el que los nutrientes son transportados desde las hojas que envejecen hasta las hojas jóvenes, semillas o tejidos de reserva. Esto hace a la senescencia foliar un proceso esencial durante todo el ciclo de vida de la planta. En este órgano, la senescencia puede inducirse por factores internos tales como el grado de desarrollo de la planta y la edad de la hoja, o factores abióticos como la falta de luz, la sequía y la falta de nutrientes. En general, un descenso de la fotosíntesis en este órgano provoca el inicio de la senescencia (Ay et al., 2014; Balazadeh et al., 2014; Taiz & Zeiger, 2002).

Como en otras formas de MCP, la senescencia foliar es una sucesión de muchos eventos fisiológicos y moleculares, y es posible establecer un patrón general para el mismo (Yoshida, 2003). Es importante resaltar que, a nivel fisiológico, la senescencia es un proceso secuencial, tanto en hojas (senescencia foliar), como en la planta completa (senescencia monocárpica). En hojas de *A. thaliana* se sabe que el amarillamiento asociado a la degradación de clorofila y cloroplastos comienza en el margen distal de la hoja y posteriormente procede de forma gradual hacia el peciolo (Himmelblau & Amasino, 2001). En plantas de tabaco la senescencia monocárpica es un proceso que procede de abajo hacia arriba de la planta, esto es, desde las hojas con mayor estado de desarrollo a las más jóvenes (Fig. 1) (Uzelac et al., 2016).

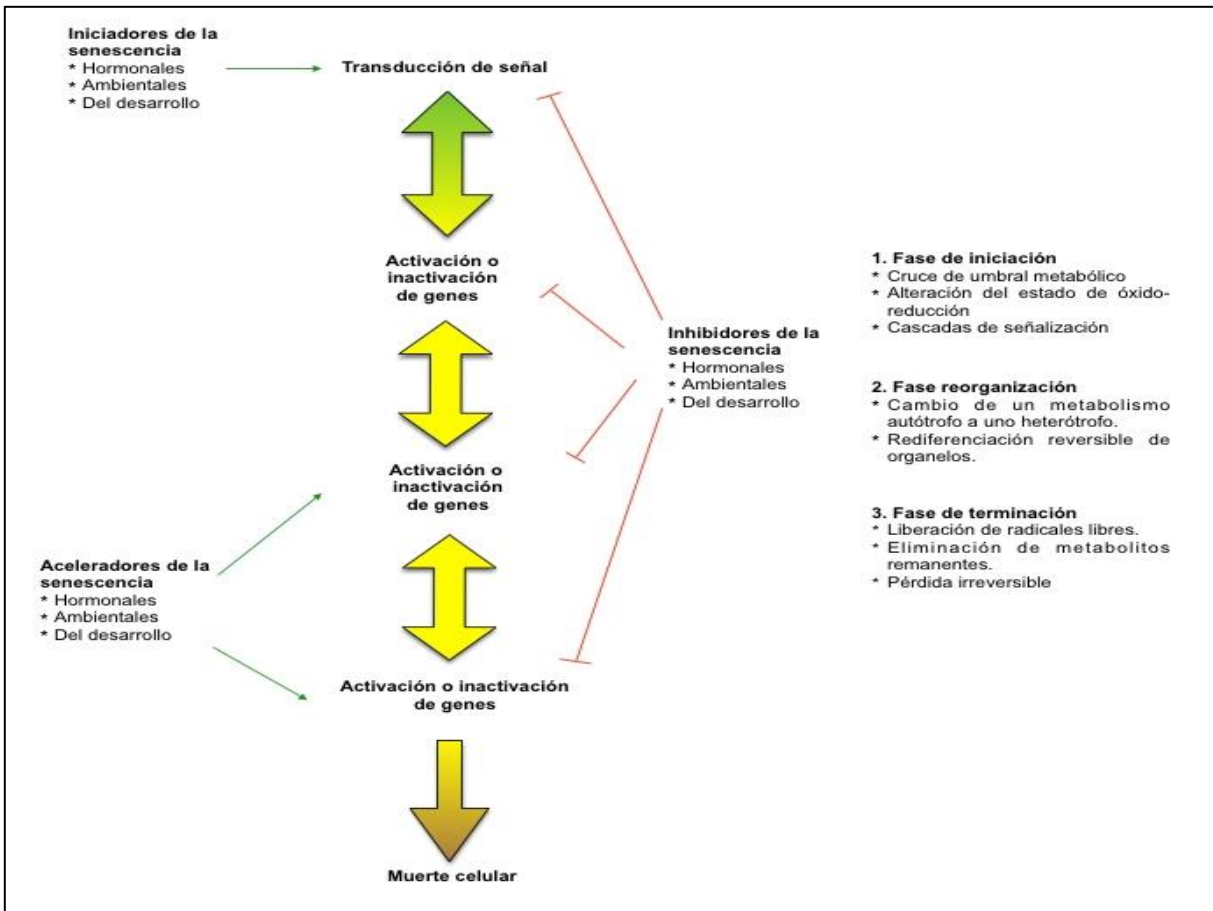


**Figura 1.** Las tres etapas de la senescencia en hojas y sus características fisiológicas (Yoshida, 2003).

El cambio más significativo en la célula foliar durante la fase temprana de la senescencia es la degradación rápida de los cloroplastos, ya que estos organelos contienen más del 70% de las proteínas de la hoja y las enzimas metabólicas involucradas en la fotosíntesis, fotorespiración, la asimilación de nitrógeno y la síntesis de aminoácidos (Avila-Ospina, Moison, Yoshimoto, & Masclaux-Daubresse, 2014; Guiboileau, Sormani, Meyer, & Masclaux-Daubresse, 2010). En contraste con el deterioro de cloroplastos, el núcleo y las mitocondrias mantienen su estructura y funcionalidad hasta las etapas finales de la senescencia, lo que le permite a las células de la hoja expresar los genes y sintetizar las enzimas que participan en procesos de degradación (Buchanan, 2007; Taiz & Zeiger, 2002).

En la figura 2 se presenta un esquema más detallado de las etapas de la senescencia foliar, éste incluye cascadas de transducción de señales que están ligadas a varios detonantes tales como hormonas o estímulos ambientales, que llevan a una fase de iniciación que involucra la activación e inactivación de genes específicos, a esto le sigue una fase de re-diferenciación de estructuras celulares y movilización de sus componentes. Finalmente, una fase de terminación en la cual se pueden reconocer muchos de los síntomas generales de la muerte celular programada (Buchanan et al., 2015).





**Figura 2.** Esquema propuesto que muestra las etapas de la senescencia en hojas, desde la señal de iniciación hasta la muerte celular (Buchanan et al., 2015).

## 1.2.1 Degradación de biomoléculas durante la senescencia foliar

### 1.2.1.1 Catabolismo de la clorofila

Visualmente, el paso de tonalidades verdes a amarillas en las hojas es el primer síntoma de la senescencia (Fig. 3). A pesar de esto, en estudios con hojas cortadas de *Arabidopsis thaliana* se demostró que el 50% de la clorofila se pierde antes de que se presenten señales obvias de amarillamiento. El catabolismo de la clorofila en la hoja comienza con la liberación de este pigmento de las proteínas a las que está asociada en la membrana tilacoide, una reacción en la que la proteína SGR juega un papel muy importante. Posteriormente el Mg de la clorofila se remueve, lo que produce feofitina *a*. La feofitina *a* se hidroliza por la acción de la enzima feofitinasasa produciendo feoforbido *a* y fitol. La clorofila *b* se convierte en clorofila *a* por acción

de la enzima clorofila *b* reductasa para posteriormente ser degradada en la vía ya descrita. Tanto la feofitina como el feoforbido poseen intacta la estructura del anillo de tetrapirrol y tienen un color verde oliva (Buchanan et al., 2015; Buchanan, 2007).

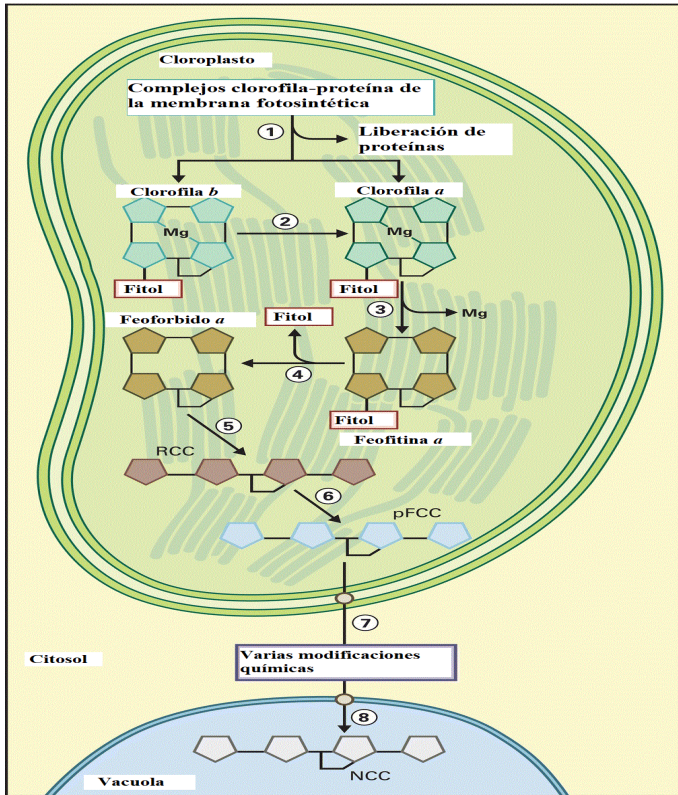
El anillo del feoforbido se abre por acción de la enzima feoforbido *a* oxigenasa para generar una cadena incolora de tetrapirrol en una reacción dependiente de oxígeno. El compuesto resultante (RCC) es rápidamente metabolizado por la RCC reductasa para producir pFCC, compuesto con una fluorescencia azul alta. Después de que el pFCC es transportado hacia el citosol, éste sufre diversas modificaciones químicas para producir una amplia variedad de catabolitos no fluorescentes (NCCs), la naturaleza de los compuestos generados en esta etapa varía de especie a especie. Finalmente, estos compuestos son transportados dentro de la vacuola por un transportador ABC. En la figura 4 se esquematiza esta ruta metabólica en el cloroplasto (Buchanan et al., 2015).



**Figura 3.** Cambio gradual en el color de hojas de *A. thaliana* (ecotipo silvestre) tratadas con oscuridad continua con el objetivo de inducir la senescencia. d: días del tratamiento de oscuridad (Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016).

Otra enzima que participa en la degradación de clorofilas es la clorofilasa (clorofila-clorofilida hidrolasa, EC 3.1.1.14). Es una enzima hidrofóbica que cataliza la hidrólisis de la clorofila a clorofilida y fitol. La localización de esta enzima en la célula vegetal se ha reportado tanto en la membrana externa del cloroplasto como en la membrana del tilacoide, así como en los plastoglobulos. La clorofilasa está presente a lo largo del desarrollo de hojas y en varias especies se ha demostrado que los segmentos amarillos de hojas tienen una actividad mayor de clorofilasa, en comparación con los segmentos verdes (Chen et al., 2012).

Además, se sabe que la clorofilasa es una enzima estable a altas concentraciones de solventes orgánicos (hasta 80% acetona) y cataliza la hidrólisis de la clorofila durante la extracción con solventes de este pigmento (Hu, Tanaka, & Tanaka, 2013)



**Figura 4.** La ruta de degradación de clorofilas y su organización subcelular durante la senescencia. Las enzimas o reacciones se identifican como sigue: 1, proteína SGR; 2, Clorofila b reductasa; 3, agente quelante; 4, feofitinas; 5, feoforbido a oxigenasa; 6, RCC reductasa; 7, transportador de catabolitos dependiente de ATP; 8, transportador ABC (Buchanan et al., 2015).

### 1.2.2.2 Metabolismos de carotenoides y otros pigmentos

El catabolismo de clorofilas hace visibles los pigmentos carotenoides, que son los responsables del color amarillo de las hojas senescentes. Dependiendo de la especie, estos pigmentos son degradados o pueden seguir incrementándose durante la senescencia foliar. Durante la senescencia también puede observarse la acumulación de otros pigmentos como las antocioninas, betacianinas y flavonoides, que son responsables de los colores rojo, púrpura y

amarillo de las hojas otoñales (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Jones, Ougham, Thomas, & Waaland, 2013).

### 1.2.2.3 Catabolismo de proteínas

Aunque la pérdida de clorofila es importante existen otros procesos metabólicos que son cuantitativamente significativos durante la senescencia foliar. El más importante de ellos es la degradación de proteínas, ya que permite el transporte y la generación de energía a partir de los aminoácidos liberados. En el tejido foliar senescente se han identificado numerosas proteasas que participan en la degradación de proteínas que se lleva a cabo durante esta etapa (Avila-Ospina et al., 2014; Azcón-Bieto & Talón, 2003).

### 1.2.2.4 Catabolismo de ácidos nucleicos y membranas celulares

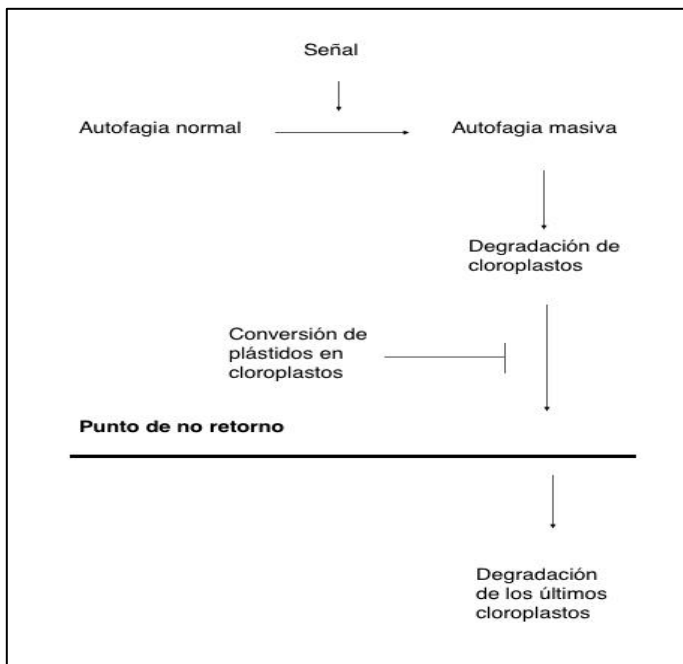
Los ácidos nucleicos son una fuente importante de nitrógeno, carbono y fósforo. El ARN ribosomal es importante debido a su abundancia en la célula. Mientras que el nivel de ADN en una célula senescente permanece relativamente constante en las primeras etapas de este proceso, la cantidad de ARN ribosomal desciende de forma continua, lo que va acompañado por un aumento en la actividad ribonucleasa (ARNasa). Las bases púricas y pirimidínicas posteriormente se degradan en los peroxisomas, en los que se observa un aumento de la actividad de enzimas degradativas tales como la uricasa y la xantina oxidasa (Buchanan et al., 2015).

Las membranas celulares son otra importante reserva de compuestos que pueden ser utilizados para la generación de energía, en este caso lípidos. La degradación de lípidos de membrana es un proceso muy selectivo ya que la actividad respiratoria de la célula senescente es elevada y ésta debe mantenerse hasta el final. Durante la senescencia es posible observar un aumento en la actividad de vías metabólicas como la beta oxidación y la vía del glioxilato. Esta última vía permite la síntesis de azúcares a partir de lípidos, lo que a nivel celular provoca una transición de peroxisomas, que participan en el proceso conocido como fotorespiración, a glioxisomas, orgánulos donde se lleva a cabo la conversión de lípidos a azúcares (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

### 1.3 Reversión de la senescencia

Como un proceso de muerte celular programada, la senescencia consiste de dos fases. En la primera, estructuras como la membrana celular y organelos como la mitocondria permanecen intactos, por lo que las células permanecen viables. En el caso de hojas y otros órganos esta etapa es reversible, ya que las células del mesófilo permanecen viables hasta que la mayor parte de los componentes celulares y macromoléculas son degradados y exportados a otras partes de la planta. La segunda fase de la senescencia se distingue por ser un proceso terminal, rápido y siempre irreversible (Jones et al., 2013).

El punto de no retorno durante la muerte celular programada se define como la etapa en donde la célula está destinada a morir de forma irreversible. Algunas células en la planta pueden ser salvadas antes de este punto mediante la inducción de la formación de cloroplastos funcionales, por lo que un tejido visiblemente senescente puede reverdecer. Aunque la reversibilidad de este proceso depende de las citocininas, en términos bioquímicos el mecanismo de acción de éstas permanece poco claro. Se sugiere que la señal de estas hormonas es transferida hasta el núcleo, mediante las cascadas de transducción de señales, lo que activa la expresión de genes específicos. En adición a esta actividad, las citocininas también activan la síntesis de proteínas del cloroplasto que son codificadas por el genoma de este organelo. Es importante señalar que el punto de no retorno en los cloroplastos está muy asociado con la degradación de ribosomas en el mismo, lo que imposibilita la traducción de ARNm a proteínas en el organelo, y lo que a su vez implica que algunos componentes de la maquinaria fotosintética no pueden ser re-sintetizados. El posible papel de la conversión de plástidos en cloroplastos en el punto de no retorno es mostrado en la figura 5 (Van Doorn, 2005; Xie, Michaeli, Peled-Zehavi, & Galili, 2015).



**Figura 5.** Esquema del punto de no retorno durante la autofagia que se presenta en la muerte celular programada (Van Doorn, 2005).

La reversión de la senescencia en hojas puede observarse como un reverdecimiento de las mismas. En algunas especies la senescencia foliar inducida por condiciones de oscuridad es totalmente reversible después de restablecer las condiciones de iluminación, pero la habilidad para reverdecer depende de la duración del periodo de oscuridad, si la duración de este periodo es larga, la senescencia se vuelve irreversible. En *A. thaliana* se ha reportado que la iluminación de hojas después de dos días bajo condiciones de oscuridad es suficiente para revertir la degradación de clorofilas (Parlitz, Kunze, Mueller-Roeber, & Balazadeh, 2011).

Otro de los factores importantes en la reversibilidad de la senescencia es la disponibilidad de nitrógeno. Se sabe que hay una relación entre la disponibilidad de este elemento y la senescencia de la hoja. Algunos estudios en *A. thaliana* han reportado que la senescencia en sus etapas iniciales, provocada por una baja disponibilidad de nitrógeno, puede ser retrasada, e incluso revertida, cuando este elemento es suministrado de forma externa. De hecho, se sabe que la disponibilidad de nitrógeno es uno de los mayores reguladores de la senescencia foliar (Balazadeh et al., 2014).

## 1.4 *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo

Aunque organismos como el chícharo, el maíz y otras plantas han sido ampliamente estudiados, para unificar y agilizar los estudios genómicos y moleculares de plantas la comunidad científica eligió a *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo por sus características genéticas, así como por su tamaño y ciclo de vida. Esta planta pertenece a la familia de las crucíferas, a la que también pertenecen hortalizas como la coliflor, la col, los rábanos, nabos, coles de Bruselas, el berro y la arúgula. Crece de manera natural en regiones de Asia, Europa y el norte de África, y se ha introducido en otras áreas como Norteamérica y Australia (Koornneef, Alonso-Blanco, & Vreugdenhil, 2004).

*A. thaliana* fue la primera planta cuyo genoma se secuenció completamente y las facilidades y herramientas moleculares disponibles para obtener datos sobre ésta son de las más abundantes en comparación con cualquier otro organismo (con la excepción del *Homo sapiens*). Todo esto ha facilitado la conformación de un gran cuerpo de conocimientos que incluyen aspectos importantes en varias disciplinas dentro de la biología de las plantas, entre ellos, un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de la floración, el desarrollo de la raíz, la percepción de la luz, el metabolismo, la senescencia y la resistencia a enfermedades (Leonelli, 2007).

Como se mencionó, el hecho de que *A. thaliana* se utilice como organismo modelo se debe a varios motivos (Leonelli, 2007):

- Es una de las plantas más extendidas en el mundo.
- Tiene una altura promedio de 10 cm (sin contar las raíces), lo que permite su cultivo y manipulación fácil en espacios reducidos o en el laboratorio.
- Tiene un ciclo de vida corto (entre 6 y 8 semanas).
- Su genoma es pequeño, lo que hace manejable un análisis molecular detallado.
- Presenta un índice alto de mutaciones.
- El descubrimiento de que *Agrobacterium* induce mutaciones en esta planta fue muy importante, ya que facilitó la obtención de plantas transformadas.

- La investigación en *A. thaliana* es prometedora en muchos campos, incluyendo la fisiología, la bioquímica y la biología.
- Gracias a las fundaciones y al esfuerzo de muchos investigadores, la información sobre diversos aspectos de *A. thaliana* está disponible y es de fácil acceso para todo público.

Además de las ventajas generales de *A. thaliana* como planta modelo, las hojas de esta especie también son útiles en la investigación sobre senescencia foliar. Este proceso ocurre de una forma reproducible y predecible para determinadas condiciones ambientales, además de que el ciclo de vida de la hoja es relativamente corto (Lim, 2003; Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016).

Al formar parte de la familia de las crucíferas, *A. thaliana* contiene glucosinolatos, principalmente de 4-metiltiobutil glucosinato y 4-benciloxibutil glucosinato, por lo que también se utiliza en estudios de relación planta-insecto, ya que este tipo de compuestos tiene como función proteger a diversos órganos de la planta (flores, hojas, etc.) contra el ataque de herbívoros (Hopkins, Van Dam, & Van Loon, 2009).

### 1.5 Expresión de genes en *A. thaliana* durante la senescencia

Los niveles de muchos transcritos en la hoja disminuyen significativamente durante la fase de senescencia, pero la abundancia de otros aumenta. Estudios con microarreglos usando *A. thaliana*, tanto en hojas verdes como senescentes, han mostrado que durante la senescencia al menos 800 genes incrementan su expresión y aproximadamente el mismo número deja de expresarse (Buchanan, 2007).

Los genes cuya expresión disminuye durante la senescencia denominados *SDGs* (*Senescence Down-regulated Genes*, por sus siglas en inglés) incluyen genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis, el desarrollo de cloroplastos y la biosíntesis de clorofila. En contraste, a los genes que aumentan su expresión durante la senescencia se les llama genes asociados con la senescencia *SAGs* (*Senescence Associated Genes*, por sus siglas en inglés) e incluyen genes que codifican para enzimas hidrolíticas, tales como proteasas, ribonucleasas y lipasas, así como enzimas involucradas en la biosíntesis del etileno, como la ACC (ácido 1-



aminociclopropano-1- carboxílico) sintasa y la ACC oxidasa (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Taiz & Zeiger, 2002).

Otros SAGs tienen funciones secundarias en la senescencia, como los que codifican para enzimas involucradas en la conversión o re-movilización de productos del catabolismo, tales como la glutamina sintasa, que cataliza la transferencia reductiva del grupo amino de la glutamina al C-2 del 2-oxoglutarato, produciendo dos moléculas de glutamato, reacción fundamental en la reutilización del nitrógeno durante la senescencia (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Taiz & Zeiger, 2002).

La amplia variedad de funciones de los genes expresados durante la senescencia da una idea clara de las actividades metabólicas que cambian cuando la hoja entra en esta etapa de forma natural (Guo, 2013). El cuadro 1 muestra un resumen del tipo de genes cuya expresión aumenta durante la senescencia.

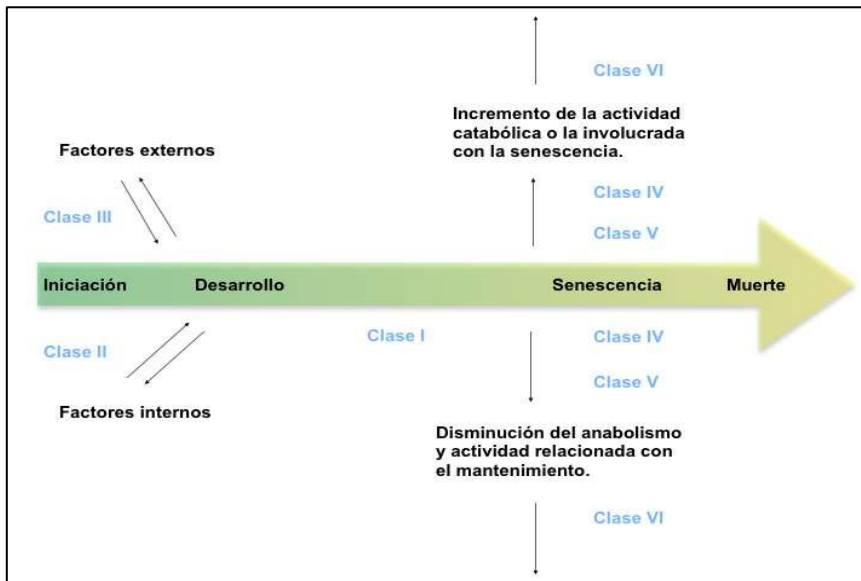
**Cuadro 1.** Clase y número de genes cuya expresión aumenta durante la senescencia natural de la hoja (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

<b>Función</b>	<b>Tipo</b>	<b>Número de genes</b>
Regulación	Factores de transcripción Quinasas/Fosfatasas Acción hormonal Control por ubiquitina	209
Degradación y movilización de macromoléculas	Clorofila Proteínas Ácidos nucleicos Lípidos	101
Transporte	Azúcares, péptidos, aminoácidos y iones	74
Metabolismo de azúcares	Síntesis y degradación	63
Respuesta al estrés	Defensa Antioxidantes	39
Metabolismo secundario	Alcaloides y flavonoides	38
Función desconocida		242

### 1.5.1 Genes asociados con la senescencia en *A. thaliana*

En *A. thaliana* los genes asociados con la senescencia (*SAGs*) pueden ser clasificados en seis categorías conceptuales (Fig. 6). En la clase I se incluyen los genes que controlan el proceso de envejecimiento de la célula. La clase II contiene los genes que controlan otros procesos endógenos en la planta, en adición a la senescencia foliar. La clase III abarca a los genes que pueden regular la senescencia en respuesta a factores ambientales. Los genes de la clase IV tienen funciones de regulación, ya sea aumentando la actividad de procesos catabólicos o reduciendo la actividad de procesos de mantenimiento celular (Lim, 2003).

En la clase V están los genes involucrados en los procesos de degradación de componentes o factores que regulan o retrasan el avance de la senescencia. La clase VI incluye genes que están involucrados en la ejecución de procesos relacionados con la senescencia, como el desmantelamiento celular o el reciclaje de nutrientes. Los genes de las clases I-V están vinculados con el inicio y progresión de la senescencia, mientras que los de la clase VI están implicados sólo con la progresión (Lim, 2003).



**Figura 6.** Etapas durante el proceso de senescencia donde intervienen diferentes categorías de genes. Se trata de una clasificación conceptual, por lo que un solo gen podría estar dentro de más de dos categorías (Lim, 2003).

Muchos *SAGs* son inducidos por factores adversos, tanto internos como externos, incluyendo la presencia de metales pesados, ácido salicílico, condiciones de oscuridad, hormonas que inducen la senescencia (etileno, ácido abscísico y metil jasmonato), heridas, choque térmico y la falta de nutrientes. Muchos estudios indican que los genes expresados durante la senescencia son diferentes dependiendo del factor que induzca este proceso, esto es, aunque los síntomas de la senescencia puedan parecer los mismos, los estados moleculares detallados son diferentes dependiendo de los factores que la induzcan (Nam, 1997).

Ya que se trata de un proceso multigénico complejo, la mayoría de los *SAGs* no exhiben efectos significativos cuando son inactivados o sobre-expresados de manera individual tanto en la iniciación como en la progresión de la senescencia de la hoja (Nam, 1997).

### 1.6 El efecto de la intensidad de la luz en la senescencia foliar

La luz es uno de los factores ambientales más importante para las plantas, ya que es una fuente de energía esencial para su supervivencia. Las plantas han desarrollado la habilidad para responder a diversos estímulos luminosos, los que incluyen el flujo luminoso (cuya medida es el lumen), su calidad (longitud de onda), su dirección (ángulo en que incide sobre la planta o partes de ésta) y su duración. Las señales luminosas son percibidas por al menos cuatro familias de fotorreceptores (fitocromos, criptocromos, fototropinas y fotorreceptores de luz ultravioleta) y son transmitidas a través de cascadas de transducción de señal. En estas cascadas intervienen componentes reguladores tales como factores de transcripción, enzimas cinasas, fosfatasa y proteínas de degradación (Jiao, Lau, & Deng, 2007).

La falta de luz puede inducir la senescencia en hojas dependiendo de si la planta está en condiciones de oscuridad o en sombra. Si la planta completa está bajo la sombra, se detona una respuesta que ayuda a las hojas a evitar esta condición, lo que se puede manifestar como un aumento en la longitud del pecíolo, una disminución de la superficie de la hoja o un retraso en el paso del color verde al amarillo de la misma (Brouwer, Gardeström, & Keech, 2014).

También se sabe que las condiciones de baja iluminación pueden acelerar o retrasar la senescencia dependiendo del estado fotosintético de la planta. Cuando la planta completa está

bajo condiciones de oscuridad o en la sombra, la senescencia se retrasa en hojas de mayor edad, mientras que este proceso se acelera en secciones de la planta completa parcialmente bajo la sombra, como en cultivos densos, y en hojas individuales en condiciones de oscuridad. Las hojas individuales o segmentos de las mismas bajo condiciones de completa oscuridad se han utilizado en muchos estudios como una forma de inducir rápidamente la senescencia (Brouwer et al., 2012).

En un estudio con plantas completas de *A. thaliana*, en las cuales varias de las hojas se cubrieron parcialmente para someterlas a diferentes condiciones de baja iluminación, se reportó que conforme se redujo la intensidad lumínica (en un rango entre 0 y 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se observó una degradación mayor en los niveles de proteína y clorofila total, además de un aumento en la expresión de genes relacionados con la senescencia como *SAG2* y *SAG12*. La degradación de proteína y clorofila fue mayor en condiciones de completa oscuridad (0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Brouwer et al., 2012).

### 1.6.1 Variación en la expresión de genes de *A. thaliana* por efecto de las condiciones de iluminación

En diversos estudios se ha demostrado el papel que tiene la luz en la expresión de varios genes relacionados con diferentes procesos, tales como la reparación de ADN o la síntesis de proteínas que intervienen en la fotosíntesis.

Uno de los eventos moleculares mejor caracterizados en la transducción de señales luminosas es el incremento en la transcripción de los genes *CAB* (At1g29930, At1g29920, At1g29910), que codifican para proteínas de unión de clorofila a/b en el fotosistema II; el gen *RBCS1A* (At167090) que codifica para la subunidad pequeña de Rubisco y el gen *CHS* (At5g13930), que codifica para la chalcona sintasa. En un estudio reciente se reportó que los genes *CAB* y el *RBCS1A* mostraron una mayor expresión en plantas cultivadas bajo radiación en el rojo lejano, en comparación con plantas cultivadas en condiciones de oscuridad (Feng, Qiu, Van Buskirk, Yang, & Chen, 2014; Li, Washburn, & Chory, 1993).

Otros genes relacionados con la fotosíntesis o la síntesis de clorofila, tales como *GUN5* (At5g13630), que codifica para una quelatasa de magnesio relacionada con la síntesis de clorofila, y *PC* (At1g76100) que codifica para la plastocianina, proteína que participa en la cadena de transporte de electrones del cloroplasto, mostraron una mayor expresión en plantas mantenidas con radiación en el rojo lejano, en comparación con las plantas mantenidas en oscuridad (Feng et al., 2014).

En relación con el proceso de senescencia en las hojas, se ha registrado que la oscuridad continua induce la expresión de varios genes. El gen *PPH* (AT5G13800), que codifica para la enzima feofitina feoforbido hidrolasa y que está involucrada en la degradación de clorofilas en el cloroplasto, aumenta su expresión en hojas bajo oscuridad completa. Otros genes, como los genes *din* (de *dark-inducible*) se expresan después de un tiempo bajo condiciones de oscuridad. El gen *din3* (AT3G06850), que codifica para una acil transferasa, se expresa sólo después de unas horas bajo estas condiciones, mientras que *din2* (AT3G60140), que codifica para la beta glucosidasa 30, y *din9* (AT1G67070), que codifica para la fosfomanosa isomerasa 2, se expresan sólo después de un periodo de oscuridad de entre 24 y 72 h. (Fujiki et al., 2005; Schelbert et al., 2009; *The Arabidopsis Information Resource*, 2016).

## 1.7 Radiación fotosintéticamente activa

La radiación fotosintéticamente activa (*PAR*, *Photosynthetic Active Radiation*, por sus siglas en inglés) corresponde al flujo de fotones con longitudes de onda efectivas (dentro del intervalo de 400 a 700 nm del espectro de radiación solar) que incide sobre la hoja para llevar a cabo la fotosíntesis. Los valores máximos de *PAR* que se pueden medir en un día soleado (en latitudes medias) oscilan entre 2000 y 2300  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Con una determinada densidad de flujo fotónico, la fotosíntesis se satura, lo que corresponde al punto de saturación luminoso. Dicho punto es menor en las plantas de sombra (entre 60 y 200  $\mu\text{mol}$   $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) que en plantas de sol. En las plantas C3, la saturación luminosa se sitúa entre 400 y 600  $\mu\text{mol}$   $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , que corresponden aproximadamente al 25% de la radiación solar máxima, mientras que en algunas plantas C4 no se observa un punto de saturación (Azcón-Bieto & Talón, 2003).

Cabe resaltar que, aunque es posible medir y expresar la emitancia luminosa (cantidad de flujo luminoso que incide sobre una superficie por unidad de área) en lux ( $\text{lm m}^{-2}$ ), en el estudio de las plantas es preferible utilizar unidades *PAR*, ya que estas unidades toman en cuenta las longitudes de onda efectivas emitidas por una fuente luminosa para llevar a cabo la fotosíntesis. Debido a que la composición de la luz varía dependiendo de la fuente, no existe un factor de conversión global entre lux y unidades *PAR*. En promedio, para la luz blanca proveniente de lámparas fluorescentes, es posible utilizar  $0.014 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/\text{lux}$  como factor de conversión entre lux y  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Barrientos-Priego, Nieto-Ángel, & Nieto-Ángel, 2001; *Photosynthetically Active Radiation (PAR) Units*, 2000).

### 1.8 Senescencia poscosecha de hortalizas y el efecto de la luz durante su almacenamiento a bajas temperaturas

El diseño modular de las plantas permite a los órganos de las mismas funcionar de manera autónoma y continuar con procesos metabólicos como la respiración, incluso después de que éstos son separados de la planta parental. Es por esto que después de la cosecha las hortalizas de hoja verde son capaces de responder a diferentes intensidades lumínicas y llevar a cabo procesos biológicos dependientes de este factor, tales como la fotosíntesis. En este tipo de hortalizas la senescencia es inducida como consecuencia principal de la herida ocasionada en la cosecha, la que a su vez produce la falta de suministro de agua y nutrientes. También contribuyen a la senescencia otros tipos de estrés a los que las hojas quedan expuestas, incluyendo las condiciones de oscuridad o el relacionado con la producción de hormonas como el etileno en respuesta a la herida (Goodspeed et al., 2013; Hassan & Mahfouz, 2010; Liu et al., 2015).

Es importante mencionar que muchos de los cambios observados durante el almacenamiento de hortalizas verdes, tales como la pérdida de clorofila, el deterioro de la estructura celular y, finalmente, la muerte celular, muestran similitudes con los cambios observados durante la senescencia natural en hojas (Page et al., 2001).

Tomando en cuenta el papel tan relevante que tiene la luz en toda la vida de la planta, no sólo como fuente de energía, sino también como factor de regulación en varios procesos, hay varias

publicaciones que han demostrado el efecto que tiene este factor sobre variables relacionadas con la calidad de diversas hortalizas.

En hojas de albahaca (*Ocimum basilicum*) almacenadas a 20 °C, la exposición diaria durante dos horas a pulsos de luz blanca de baja intensidad (irradiancia de 30-37  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), suministrados por lámparas fluorescentes, fue efectiva para retrasar la pérdida de clorofilas y de proteína total, en comparación con hojas almacenadas bajo condiciones de oscuridad (Costa et al., 2013).

En hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) expuestas a luz blanca de forma continua (irradiancia de 29  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante el almacenamiento a 4 °C, se reportó un retraso en la pérdida de las vitaminas C, B<sub>9</sub> y K<sub>1</sub> en comparación con hojas expuestas a oscuridad continua, mostrando que la luz continua puede ser un tratamiento efectivo para retrasar la pérdida de nutrientes. La exposición a luz proveniente de lámparas fluorescentes (iluminancia entre 10000 y 20000 lx) durante el almacenamiento previno la senescencia en col (*Brassica oleracea*) (Perrin, 1982). Las combinaciones de 24  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de exposición a la luz continua proveniente de lámparas fluorescentes con almacenamiento a baja temperatura retrasó el deterioro de la calidad sensorial y prolongó la vida poscosecha de brócoli (*Brassica oleracea* L.) recién cortado (Zhan et al., 2012).

También han sido reportados efectos negativos sobre la calidad poscosecha por efecto de la aplicación de luz. En poro almacenado a 4 °C y expuesto a la luz continua de lámparas fluorescentes (2600 lx) fue reportado un aumento en el encafecimiento (Ayala et al., 2009). En brócoli almacenado a 4 °C y expuesto a la luz continua de lámparas fluorescentes (de 36 W) se reportó un incremento en la pérdida de clorofilas, mientras que en coliflor almacenada bajo las mismas condiciones se observó un incremento de la transpiración y la fermentación (Olarte, Sanz, Federico Echávarri, & Ayala, 2009).

### 1.8.1 Ciclos circadianos en estudios poscosecha

La mayor parte de los estudios relacionados con el efecto de la luz en el almacenamiento poscosecha aplican condiciones de luz continua o pulsos de luz con diferente irradiancia a

tiempos determinados. Otra forma de abordar el efecto de la luz en frutas y hortalizas es tomando en cuenta a los ritmos o ciclos circadianos de las plantas.

El reloj circadiano es un mecanismo capaz de registrar el paso del tiempo durante el día en organismos superiores y ajustar los procesos fisiológicos a lo largo del mismo y de las estaciones. Se ha demostrado la interacción o dependencia de diversos procesos fisiológicos en plantas con este mecanismo, tales como la aclimatación, la señalización hormonal, la fotomorfogénesis y la respuesta a patógenos (Sharma & Bhatt, 2015).

Este mecanismo permite a las plantas anticiparse y prepararse a los cambios de su medio ambiente, que en parte ocurren como consecuencia de la rotación de la tierra. La coordinación de los ritmos circadianos con el ambiente externo le da a las plantas ciertas ventajas, como puede ser la resistencia a insectos y patógenos. El reloj circadiano también regula aspectos biológicos de la planta que podrían tener un impacto en la salud humana como implicación de su consumo, tales aspectos incluyen modificaciones en los niveles de carbohidratos, ácido ascórbico, clorofila y compuestos bioactivos como los glucosinolatos (Liu et al., 2015).

En col rizada (*Brassica oleracea* cv. Acephala), col, lechuga (*Lactuca sativa*) y espinaca, se determinó el efecto de mantener ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad en parámetros como la integridad de los tejidos y el valor nutricional, en comparación con el efecto de mantener estas hortalizas bajo luz u oscuridad constante. Se observó que bajo ciclos de luz/oscuridad todas las hortalizas mostraron una mayor longevidad y una mayor concentración de clorofila y glucosinolatos (Liu et al., 2015).

En col y en la planta modelo *A. thaliana* se demostró que la sincronización del reloj circadiano con ciclos 12 h/12 h luz oscuridad aumentó la resistencia al ataque de herbívoros y produjo una acumulación cíclica de metabolitos de defensa. En este mismo estudio se demostró que la sincronización del reloj circadiano también resultó benéfica en otros cultivos como la calabacita (*Cucurbita pepo*), mora azul (*Vaccinium corymbosum*), zanahoria (*Daucus carota*), papa dulce (*Ipomoea batatas*), col y espinaca (Goodspeed et al., 2013).



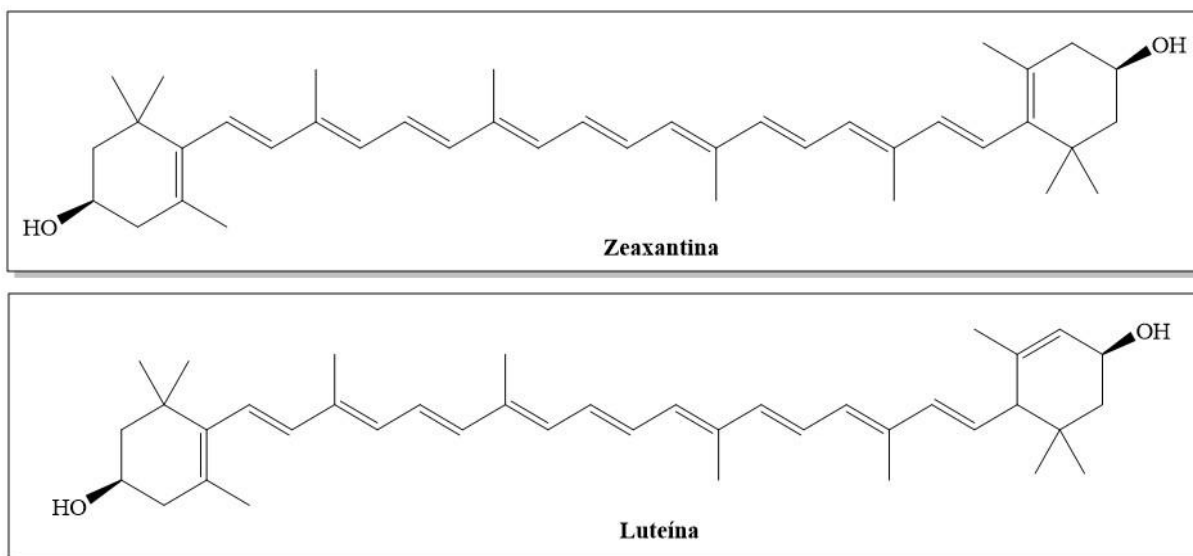
## 1.9 Composición del berro, métodos y condiciones recomendados para su almacenamiento

El berro o cresón (*Nasturtium officinale* R. Br.) es una hortaliza de hoja que pertenece a la familia de las crucíferas. Es una planta herbácea, de 10 a 80 centímetros de altura, tiene un tallo cilíndrico, carnoso, que crece con la parte inferior sumergida en agua, sus hojas son de color verde oscuro y florece entre marzo y noviembre. Se encuentra en manantiales, arroyos y estanques de agua dulce o terrenos encharcados próximos a ellos. Es una planta traída de Europa y actualmente se cultiva poco en México, crece de forma silvestre en muchas regiones del país, entre los 2250 y 3000 metros de altitud. Normalmente se consume crudo y se utiliza toda la planta, excepto la raíz. Se le atribuyen varias propiedades medicinales y se emplea para tratar anemia, bronquitis, inapetencia, gota y como “remineralizante” (Comisión Nacional Forestal, 2010).

El berro es una buena fuente de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos tales como el ácido fólico y los carotenoides como la luteína y la zeaxantina (Fig. 7), entre otros (cuadro 2). Es una hortaliza muy apreciada en la cocina mediterránea, se suele consumir crudo en ensaladas, sopas y otros platillos. Un factor que limita su consumo es su naturaleza perecedera, ya que después de la cosecha tiene una vida útil de aproximadamente siete días. Este periodo puede ser extendido a dos o tres semanas almacenando el berro a una temperatura de 0 °C y una humedad relativa de 95%. También es importante resaltar que es una hortaliza muy susceptible al etileno (Pinela et al., 2016; Silveira, Araneda, Hinojosa, & Escalona, 2014).

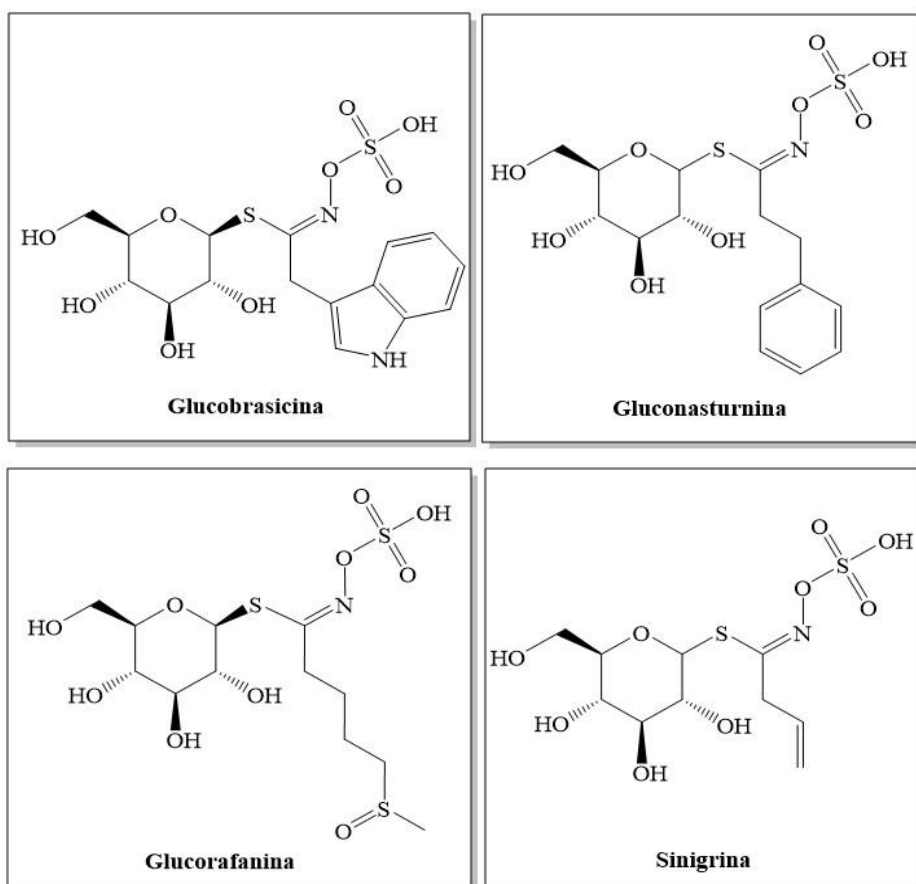
**Cuadro 2.** Composición nutricional del berro (Muñoz et al., 2010).

<b>Componente</b>	<b>Unidad</b>	<b>En 100 g</b>	<b>Vitaminas</b>	<b>Unidad</b>	<b>En 100 g</b>	<b>Minerales</b>	<b>Unidad</b>	<b>En 100 g</b>
Energía	Kcal	11	Vitamina A	µg	160	Calcio	mg	59
Humedad	%	94.5	Ácido ascórbico	mg	43	Fósforo	mg	40
Fibra dietética	g	0.9	Tiamina	mg	0.1	Hierro	mg	0.2
Hidratos de carbono	g	1.3	Riboflavina	mg	0.2	Magnesio	mg	44
Proteínas	g	2.3	Niacina	mg	1.5	Sodio	mg	13
Lípidos totales	g	0.1	Ácido fólico	µg	200	Potasio	mg	209



**Figura 7.** Estructura química (generada mediante *ChemDraw 16.0.1.4*) de la zeaxantina y la luteína, carotenoides encontrados en el berro (Lichtenthaler, 1987).

El berro también es una fuente rica de glucosinolatos, principalmente del 2-fenil glucosinato (gluconasturnina). Los glucosinolatos son una familia de compuestos que se encuentran predominantemente en la familia *Cruciferae* (crucíferas) a la que pertenece el berro, el brócoli, la col, la coliflor, la arúgula, la col rizada y *A. thaliana*, entre otras. La estructura química de estos compuestos se caracteriza por tener una  $\beta$ -tioglucosa, una oxima sulfonada y una cadena lateral variable (Fig. 8). En las hortalizas, los glucosinolatos contribuyen al sabor, además de tener propiedades funcionales como anticarcinogénicos.



**Figura 8.** Estructuras (generadas mediante *ChemDraw 16.0.1.4*) de algunos glucosinolatos encontrados en hortalizas y plantas de la familia *Cruciferae* (crucíferas) (Ishida,Hara, Fukino, Kakizaki, & Morimitsu, 2014).

Debido a sus propiedades funcionales esta hortaliza ha sido el foco de varios estudios. Sin embargo, a pesar de su importancia como cultivo, la aplicación y el estudio de métodos para prolongar su vida poscosecha son aún muy limitados. Aunque el congelamiento y el posterior almacenamiento a temperaturas bajo cero es un método que ayuda a preservar la calidad del berro, sobre todo durante tiempos largos, se ha demostrado que la aplicación de este método antes del almacenamiento afecta negativamente el color, la concentración de clorofila total y la de algunos compuestos funcionales, lo que también se observó al aplicar tratamientos térmicos (95 °C por 20 s) antes del congelamiento, esto con el objetivo de inactivar enzimas y reducir el deterioro. Todo lo anterior comparándose con berro fresco (Gonçalves et al., 2009).

Es importante mencionar que de forma similar a otros productos perecederos, la temperatura es el factor más importante durante el almacenamiento de las hierbas cortadas. Durante su manejo

comercial la temperatura varía frecuentemente, lo que contribuye a reducir la vida poscosecha. La norma oficial mexicana NOM-251-SSA1-2009 (“Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios”) establece como temperatura máxima de almacenamiento refrigerado 7 °C, sin ser específica en cuanto al tipo de alimento (Cantwell & Reid, 2007; COFEPRIS, 2009).

## **2. Justificación**

Uno de los problemas que se presenta durante el almacenamiento de hortalizas es la disminución de su calidad, tanto nutricional como sensorial, lo que limita su comercialización y a su vez aumenta el desperdicio de estos alimentos. Lo anterior hace necesario desarrollar nuevas tecnologías, en complementación con el almacenamiento refrigerado, que contribuyan a aumentar la vida útil de hortalizas frescas sin la incorporación de aditivos químicos que pongan en riesgo la salud del consumidor.

Durante el almacenamiento de hortalizas, las condiciones de iluminación generalmente no se toman en consideración, lo que provoca que en la mayoría de las ocasiones estos productos permanezcan en condiciones de oscuridad constante. Ya que se sabe que estas condiciones aceleran la senescencia, aumentando las pérdidas económicas, la luz constituye un factor potencial que podría contribuir a aumentar la vida útil de las hortalizas, debido al papel fundamental que tiene en la regulación de diversos procesos a nivel molecular, bioquímico y fisiológico.

El presente estudio plantea utilizar el almacenamiento refrigerado en combinación con ciclos de luz oscuridad como un factor para retrasar la senescencia y extender la vida útil del berro. Este estudio contribuirá además a mejorar la comprensión del efecto fisiológico que tiene la luz en la senescencia del berro.

### **3. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la aplicación de ciclos 12 h/12 h de luz blanca oscuridad durante el almacenamiento refrigerado en el proceso de senescencia de hojas cortadas y manojos de berro como producto de interés económico, así como en plantas de *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

### **4. Objetivos particulares**

Determinar el efecto de aplicar ciclos 12 h/12 h de luz blanca oscuridad durante el almacenamiento refrigerado a 4 y 10 °C en la vida de anaquel, color y pérdida de peso de hojas y manojos de berro.

Determinar el efecto de la aplicación de ciclos 12 h/12 h de luz blanca oscuridad durante el almacenamiento refrigerado a 4 y 10 °C en el contenido de clorofila y carotenoides totales de hojas y manojos de berro.

Determinar el efecto de la aplicación de ciclos 12 h/12 h de luz blanca oscuridad durante el almacenamiento refrigerado a 4 y 10 °C en el contenido de proteína soluble de hojas y manojos de berro.

Comparar el efecto de la aplicación de ciclos 12 h/ 12 h de luz blanca oscuridad durante el almacenamiento refrigerado a 10 °C entre *A. thaliana* y berro, sobre todas las variables mencionadas.

## **5. Hipótesis**

El almacenamiento refrigerado en oscuridad continua acelerará el avance de la senescencia poscosecha, lo que se manifestará en una mayor degradación de clorofila, carotenoides, proteína y de tonalidades verdes en las plantas estudiadas.

La aplicación de ciclos de luz blanca oscuridad durante el almacenamiento refrigerado mantendrá la actividad fotosintética de los tejidos foliares en las especies estudiadas, lo que se evidenciará en una menor pérdida de clorofila, carotenoides y proteínas, además de retrasar la pérdida de tonalidades verdes.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Materiales

#### 6.1.1 Material biológico

##### 6.1.1.1 *Arabidopsis thaliana*

El cultivo de *A. thaliana* se realizó en condiciones de invernadero en las instalaciones de la Facultad de Química de la UNAM, tomando en cuenta las siguientes condiciones y otras especificaciones (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Condiciones utilizadas para el cultivo en invernadero de *A. thaliana*.

Temperatura de crecimiento de 22 °C
Control de plagas
Riego cada 3 días con solución nutritiva de Hoagland (anexo 1)
Tipo de tierra (agrolita, vermiculita, mezcla comercial <i>Sunshine</i> )

Las plantas completas se utilizaron con una edad aproximada de 2 meses, que corresponde al estado de desarrollo que se considera adecuado para estudios fisiológicos.

##### 6.1.1.2 Berro

El berro utilizado provino del municipio de Cuautla, Morelos. Se tomaron en cuenta el índice de corte y las condiciones de cultivo. El producto se utilizó con menos de 24 horas desde el momento de su cosecha.

#### 6.1.2 Instalación para evaluar el efecto de la luz

Para evaluar el efecto de la luz se montó una estructura tipo anaquel con 5 entrepaños, de 2 m de altura, 80 cm de largo y 40 cm de ancho. En la parte inferior de cada entrepaño se instaló una lámpara fluorescente (32 W, *Fluorescent Daylite Philips*, 1350 lx, equivalentes a  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El tiempo de encendido y apagado se controló mediante un *timer*. Para el caso del tratamiento de oscuridad continua, sólo se utilizó un estante de las mismas dimensiones sin ninguna instalación eléctrica. Ambos estantes se cubrieron con plástico tipo *Rafavin*, con el propósito de evitar la entrada de luz externa y conservar la humedad relativa.



## 6.2 Diseño experimental

En cada uno de los experimentos se evaluó un tratamiento de ciclos 12 h/ 12 h luz oscuridad y uno de oscuridad continua durante el almacenamiento refrigerado. Para el caso de clorofila total, carotenoides y proteína soluble se realizó un muestreo aleatorio en los días 0, 3, 5 y 7. Para el caso del porcentaje de pérdida de peso y color, las mediciones se realizaron diariamente.

La planeación de cada experimento, a partir del segundo, se hizo tomando en cuenta los resultados del experimento anterior, esto con el objetivo principal de simular las posibles condiciones en que se puede comercializar el berro y a la vez intentando reducir la pérdida de peso durante el almacenamiento y la variabilidad entre repeticiones (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Condiciones establecidas en cuatro experimentos independientes con berro y/o *A. thaliana*.

Experimento	Fecha	Temperatura de almacenamiento (°C)	Especies	Presentación	Objetivo
1	22-jul-16	10	Berro	Hojas cortadas	Simular la forma en que se induce la senescencia por aplicación de oscuridad continua en hojas cortadas de <i>A. thaliana</i> (Lim, 2003; Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016) y comparar con el tratamiento de ciclos luz oscuridad.
2	08-nov-16	4	Berro	Hojas cortadas y manojos	Reducir la tasa de transpiración por efecto de la baja temperatura e incluir la presentación (manojos) en que generalmente se comercializa el berro.
3	25-nov-16	10	Berro y <i>A. thaliana</i>	Manojos y plantas completas	Comparar los resultados obtenidos en la planta modelo <i>A. thaliana</i> con los obtenidos en manojos de berro a una temperatura próxima a la que utiliza en supermercados.
4	05-abr-17	10	Berro y <i>A. thaliana</i>	Manojos y plantas completas	Muestreo más selectivo de las hojas en plantas y manojos para reducir la variabilidad observada u obtener una pauta de comportamiento más clara en cada parámetro.

La iluminancia para los ciclos 12 h/12 h luz blanca oscuridad fue de 1350 lx, equivalentes a una irradiancia de  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para el tratamiento de oscuridad total la irradiancia fue menor a  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El cálculo de iluminancia a irradiancia se hizo tomando un factor de conversión de  $0.014 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/\text{lux}$ , correspondiente a lámparas fluorescentes. El valor de irradiancia se seleccionó para que fuera cercano a lo evaluado en otras hortalizas ( $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para brócoli,  $29 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para espinaca) (Lester et al., 2010; Zhan et al., 2012).

En cada experimento se utilizaron 45 unidades experimentales (UE) que fueron asignadas a cada tratamiento de forma aleatoria. Para *A. thaliana* se utilizaron como UE plantas completas sin raíz y para berro se utilizaron manojos y hojas cortadas.

Para pérdida de peso se asignaron 3 UE independientes que se utilizaron durante todo el experimento. Para el caso de color, clorofila, proteína soluble y carotenoides totales se tomaron hojas suficientes, por variable, de 3 UE muestreadas de forma aleatoria en cada día de almacenamiento y por tratamiento (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Distribución de las unidades experimentales (UE) utilizadas en cada experimento por especie (berro y *A. thaliana*) o presentación (hojas y manojos de berro).

Parámetro(s)	Tratamiento de ciclos 12 h/12 h luz oscuridad (número de UE)	Tratamiento de oscuridad continua (número de UE)	UE totales
Clorofila total, carotenoides totales, proteína soluble y color en el día inicial (0).	3 para ambos tratamientos.		3
Clorofila total, carotenoides totales, proteína soluble y color en los días 3, 5 y 7.	9	9	18
Color en los días 1, 2 y 6.	9	9	18
Pérdida de peso.	3 durante todo el periodo de almacenamiento.	3 durante todo el periodo de almacenamiento.	6

En cada experimento se aplicó un diseño experimental factorial completamente al azar con tres réplicas por tratamiento. Los datos de cada variable se analizaron mediante un análisis de varianza de dos factores tomando en cuenta la interacción entre ambos. El tratamiento de

iluminación se tomó como primer factor y el tiempo de almacenamiento refrigerado como segundo factor. Las medias de tratamientos se compararon mediante una prueba de Tukey HSD ( $\alpha = 0.05$ ). El análisis estadístico de los datos y las gráficas mostradas en los resultados se realizaron con el programa estadístico R (*R Core Team, 2017*).

## 6.3 Metodologías

### 6.3.1 Corte y limpieza del material biológico

Los manojos de berro y sus hojas, así como las plantas de *A. thaliana*, se desinfectaron con solución de cloro comercial a 80 ppm durante 3 min, se secaron y colocaron en domos de ácido poli-láctico de media libra (226.8 g), para el caso de hojas cortadas de berro, y de 1 libra (453.6 g) para manojos de berro y las plantas de *A. thaliana*.

En el primer experimento con hojas cortadas de berro, las hojas fueron tomadas aleatoriamente de toda la planta, se seleccionaron por uniformidad de tamaño y ausencia de defectos y se formaron unidades experimentales con 10 g de hojas.

Los manojos se formaron con aproximadamente 150 g de berro, para esto el berro se recortó a una longitud de 30 cm y posteriormente se seleccionaron los tallos por uniformidad de tamaño y ausencia de defectos; una vez formados, los manojos se sujetaron de la parte inferior con rafia. Para el caso de *A. thaliana* se tomaron las plantas completas sin raíz y se colocaron dos por cada domo.

### 6.3.2 Pérdida de peso

El peso de cada unidad experimental se midió diariamente con una balanza granataria (Ohaus). La pérdida de peso se expresó como un porcentaje respecto al valor inicial utilizando la siguiente ecuación.

$$\%PP_t = \frac{P_o - P_t}{P_o} * 100$$

Donde

$\%PP_t$ : Porcentaje de pérdida de peso en el día  $t$

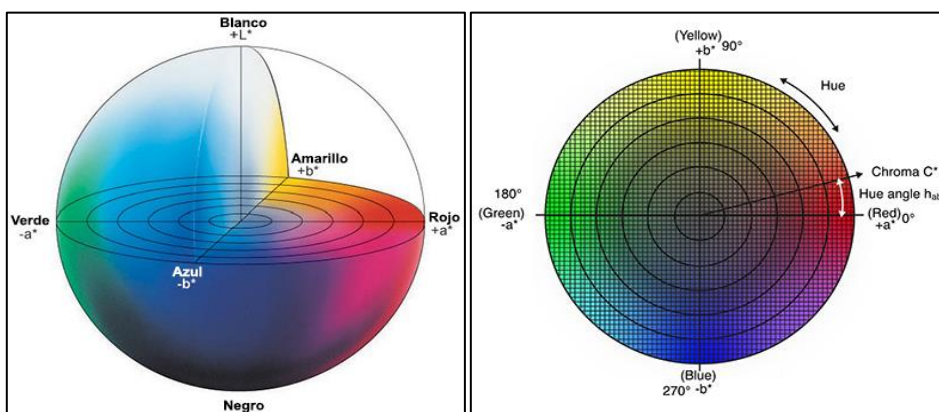
$P_o$ : Peso inicial (día 0)

$P_t$ : Peso en el día  $t$

### 6.3.3 Medición del color en la hoja

Se tomaron 20 hojas por unidad experimental y en el haz de cada una se realizó la medición de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Fig. 9) con un colorímetro *HunterLab* (*Hunter Associates Laboratory, Inc., Virginia, USA*). Para cada unidad se obtuvo el promedio de las veinte mediciones. A partir de los valores  $a^*$  y  $b^*$  se calculó  $h^*$  (*Hue angle*), utilizando la siguiente ecuación (*Konica Minolta, 2016*).

$$h^* = 180^\circ + \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right)$$



**Figura 9.** Representación visual de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $h^*$  (*Hue angle*).

### 6.3.4 Concentración de clorofila y carotenoides totales

Para la cuantificación de clorofila total se utilizó el método de la AOAC con las siguientes modificaciones. Las hojas de cada unidad experimental se picaron finamente, se tomaron 0.2 g de hoja y se adicionaron 4 mL de acetona al 85% v/v, se homogenizó con un polytron durante 1.5 min a velocidad 4 y posteriormente se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con acetona al 85% v/v. En muestras del extracto se realizaron mediciones de absorbancia a 663.2, 646.8 para clorofilas y a 470 nm para carotenoides. La concentración de clorofila total y la de carotenoides totales se calculó utilizando las siguientes ecuaciones (AOAC, 1940; Lichtenthaler, 1987).

$$C_a = 11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8}$$

$$C_b = 20.13A_{644.8} - 4.19A_{661.6}$$

$$C_t = C_a + C_b$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.90C_a - 63.14C_b}{214}$$

Donde

$C_a$ : concentración de clorofila a ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_b$ : concentración de clorofila b ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_t$ : concentración de clorofila total ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{x+c}$ : concentración de carotenoides totales ( $\mu\text{g/mL}$ )

$A_{661.6}$ : absorbancia a 661.6 nm

$A_{644.8}$ : absorbancia a 644.8 nm

$A_{470}$ : absorbancia a 470 nm

Los resultados se expresaron en mg de clorofila total/g de peso fresco (PF) y en  $\mu\text{g}$  de carotenoides totales/g PF.

### 6.3.5 Cuantificación de proteína soluble

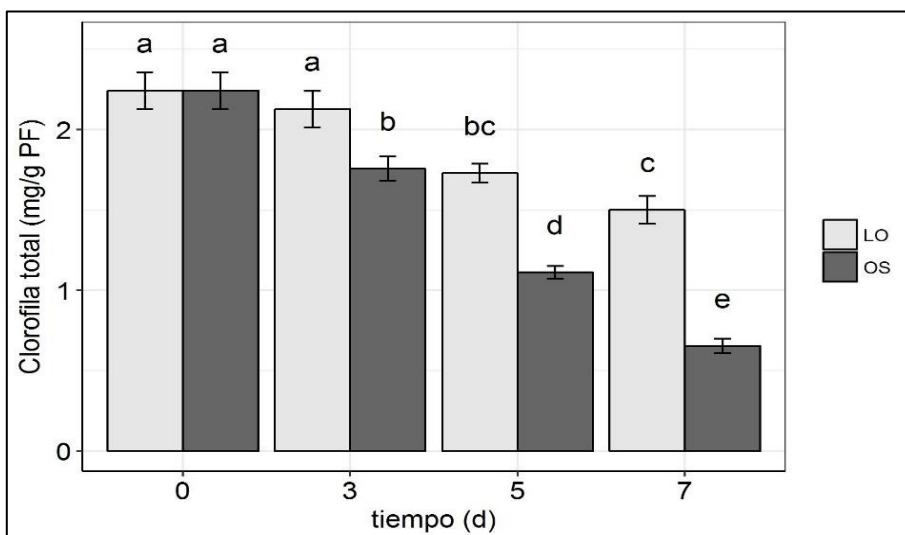
Para la cuantificación de proteína soluble se utilizó el método de Bradford con las siguientes modificaciones (Bradford, 1976; Büchert, Gómez, Villarreal, Civello, & Martínez, 2011b). Las hojas de cada unidad experimental se picaron finamente, se tomaron 0.2 g y se homogenizaron con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH = 8) mediante el uso de un polytron durante 1.5 min a velocidad 4. Posteriormente, el homogenizado se centrifugó a 20,000 g por 1 h a 4 °C y el sobrenadante se aforó a 5 mL. Se tomaron 300  $\mu\text{L}$  del extracto y se realizó una dilución 1:4 v/v. De cada dilución y de la solución amortiguadora (blanco) se tomaron 100  $\mu\text{L}$ , se adicionó 1 mL de reactivo de Bradford y después de 15 min se midió la absorbancia a 595 nm. Para el cálculo de concentraciones se realizó una curva patrón ( $R^2 > 0.99$ ) de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39) y los resultados se expresaron en mg de Rubisco/g PF.

## 7. Resultados

### 7.1 Experimento con hojas de berro a 10 °C (22/Julio/2016)

Este experimento se realizó con un enfoque parecido al que se suele utilizar en hojas cortadas de *A. thaliana*, donde éstas son sometidas a tratamientos de oscuridad continua con el objetivo de inducir la senescencia (Lim, 2003; Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016).

#### 7.1.1 Clorofila total



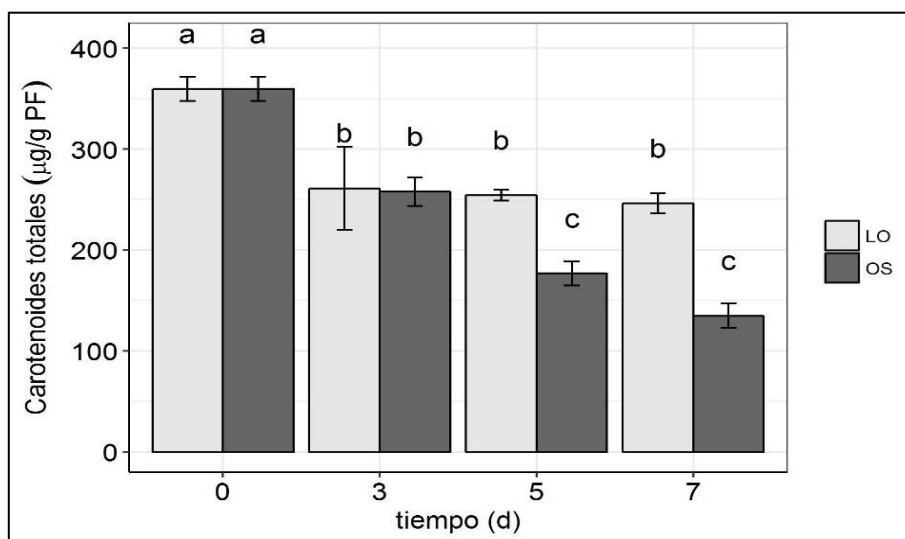
**Figura 10.** Clorofila total durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y  $HR = 92 \pm 1.1\%$  de hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

La concentración total de clorofila en las hojas de ambos tratamientos de iluminación disminuyó con el tiempo de almacenamiento (Fig. 10), lo que puede asociarse al avance de la senescencia (Buchanan, 2007; Zhan et al., 2012). La disminución fue menor en las hojas expuestas a los ciclos luz oscuridad que en las sometidas a oscuridad continua. Resultados similares se han encontrado en otras crucíferas como el brócoli almacenado a 7 °C y sometido a condiciones de oscuridad y luz continuas ( $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), reportándose un valor inicial de clorofila total de 0.86 mg/g PF y a los 10 días de 0.83 y 0.61 mg/g PF, para el tratamiento de luz y para el de oscuridad continua, respectivamente (Zhan et al., 2012).

En brócoli almacenado a 22 °C durante 5 días y bajo condiciones de luz ( $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua se reportó una concentración de clorofila total inicial de 0.28 mg/g PF y finales de 0.15 mg/g PF para el tratamiento de luz y de 0.9 mg/g PF para el tratamiento de oscuridad (Büchert, Civello, & Martínez, 2011a).

Los resultados obtenidos difieren de lo reportado para coles de Bruselas (*Brassica oleracea* var *gemmifera*) almacenadas a 22 °C durante 10 días y bajo condiciones de luz (luz blanca proveniente de LEDs,  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continuas, donde se observó un aumento de la clorofila total para el tratamiento de luz continua, reportándose un valor inicial de 0.08 mg/g PF y finales de 0.11 mg/g PF para el tratamiento de luz, y de 0.01 mg/g PF para el tratamiento de oscuridad (Hasperué, Rodoni, Guardianelli, Chaves, & Martínez, 2016b)

### 7.1.2 Carotenoides totales



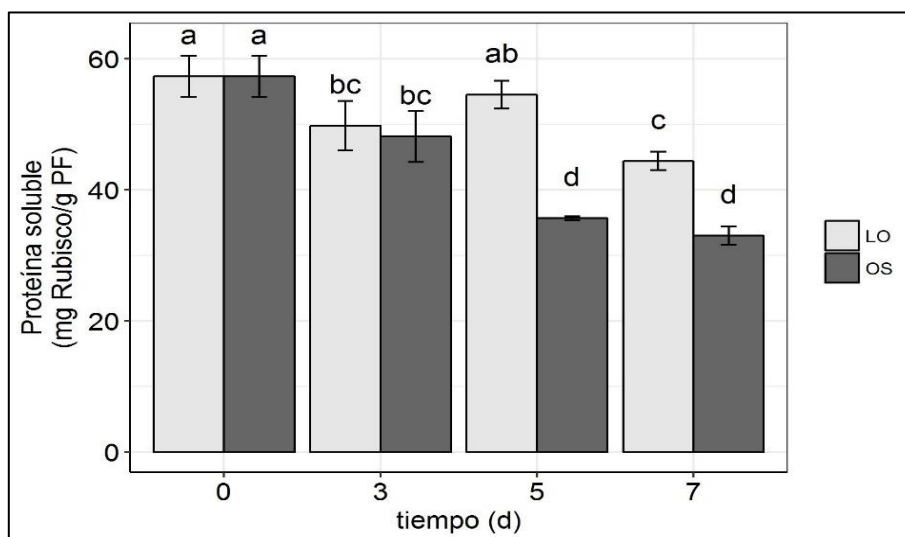
**Figura 11.** Carotenoides totales durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y HR =  $92 \pm 1.1\%$  de hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Al igual que para la concentración de clorofila total, la concentración de carotenoides totales disminuyó para ambos tratamientos respecto al tiempo de almacenamiento (Fig. 11), observándose una mayor disminución para el tratamiento de oscuridad continua. Los resultados difieren de lo reportado para kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) almacenado a 1 °C bajo

condiciones de luz ( $21.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continuas. Para ambos tratamientos se observó un aumento en la concentración de carotenoides respecto al día inicial ( $0.3 \mu\text{g/g PF}$ ), siendo mayor el incremento para el tratamiento de luz continua ( $0.7 \mu\text{g/g PF}$ ) en comparación con el de oscuridad ( $0.5 \mu\text{g/g PF}$ ) en el día 10 de almacenamiento (Noichinda, Bodhipadma, Mahamontri, Narongruk, & Ketsa, 2007).

Los resultados también contrastan con lo reportado para coles de Bruselas almacenadas por 10 días a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  bajo condiciones de luz (luz blanca proveniente de *LEDs*,  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua. En este estudio se reportó una concentración inicial de carotenoides de  $10 \mu\text{g/g PF}$  y en el día 10 de almacenamiento de  $17$  y  $9 \mu\text{g/g PF}$  para el tratamiento de luz y para el de oscuridad, respectivamente. Cabe resaltar que los autores de estos estudios no explicaron las posibles causas para el aumento gradual en la concentración de carotenoides, sin embargo, se sabe que dependiendo de la especie, la concentración de estos compuestos puede aumentar o disminuir durante la senescencia (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Hasperué et al., 2016b; Jones, et al., 2013)).

### 7.1.3 Concentración de proteína soluble



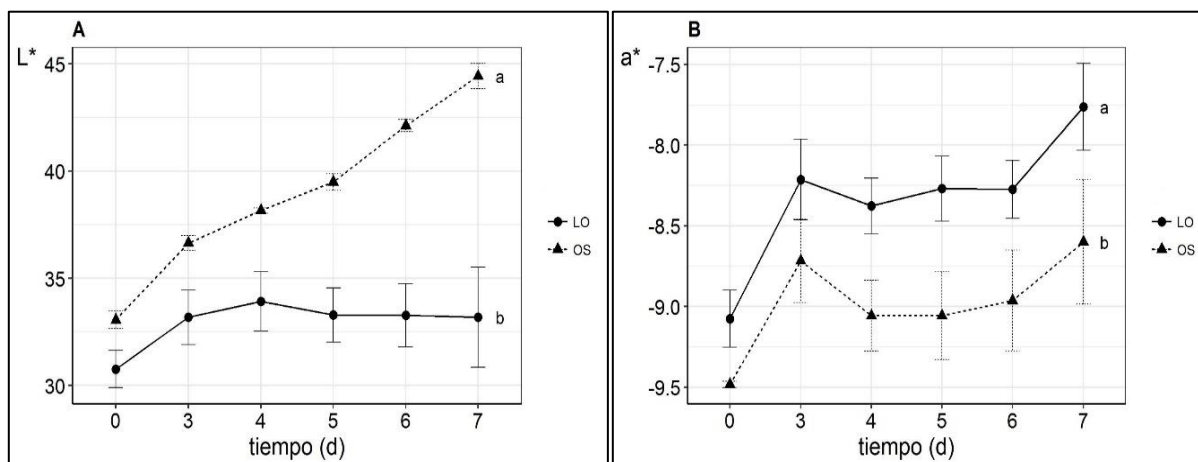
**Figura 12.** Proteína soluble durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $\text{HR} = 92 \pm 1.1\%$  de hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

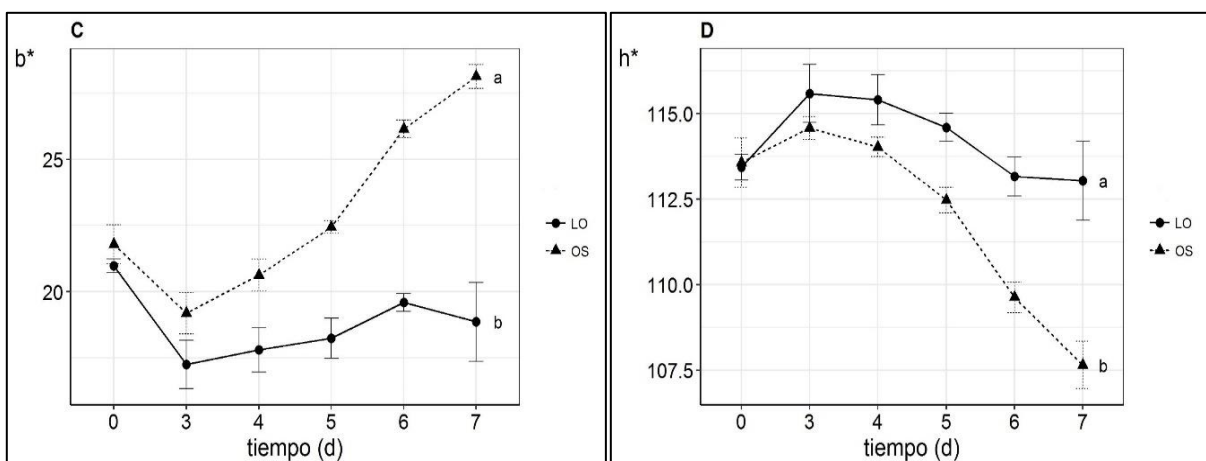


La concentración de proteína soluble disminuyó durante el tiempo de almacenamiento para ambos tratamientos de iluminación (Fig. 12), observándose una mayor degradación en el caso de las hojas de berro expuestas a oscuridad continua, lo que sugiere que este tipo de condición acelera la senescencia.

Los resultados contrastan con lo reportado para brócoli almacenado durante 5 días a 22 °C bajo condiciones de luz ( $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua. En este estudio se utilizó albúmina sérica bovina (ASB) para expresar los resultados de proteína soluble, reportándose una concentración inicial de 9.5 mg ASB/g PF. En el día 4 de almacenamiento se reportaron valores de 8.5 mg ASB/g PF para el tratamiento de luz y de 5.8 mg ASB/g PF para el tratamiento de oscuridad, mientras que para el día 5 de almacenamiento se observó una concentración menor de proteína soluble para el tratamiento de luz (3 mg ASB/g PF) en comparación con el de oscuridad (5.8 mg ASB/g PF). Los autores de este estudio sugirieron que lo anterior pudo deberse a una posible inhibición de las rutas metabólicas relacionadas con la degradación de proteínas durante el proceso de senescencia (Büchert et al., 2011b).

#### 7.1.4 Color





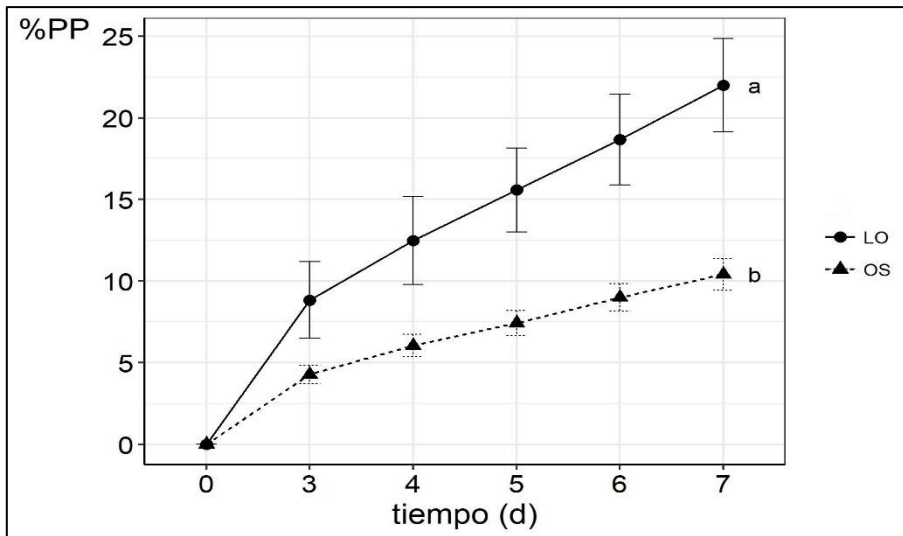
**Figura 13.** Parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $h^*$  durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y  $HR = 92 \pm 1.1\%$  en hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Los valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $h^*$  mostraron diferencias significativas entre el tratamiento de ciclos de luz oscuridad y el de oscuridad continua. La luminosidad ( $L^*$ ) incrementó en las hojas del tratamiento de oscuridad durante todo el periodo de almacenamiento, mientras que para el tratamiento de luz oscuridad aumento un poco y posteriormente se mantuvo relativamente constante (Fig. 13A). Los valores del parámetro  $a^*$  (Fig. 13B) cambiaron de más negativos a menos negativos, indicando una disminución del color verde respecto al tiempo de almacenamiento, mientras que los correspondientes a  $b^*$  (Fig. 13C) aumentaron en las hojas expuestas a oscuridad continua (indicando un cambio de color al amarillo) pero no en las sometidas a los ciclos luz oscuridad en las que las magnitudes de este parámetro permanecieron prácticamente sin cambio. El ángulo  $h^*$  disminuyó en las hojas sometidas a oscuridad continua mientras que en las hojas expuestas a los ciclos de luz oscuridad aumentó ligeramente con el tiempo para alcanzar un valor similar al inicial a los 7 días de almacenamiento, esto indicó un paso más rápido de tonalidades verdes a amarillas en el tratamiento de oscuridad (Fig. 13D).

Se han reportado comportamientos similares en el parámetro  $h^*$  y  $L^*$  para brócoli almacenado durante 5 días a 22 °C y bajo condiciones de oscuridad y luz continua ( $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). En este estudio se reportó un valor inicial de  $125^\circ$  y uno final de  $115^\circ$  para el tratamiento de luz, mientras que para el tratamiento de oscuridad se reportó un valor inicial de  $127^\circ$  y uno final de  $95^\circ$ . En  $L^*$  se reportó un valor inicial de 32 y uno final de 53 en el caso del tratamiento de oscuridad,

mientras que para el tratamiento de luz se reportó un valor inicial de 35 y uno final de 42 (Büchert et al., 2011b).

### 7.1.5 Porcentaje de pérdida de peso



**Figura 14.** Porcentaje de pérdida de peso durante el almacenamiento a  $10.3 \pm 2.3$  °C y  $HR = 92 \pm 1.1\%$  en hojas de berro sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

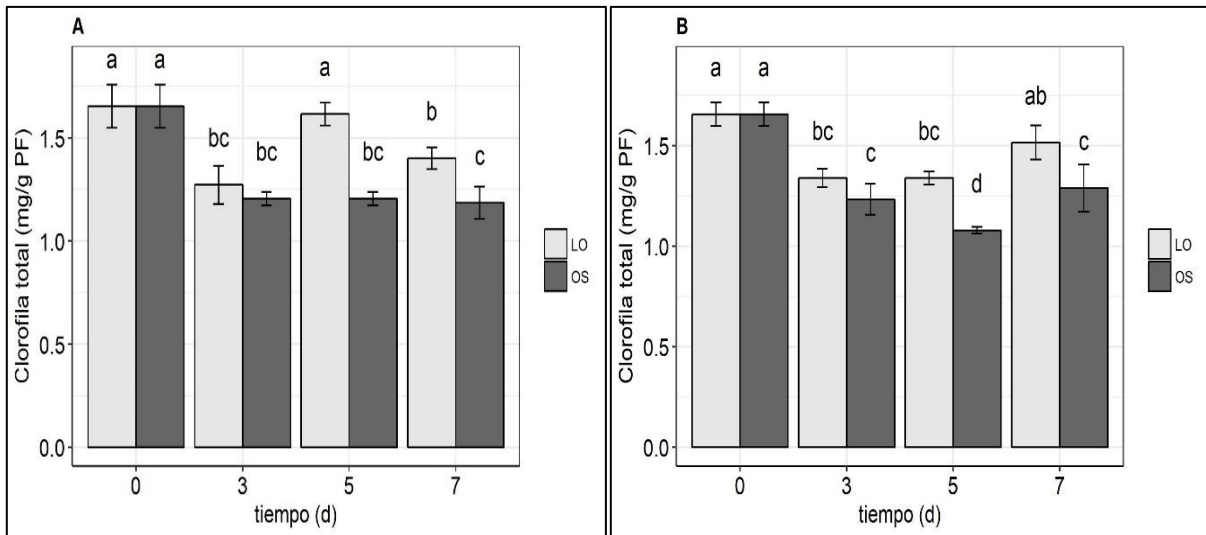
La pérdida de peso máxima recomendada para el berro es de 7% para considerarse comerciable (Holcroft, 2015). Las hojas de berro expuestas a los ciclos de luz oscuridad registraron una pérdida de peso mayor al 20% en el día 7 de almacenamiento, en contraste con el 10% registrado en las hojas sometidas a oscuridad continua (Fig. 14).

Resultados similares se han observado en otras crucíferas. En brócoli almacenado a 7 °C durante 10 días se reportaron pérdidas de peso de 2.17% para un tratamiento de luz ( $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y de 1.95% para uno de oscuridad continua. En hojas de kale almacenadas a 1 °C y a una humedad relativa de 95%, se reportaron valores en el día 10 de 3.9% para un tratamiento de luz ( $21.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y de 1.8% para un tratamiento de oscuridad continua. La mayor pérdida de peso puede atribuirse a la apertura de estomas en la hoja inducida por la luz, lo cual favorece una tasa de transpiración mayor (Noichinda et al., 2007; Zhan et al., 2012).

## 7.2 Experimento con hojas y manojos de berro a 4 °C (8/Noviembre/2016)

Tratando de reducir las pérdidas de peso que se registraron en el experimento con hojas a 10 °C e intentando simular la forma en que se comercializa el berro, se programó un segundo experimento a una temperatura más baja y que incluyera hojas y manojos de berro. La menor temperatura se estableció con el objetivo de reducir la tasa de transpiración y determinar si el tratamiento de luz oscuridad mostraba el mismo efecto sobre las variables estudiadas que se observó en el almacenamiento refrigerado a 10 °C.

### 7.2.1 Clorofila total

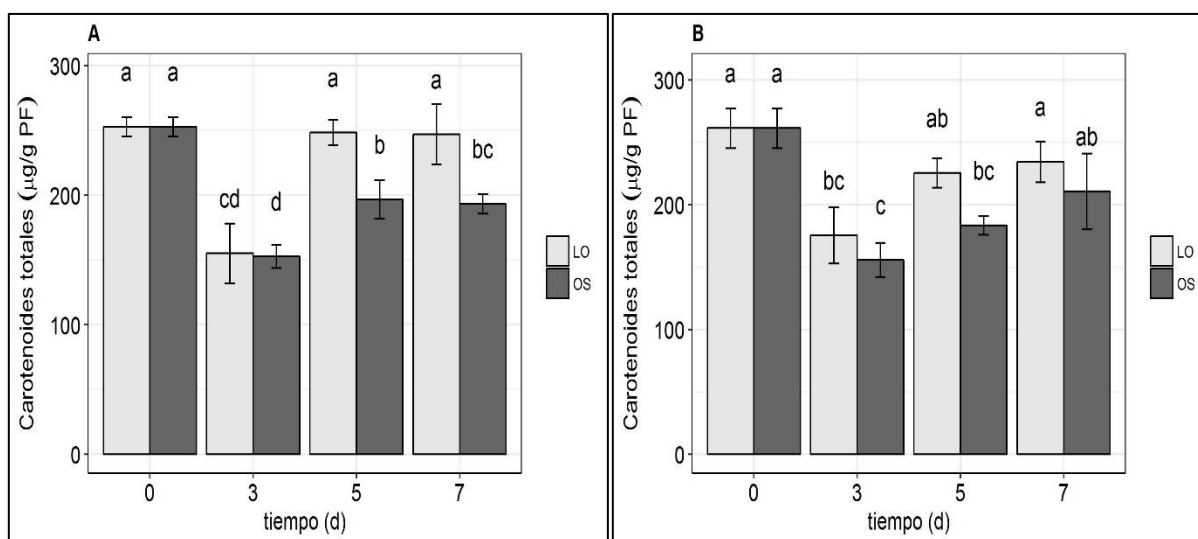


**Figura 15.** Clorofila total durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  de hojas (A) y manojos (B) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/ 12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Los resultados observados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de ciclos luz oscuridad y oscuridad continua, tanto para hojas (Fig. 15A) como para manojos de berro (Fig. 15B). En ambas presentaciones se observó un cambio significativo de clorofila respecto al día inicial, pero sin tendencias tan marcadas en relación al efecto de los ciclos de luz oscuridad, en comparación a lo registrado para hojas de berro almacenadas a 10 °C. La menor pérdida de clorofila en el tratamiento de luz oscuridad se puede asociar al mantenimiento de la actividad fotosintética del tejido, al igual que lo observado en brócoli almacenado a 22 y 7 °C (Büchert et al., 2011a; Zhan et al., 2012).

Se han reportado tendencias poco claras o un efecto nulo de la aplicación de ciclos de luz oscuridad sobre el contenido de clorofila total en otro tipo de hortalizas como el espárrago (*Asparagus officinalis* L.) almacenado a 5 °C durante 9 días y sometido a un fotoperiodo de 8 h/16 h luz oscuridad ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y a oscuridad continua como control. En este estudio se observó un descenso significativo en la concentración de clorofila respecto al tiempo de almacenamiento (con 0.12 mg/g PF en el día inicial), pero sin observarse diferencias significativas entre el tratamiento de luz oscuridad (0.033 mg/g PF) y el de oscuridad continua (0.035 mg/g PF) en el día 9 de almacenamiento (Mastropasqua, Tanzarella, & Paciolla, 2016).

## 7.2.2 Carotenoides totales



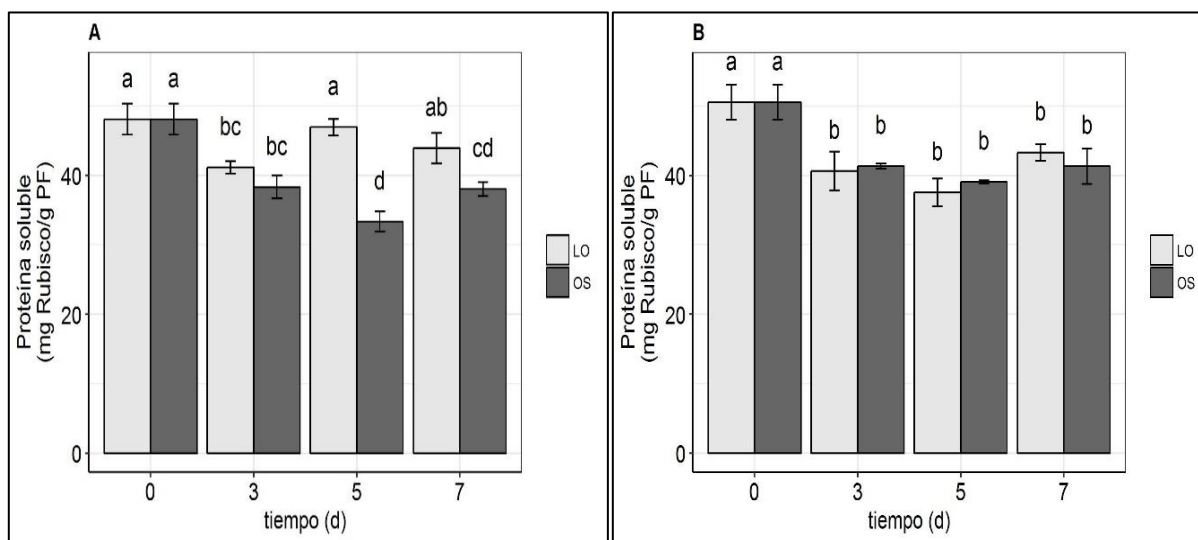
**Figura 16.** Carotenoides totales durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  de hojas (A) y manojos (B) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Los resultados para carotenoides totales mostraron diferencias significativas entre tratamientos de iluminación, tanto para hojas cortadas como para manojos de berro (Fig. 16A-B). Para ambas presentaciones fue posible observar un descenso en la concentración de carotenoides en el día 3, seguido de un aumento tanto en condiciones de luz oscuridad como en oscuridad continua. Los resultados en otras crucíferas muestran un aumento en la concentración de carotenoides para ambos tratamientos, siendo mayor en el tratamiento de luz, como se ha reportado para brócoli almacenado a 5 y 22 °C bajo condiciones de luz (luz blanca-azul proveniente de LEDs,

20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua. En el caso del brócoli a 5 °C, éste se almacenó durante 42 días, reportándose una concentración de carotenoides en el día inicial de 47  $\mu\text{g/g}$  PF y en el día 42 concentraciones de 50 y 60  $\mu\text{g/g}$  PF, para el tratamiento de luz y para el de oscuridad, respectivamente. Para brócoli almacenado a 22 °C, se utilizó un menor tiempo de muestreo (4 días) y se reportó un valor inicial de 50  $\mu\text{g/g}$  PF y finales de 80  $\mu\text{g/g}$  PF para el tratamiento de luz y de 70  $\mu\text{g/g}$  PF para el de oscuridad (Hasperué, Guardianelli, Rodoni, Chaves, & Martínez, 2016a).

En kale almacenado a 1 °C, bajo condiciones de luz (21.8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua, se reportó un valor inicial de carotenoides de 0.3  $\mu\text{g/g}$  PF y en el día 10 de almacenamiento valores de 0.69  $\mu\text{g/g}$  PF para el tratamiento de luz y de 0.45  $\mu\text{g/g}$  PF para el tratamiento de oscuridad (Noichinda et al., 2007). En ninguno de estos estudios se sugiere o da evidencia de las posibles razones del aumento observado en la concentración de carotenoides, aunque se sabe que dependiendo de la especie, la concentración de estos pigmentos puede disminuir o incluso incrementarse durante la senescencia foliar (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Jones et al., 2013).

### 7.2.3 Concentración de proteína soluble

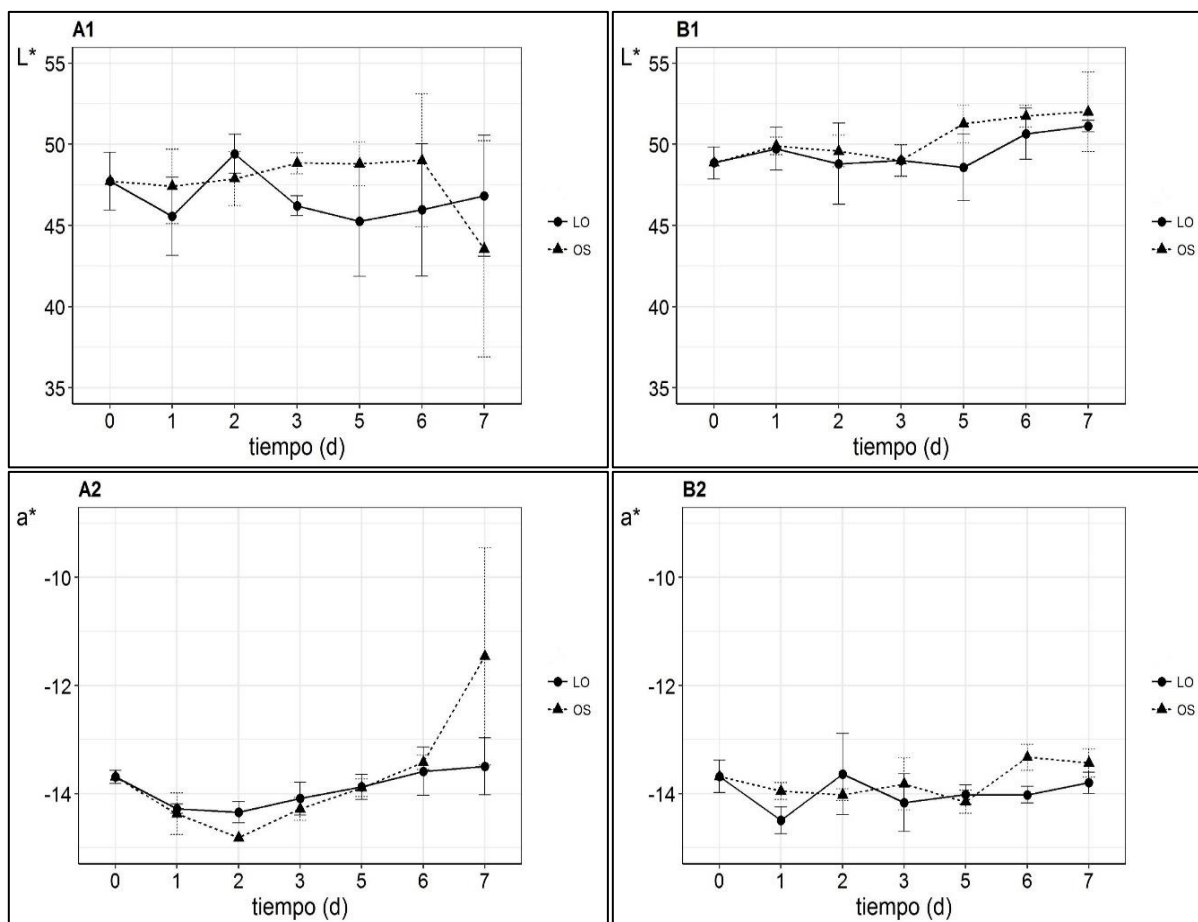


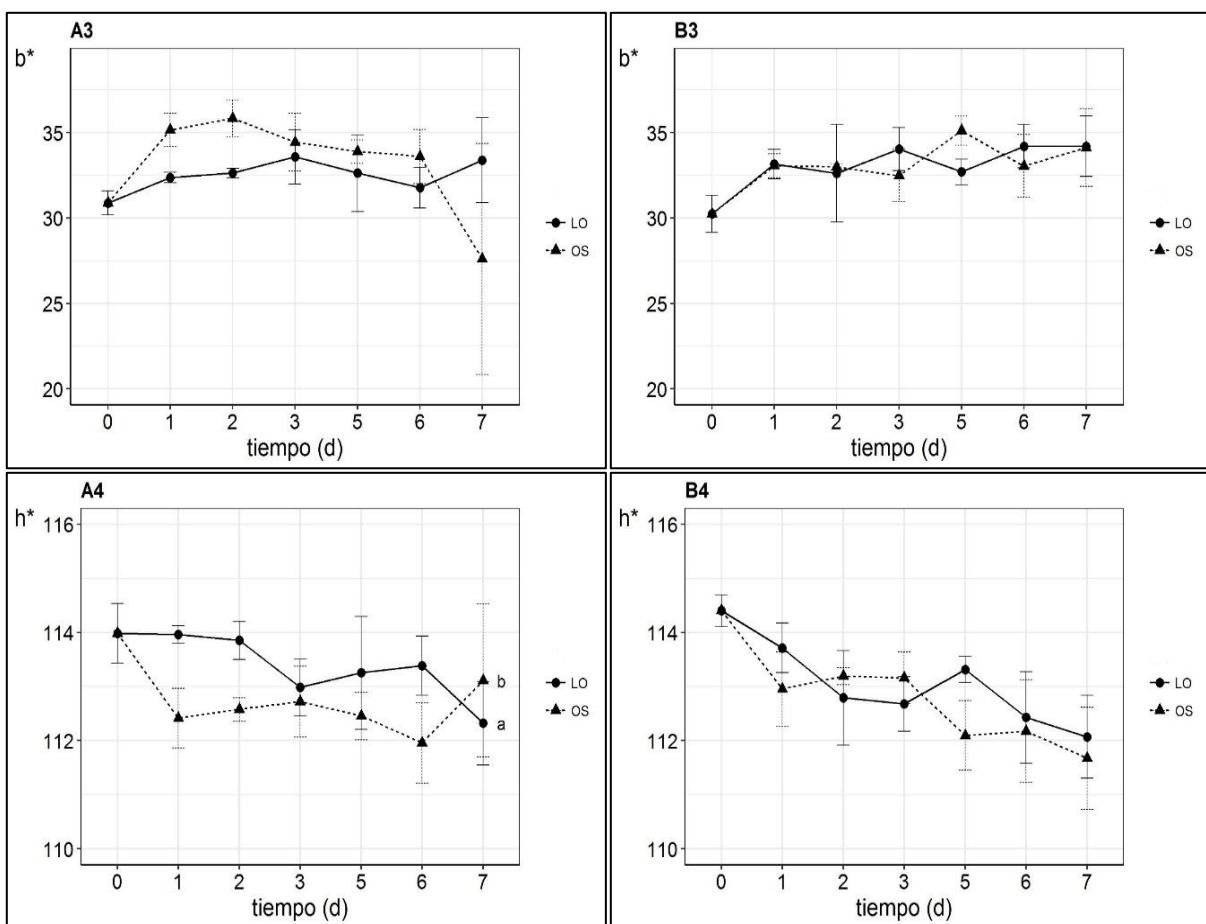
**Figura 17.** Proteína soluble durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  de hojas (A) y manojos (B) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Los resultados para proteína soluble sólo mostraron diferencias significativas entre tratamientos de iluminación para hojas cortadas (Fig. 17A). En este caso la concentración de proteína mantuvo valores mayores para el tratamiento de luz oscuridad, observándose una tendencia similar que para el caso de clorofilas y carotenoides. Estos resultados contrastan para lo reportado en brócoli almacenado a 22 °C durante 5 días de almacenamiento y sometido a condiciones de luz ( $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continuas, donde se registró un mayor descenso en los niveles de proteína soluble para el tratamiento de luz en el día 5 (Büchert et al., 2011b).

En el caso de manojos (Fig. 17B) sólo una se observó una disminución significativa en la concentración de proteína soluble en el día 3 de almacenamiento para ambos tratamientos de iluminación.

### 7.2.3 Color





**Figura 18.** Parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  y  $h^*$  durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y  $HR = 89.3 \pm 1.9\%$  en hojas (A1-4) y manojos (B1-4) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

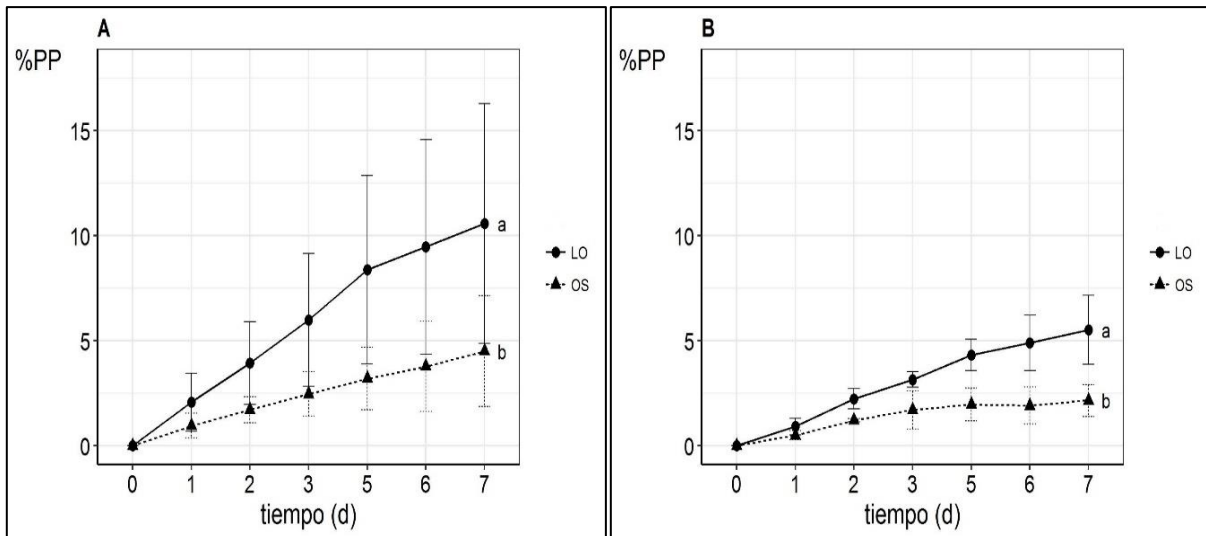
Los resultados de color sólo mostraron diferencias significativas en el parámetro  $h^*$  para hojas cortadas de berro (Fig. 18A-4), con una tendencia similar a lo observado en hojas mantenidas a 10 °C. Se observaron valores más cercanos a la región de tonalidades verdes ( $180^\circ$ ) para el tratamiento de luz oscuridad, lo que indica un paso más lento del color verde al amarillo en comparación con el tratamiento de oscuridad. Este comportamiento en el parámetro  $h^*$  es similar a lo reportado en brócoli almacenado a 22 °C bajo condiciones de oscuridad y luz continua ( $12 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Büchert et al., 2011b).

La falta de tendencias claras en algunas variables o de resultados no significativos entre tratamientos de luz oscuridad y oscuridad durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C, tanto para hojas como para manojos de berro, podría deberse a que la luz deja de tener un papel



relevante a bajas temperaturas ya que se reduce la actividad biológica o metabólica (Thompson, 2007).

### 7.2.4 Porcentaje de pérdida de peso



**Figura 19.** Pérdida de peso durante el almacenamiento a  $4.6 \pm 1.9$  °C y HR =  $89.3 \pm 1.9\%$  en manojos (B) y hojas (A) de berro sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

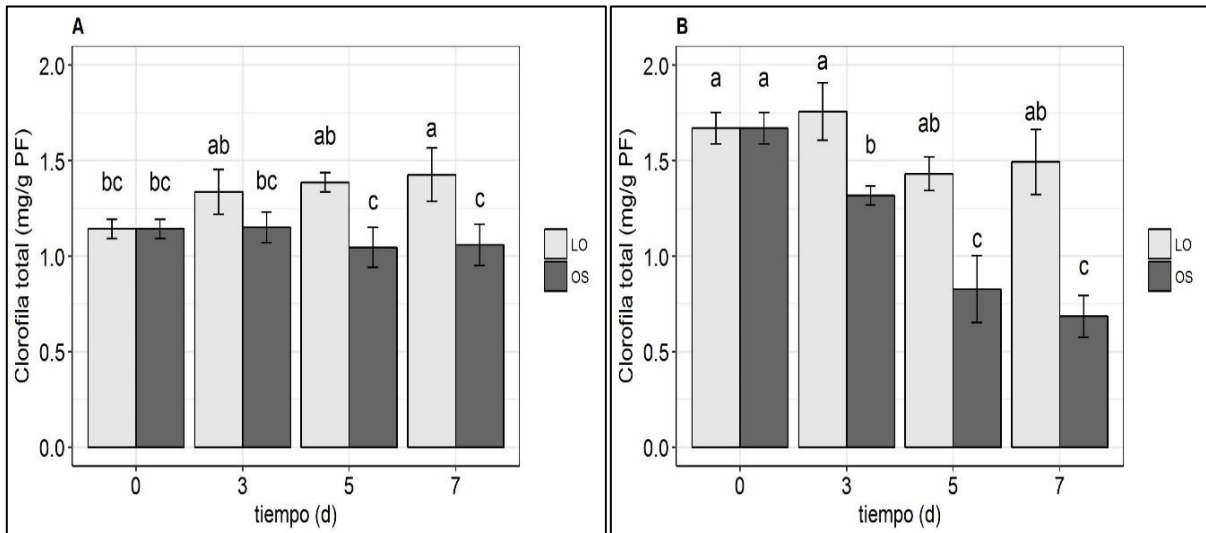
Al igual que para las hojas de berro mantenidas a 10 °C, la mayor pérdida de peso registrada se observó en el tratamiento de ciclos luz oscuridad (Fig. 19A-B), tanto en hojas como en manojos de berro. Esto puede atribuirse, como se indicó en el experimento a 10 °C, a que la luz induce la apertura de estomas provocando una tasa de transpiración mayor (Noichinda et al., 2007; Zhan et al., 2012). Sin embargo, es importante resaltar que para ambos tratamientos los manojos de berro mantuvieron valores de pérdida de peso por debajo del límite recomendado para esta hortaliza (7%) (Holcroft, 2015).

### 7.3 Experimento con manojos de berro y plantas de *A. thaliana* a 10 °C (25/Noviembre/2016)

Ya que los resultados del experimento de almacenamiento refrigerado a 4 °C mostraron que a temperaturas bajas el efecto de la luz pudiera no ser tan relevante, se diseñó un tercer experimento con una temperatura de refrigeración de 10 °C, que es además una temperatura próxima a la que se maneja en los exhibidores de hortalizas verdes de hoja en los supermercados. Se incluyeron manojos de berro y plantas completas de *A. thaliana* con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en esta especie.

Las hojas de berro no se incluyeron en este experimento tomando en consideración que no es una forma habitual de comercializar esta hortaliza y a la mayor pérdida de peso que se registró en esta presentación tanto a 4 °C como a 10 °C.

#### 7.3.1 Clorofila total



**Figura 20.** Clorofila total durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y HR =  $90.6 \pm 1.6\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

La concentración total de clorofila en el caso de manojos de berro y para el tratamiento de oscuridad disminuyó con el tiempo de almacenamiento, mientras que el tratamiento de luz

mantuvo la concentración (Fig. 20B). Lo obtenido en el tratamiento de oscuridad fue similar a lo observado en hojas cortadas de berro mantenidas a 10 °C.

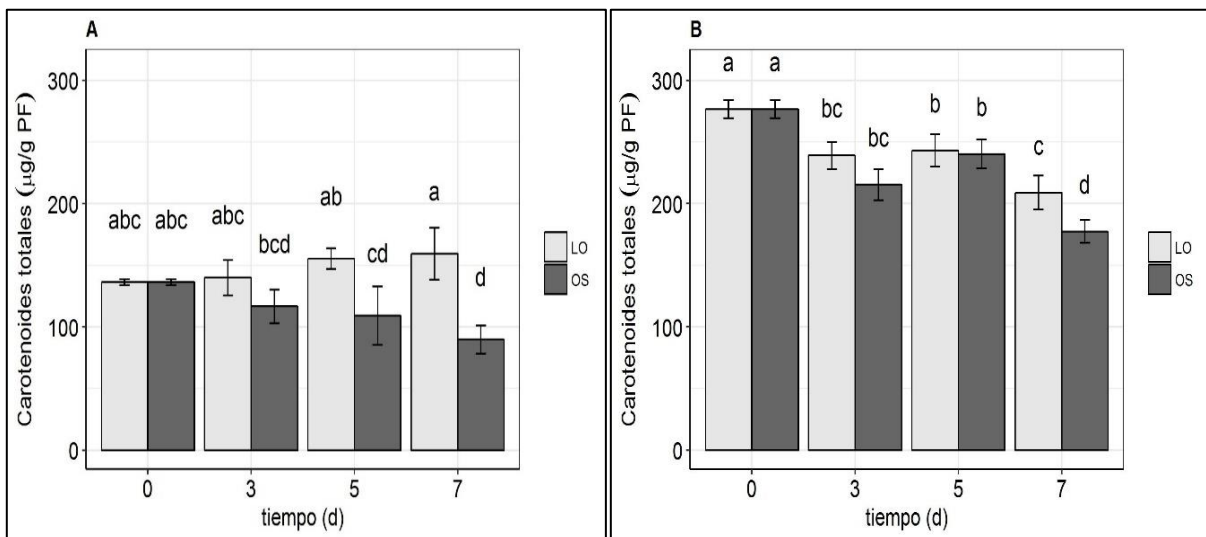
Se han encontrado resultados similares en otras crucíferas como el brócoli almacenado a 22 y 7 °C, donde se observó una mayor degradación en los tratamientos de oscuridad continua en comparación con los de luz (Büchert et al., 2011a; Zhan et al., 2012).

En el caso de *A. thaliana* (Fig. 20A), se observó un aumento significativo en la concentración de clorofila total en el día 7 de almacenamiento para el tratamiento de luz oscuridad, mientras que en el tratamiento de oscuridad continua se mantuvo constante. Se sabe que las condiciones de oscuridad continua inducen la senescencia tanto en hojas cortadas como en hojas mantenidas en la planta parental. La clorofila en estas condiciones se considera un marcador del avance de la senescencia (Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016; Ono, Wada, Izumi, Makino, & Ishida, 2013).

En hojas de *A. thaliana* mantenidas en la planta y bajo condiciones de oscuridad completa se reportó una concentración inicial de 1.5 mg/g PF y al día 5 de 0.75 mg/g PF (Ono et al., 2013). En hojas cortadas de la misma especie bajo oscuridad continua se observó un comportamiento similar, con una concentración inicial de 1.7 mg/g PF y al día 10 de 0.35 mg/g PF (Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016). El hecho de no haber observado una reducción de la clorofila total en los resultados puede deberse a la variabilidad en los mismos o, de forma análoga a los manojos de berro almacenados a 4 °C, a que las bajas temperaturas disminuyen la actividad biológica o metabólica (Thompson, 2007). Sin embargo, el tratamiento de luz oscuridad aumentó la concentración de clorofila, lo que también se ha reportado en coles de Bruselas almacenadas a 22 °C durante 10 días bajo condiciones de luz (luz blanca proveniente de LEDs, 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continuas (Hasperué et al., 2016b).

En los estudios antes citados para *A. thaliana* la temperatura no se reportó o tomó en cuenta, ya que éstos se centraron en comparar el proceso de senescencia inducido por oscuridad de diversas mutantes con el ecotipo silvestre. La variabilidad observada en los resultados puede atribuirse a que el avance de la senescencia no es uniforme en la hoja ni en toda la planta (Fig. 3) (Himmelblau & Amasino, 2001; Uzelac et al., 2016).

### 7.3.2 Carotenoides totales



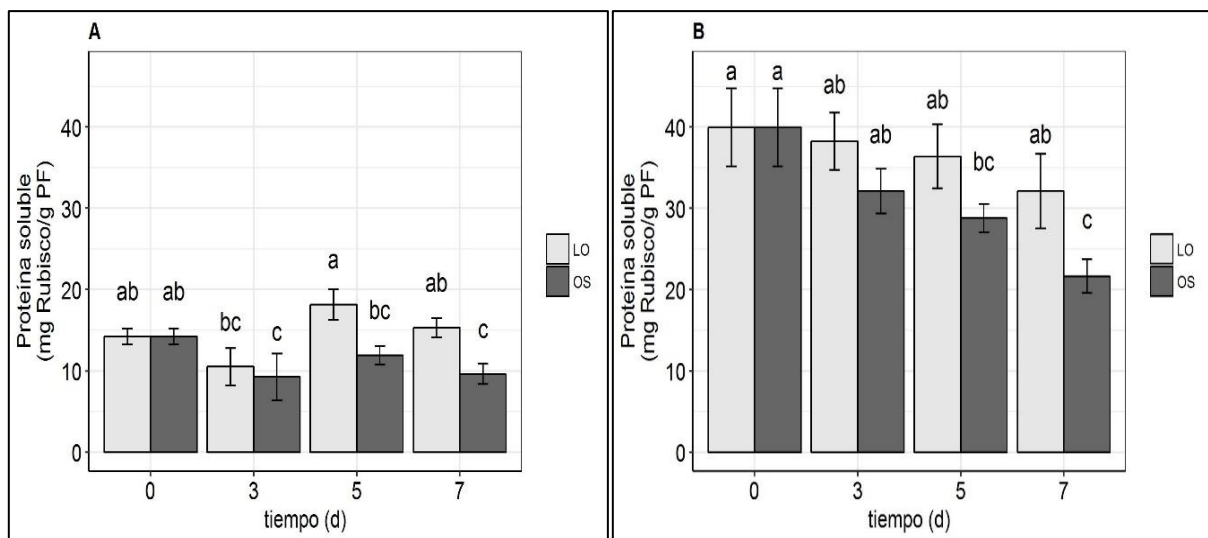
**Figura 21.** Carotenoides totales durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y HR =  $90.6 \pm 1.6\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Los niveles de carotenoides totales mostraron diferencias significativas entre el tratamiento de luz oscuridad y el de oscuridad en ambas especies. En *A. thaliana* (Fig. 21A) se observó un descenso significativo en la concentración de carotenoides para el tratamiento de oscuridad, mientras que el tratamiento de ciclos luz oscuridad mantuvo una concentración similar respecto a la del día inicial. De manera similar a lo observado en clorofila total, en *A. thaliana* se sabe que la senescencia inducida por oscuridad provoca la degradación de otros componentes como los carotenoides. Para hojas cortadas de *A. thaliana* mantenidas en oscuridad se reportó una concentración inicial de carotenoides de  $350 \mu\text{g/g}$  PF y para el día 10 de  $50 \mu\text{g/g}$  PF (Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016).

En manojos de berro (Fig. 21B) sólo se encontraron diferencias significativas en el día 7 de almacenamiento y una reducción en la concentración de carotenoides para ambos tratamientos a partir del día 3. Esto difiere con lo reportado para kale almacenado a  $1$  °C, bajo condiciones de luz ( $21.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua, donde se observó un aumento en la concentración de carotenoides, siendo mayor para el tratamiento de luz continua (Noichinda et al., 2007). En brócoli almacenado a  $5$  y  $22$  °C bajo condiciones de luz continua (luz blanca-azul

proveniente de LEDs,  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua también se observó un aumento en la concentración de carotenoides para el tratamiento de luz (Hasperué et al., 2016a).

### 7.3.3 Concentración de proteína soluble

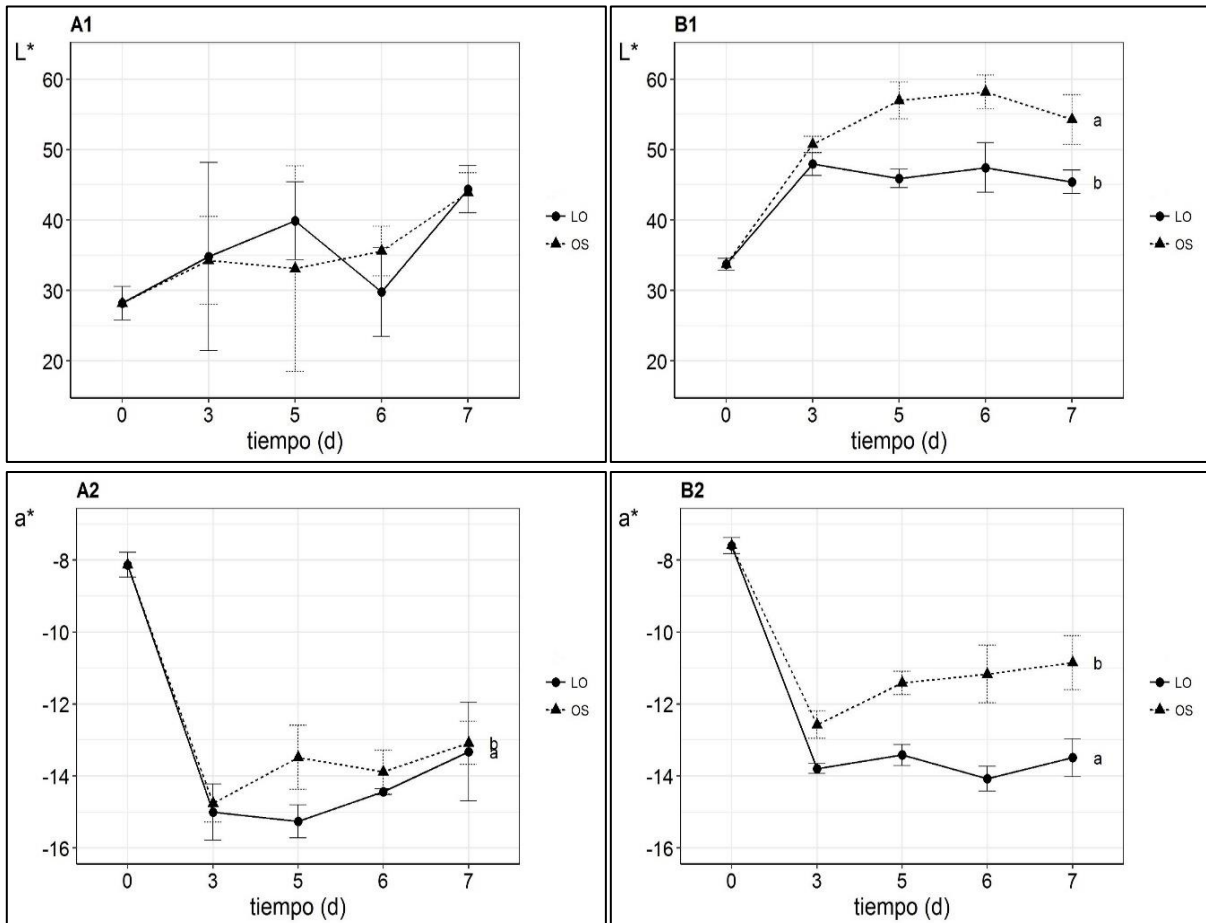


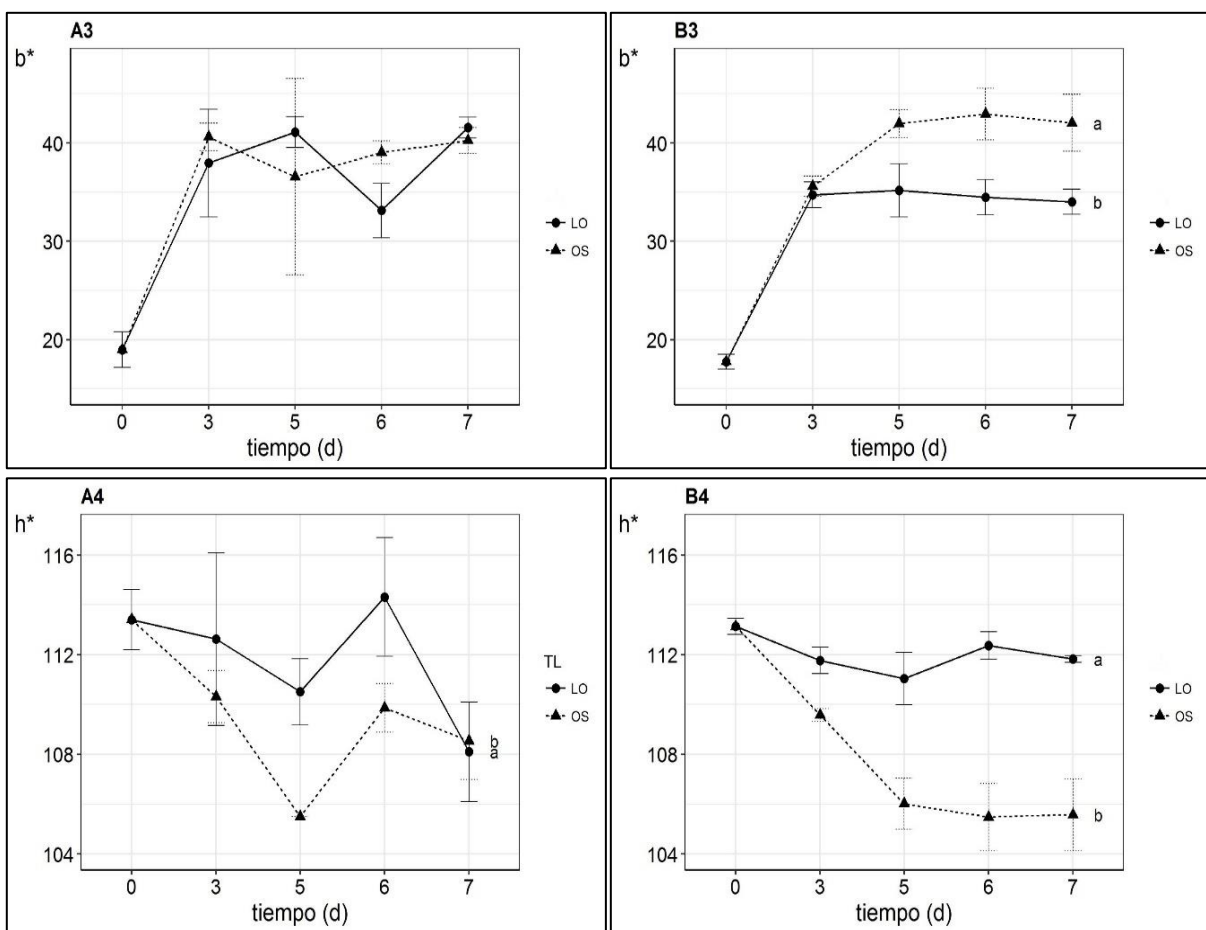
**Figura 22.** Proteína soluble durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $\text{HR} = 90.6 \pm 1.6\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Los resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos de iluminación en ambas especies. En el caso de manojos de berro (Fig. 22B) sólo se encontraron diferencias significativas en el día 7, mientras que en las plantas de *A. thaliana* se observaron diferencias en los días 5 y 7 (Fig. 22A). Sin embargo, el tratamiento de luz oscuridad mostró una tendencia a mantener valores mayores de proteína soluble en comparación con el tratamiento de oscuridad, siendo similar a lo observado en los experimentos anteriores con hojas cortadas de berro. Estos resultados también difieren a lo reportado en brócoli almacenado a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 días y sometido a condiciones de luz ( $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continuas. En este estudio se observó un mayor contenido de proteína soluble para el tratamiento de luz durante los primeros 4 días de almacenamiento, mientras que para el último día el contenido resultó ser menor en comparación con el tratamiento de oscuridad (Büchert et al., 2011b).

La concentración de proteína soluble en *A. thaliana*, al igual que la de clorofila, también se considera un marcador del avance de la senescencia natural e inducida por oscuridad. En hojas mantenidas en la planta bajo oscuridad continua se reportó una concentración inicial de 10 mg ASB/g PF y una concentración al día 5 de 4 mg ASB/g PF. En este estudio también se reportó una concentración inicial de Rubisco (medida de forma individual mediante la extracción con formamida de las bandas separadas por *SDS-PAGE* correspondientes a las subunidades de Rubisco) de 4.5 mg/g PF y una final de 1 mg/g PF (Ono et al., 2013). El no haber observado una pauta similar en los resultados puede deberse a la variabilidad registrada en los mismos o la reducción de metabolismo debido a las bajas temperaturas (Thompson, 2007).

### 7.3.4 Color





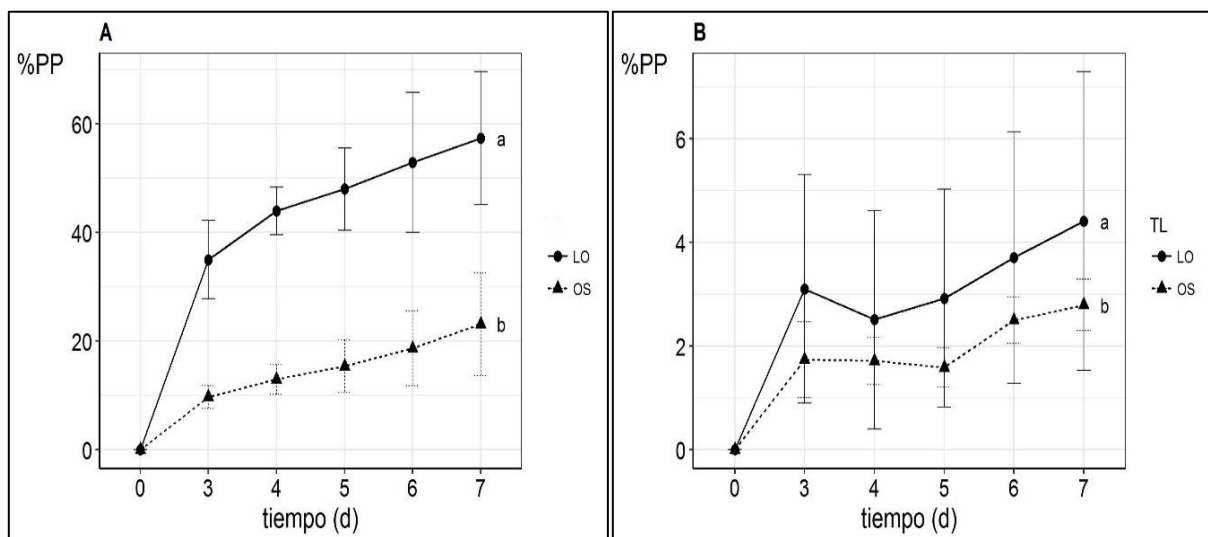
**Figura 23.** Parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  y  $h^*$  durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y  $HR = 90.6 \pm 1.6\%$  en plantas de *A. thaliana* (A1-4) y manojos de berro (B1-4) sometidas a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

En las hojas de *A. thaliana*, sólo se encontraron diferencias significativas para los parámetros  $h^*$  y  $a^*$  (Fig. 23A-4 y 23A-2) observándose un paso más rápido de la región del verde al amarillo en las plantas mantenidas bajo oscuridad continua. En el caso de los manojos de berro, se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos de ciclos luz oscuridad y oscuridad continua para todos los parámetros de color (Fig. 23B1-4). Al igual que para *A. thaliana*, se observó un paso más rápido de tonalidades verdes a amarillas para las plantas mantenidas bajo oscuridad continua.

En el caso de  $h^*$  y  $L^*$ , se han reportado resultados similares en brócoli almacenado a 22 °C bajo condiciones de oscuridad y luz continua ( $12 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Büchert et al., 2011b).

La variabilidad observada en algunos días de almacenamiento para ambas especies se pudo deber a que el patrón de senescencia no es homogéneo en todas las hojas pues su estado de desarrollo varia (Himmelblau & Amasino, 2001; Uzelac et al., 2016) y a que el muestreo de las mismas se hizo de forma aleatoria sobre toda la planta de *A. thaliana* y sobre todo el manojito de berro.

### 7.3.5 Porcentaje de pérdida de peso



**Figura 24.** Pérdida de peso durante el almacenamiento a  $9 \pm 1.8$  °C y  $HR = 90.6 \pm 1.6\%$  en plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

De forma similar a lo observado en los experimentos previos de almacenamiento a 10 y 4 °C, tanto para hojas como para manojos de berro, los resultados para ambas especies mostraron diferencias significativas entre el tratamiento de luz oscuridad y el de oscuridad continua (Fig. 24A-B). De igual forma, se registró una mayor pérdida de peso en las plantas sometidas a ciclos de luz oscuridad, lo que puede atribuirse, como se mencionó anteriormente, a que la luz induce la apertura de estomas, lo que a su vez aumenta la tasa de transpiración (Noichinda et al., 2007; Zhan et al., 2012).

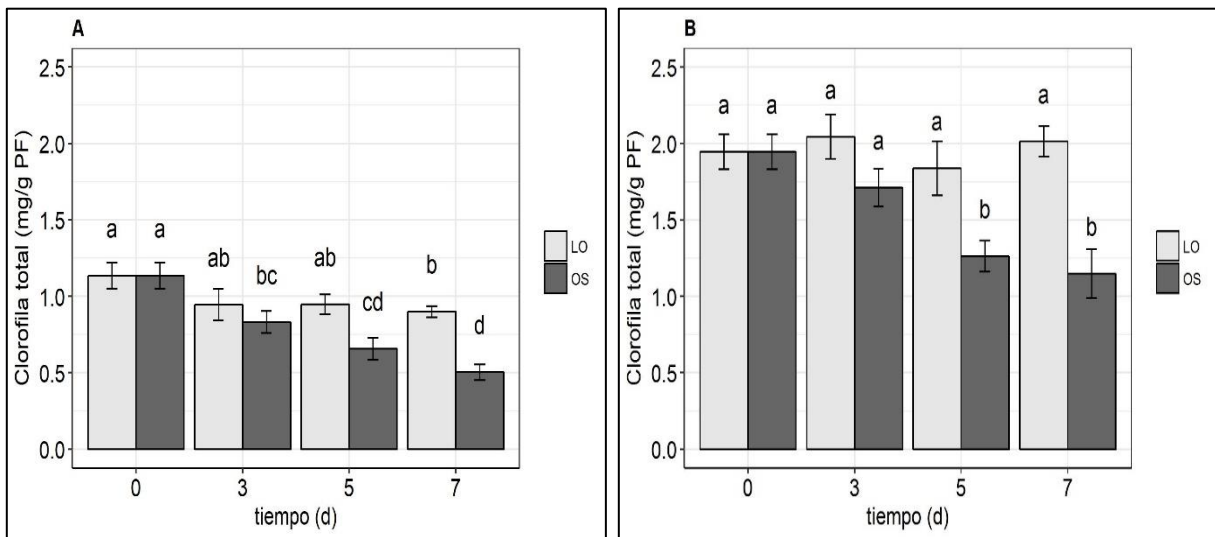
Sin embargo, es importante destacar que para el caso de manojos de berro tanto el tratamiento de ciclos luz oscuridad como el de oscuridad mantuvieron valores promedio por debajo del límite máximo recomendado de 7% (Holcroft, 2015).



## 7.4 Experimento con manojos de berro y plantas de *A. thaliana* a 10 °C (5/Abril/2017)

Debido a la variabilidad y al patrón de comportamiento poco claro observado en algunos resultados en el tercer experimento, se programó un último experimento en el que se aplicó un muestro más selectivo. En los manojos de berro sólo se seleccionaron hojas apicales en la parte media superior de cada manoj, mientras que en *A. thaliana* se seleccionaron hojas por uniformidad de tamaño en la parte media y media superior de cada planta.

### 7.4.1 Clorofila total



**Figura 25.** Clorofila total durante el almacenamiento a  $9.9 \pm 1.4$  °C y  $HR = 90.6 \pm 2.3\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

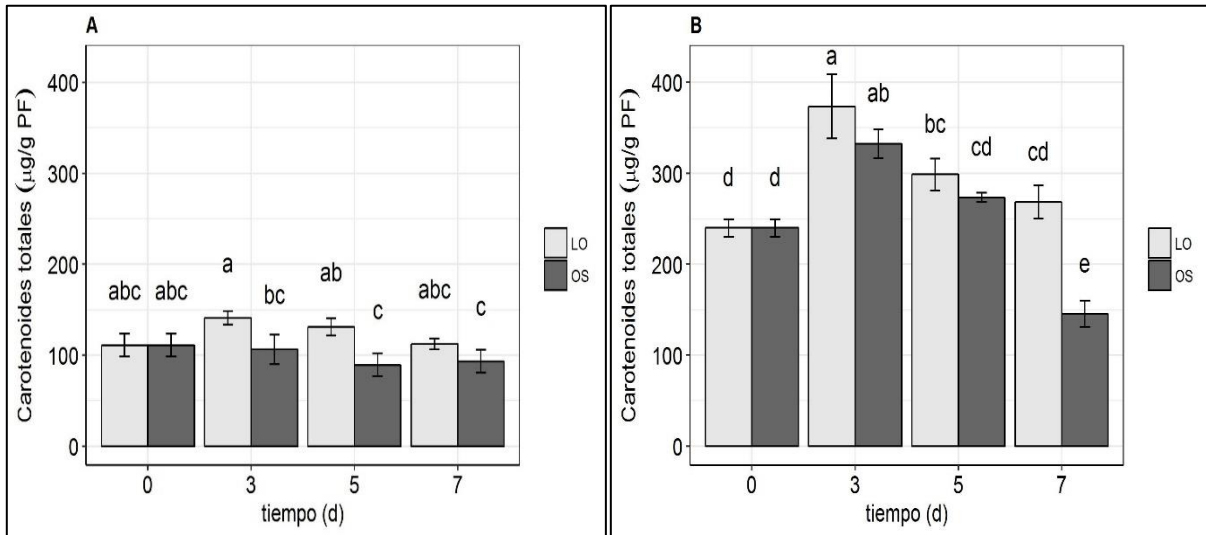
Los resultados para ambas especies mostraron diferencias significativas entre tratamientos de iluminación en los días 5 y 7 de almacenamiento (Fig. 25A-B). Para el caso de manojos berro, el tratamiento de luz oscuridad mantuvo la concentración de clorofila durante todo el periodo de almacenamiento, en comparación con el de oscuridad continua, que mostró un descenso en el contenido de clorofila total a partir del día 5. En *A. thaliana* se observó un descenso en la concentración de clorofila para ambos tratamientos, en el día 7 para luz oscuridad, y para los días 5 y 7 en el tratamiento de oscuridad continua.

Se ha reportado una disminución de la concentración de clorofila, tanto para un tratamiento de luz continua ( $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) como para uno de oscuridad, en brócoli almacenado a  $7 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 días. En este estudio se reportó una concentración inicial de clorofila de  $0.86 \text{ mg/g PF}$  y una concentración final de  $0.83$  y  $0.61 \text{ mg/g PF}$ , para el tratamiento de luz y oscuridad continua, respectivamente. En brócoli almacenado a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 días bajo condiciones de luz ( $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua se reportó un valor inicial de  $0.28 \text{ mg/g PF}$  y finales de  $0.15 \text{ mg/g PF}$  para el tratamiento de luz y de  $0.9 \text{ mg/g PF}$  para el tratamiento de oscuridad (Büchert et al., 2011a; Zhan et al., 2012).

En contraste, también se ha reportado un aumento en la concentración de clorofila por efecto de la aplicación de luz continua (luz blanca proveniente de *LEDs*,  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en coles de Bruselas almacenadas a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 días. En este estudio se registró una concentración inicial de clorofila total de  $0.08 \text{ mg/g PF}$  mientras que para el día 10 de almacenamiento en el tratamiento de luz se registró una concentración de  $0.11 \text{ mg/g PF}$  y para el tratamiento de oscuridad un valor de  $0.01 \text{ mg/g PF}$  (Hasperué, et al., 2016b).

El comportamiento de *A. thaliana* para el tratamiento de oscuridad fue similar a lo reportado para hojas mantenidas en la planta, donde se reportó un descenso gradual en la concentración de clorofila en las hojas bajo esta condición, con un valor inicial de  $1.5 \text{ mg/g PF}$  y al día 5 de  $0.75 \text{ mg/g PF}$  (Ono et al., 2013). En hojas cortadas de *A. thaliana* mantenidas bajo oscuridad continua se reportó una concentración inicial de  $1.7 \text{ mg/g PF}$  y al día 10 de  $0.35 \text{ mg/g PF}$  (Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016).

## 7.4.2 Carotenoides totales



**Figura 26.** Carotenoides totales durante el almacenamiento a  $9.9 \pm 1.4$  °C y HR =  $90.6 \pm 2.3\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

La concentración de carotenoides totales mostró diferencias significativas entre tratamientos de iluminación para ambas especies. En *A. thaliana* se observaron diferencias significativas en los días 3 y 5 (Fig. 26A), mientras que para berro solo en el día 7 (Fig. 26B). En ambos casos el valor de concentración fue mayor para el tratamiento de ciclos luz oscuridad.

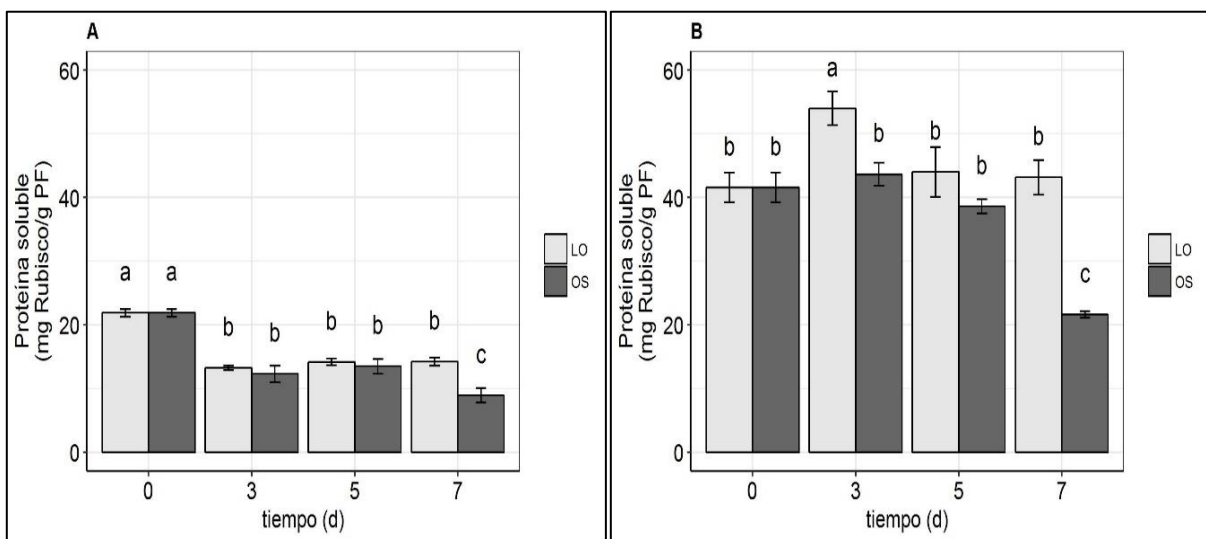
Es importante resaltar que para el caso del berro se observó un aumento en el día 3 de almacenamiento para ambos tratamientos, y posteriormente un descenso. Diferencias significativas en uno o más días de almacenamiento y un comportamiento similar en la concentración de carotenoides ya ha sido reportado en hortalizas como el kale almacenado a 1 °C bajo condiciones de luz ( $21.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad continua durante 10 días de almacenamiento. En este estudio se observó un aumento en la concentración de carotenoides respecto al día inicial ( $0.3 \mu\text{g/g PF}$ ), siendo mayor para el tratamiento de luz continua ( $0.5 \mu\text{g/g PF}$ ) en comparación con el de oscuridad ( $0.7 \mu\text{g/g PF}$ ) en el día 10 de almacenamiento (Noichinda et al., 2007).

Los resultados también son similares a lo observado en coles de Bruselas almacenadas por 10 días a 22 °C bajo condiciones de luz (luz blanca proveniente de LEDs,  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y

oscuridad continua. En este estudio se reportó un valor inicial de 10  $\mu\text{g/g}$  PF y para el día 10, de 17 y 9  $\mu\text{g/g}$  PF para para los tratamientos de luz y oscuridad continuas, respectivamente (Hasperué et al., 2016b).

En *A. thaliana*, para hojas cortadas y mantenidas en oscuridad se reportó una concentración inicial de 350  $\mu\text{g/g}$  PF y para el día 10 de 50  $\mu\text{g/g}$  PF (Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016).

### 7.4.3 Concentración de proteína soluble



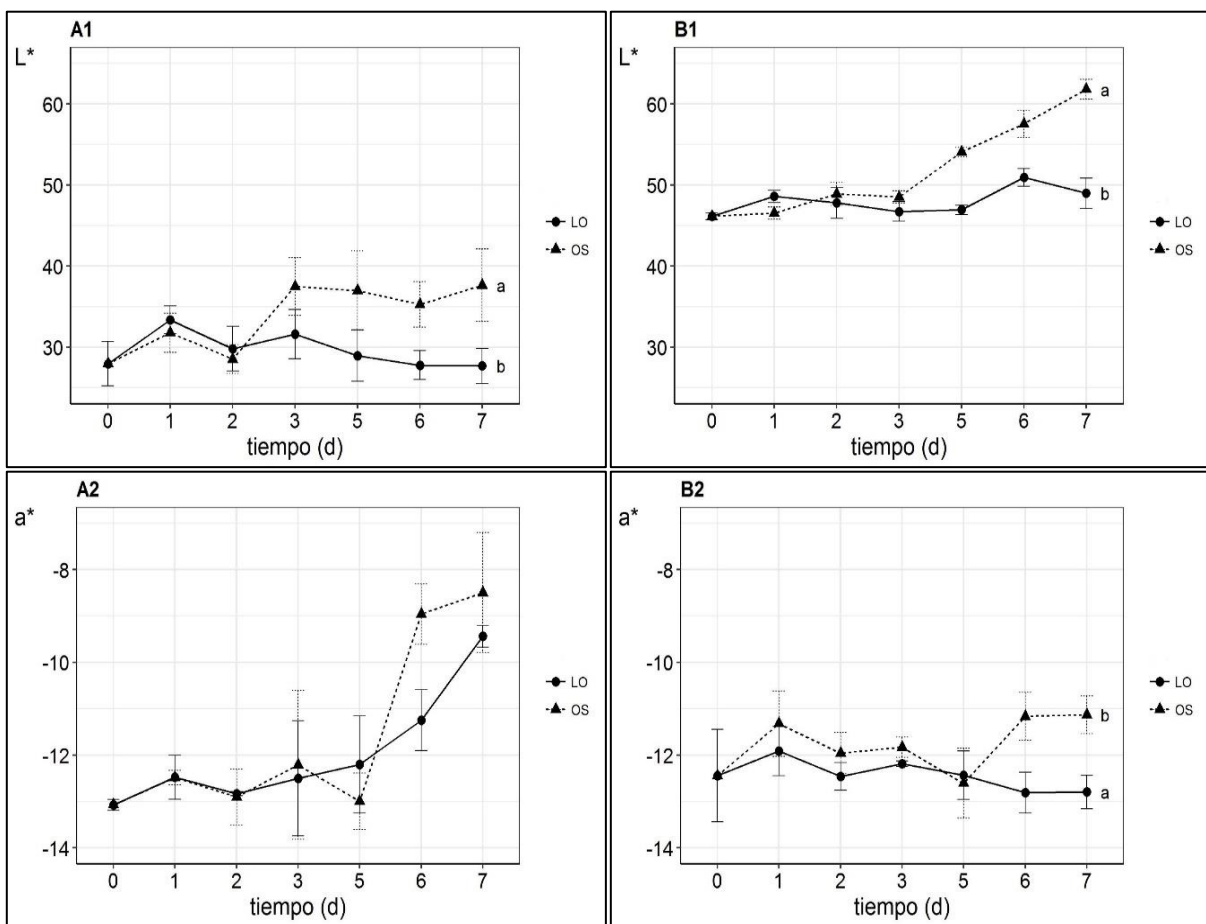
**Figura 27.** Proteína soluble durante el almacenamiento a  $9.9 \pm 1.4$  °C y HR =  $90.6 \pm 2.3\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). PF: peso fresco. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de tratamientos (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

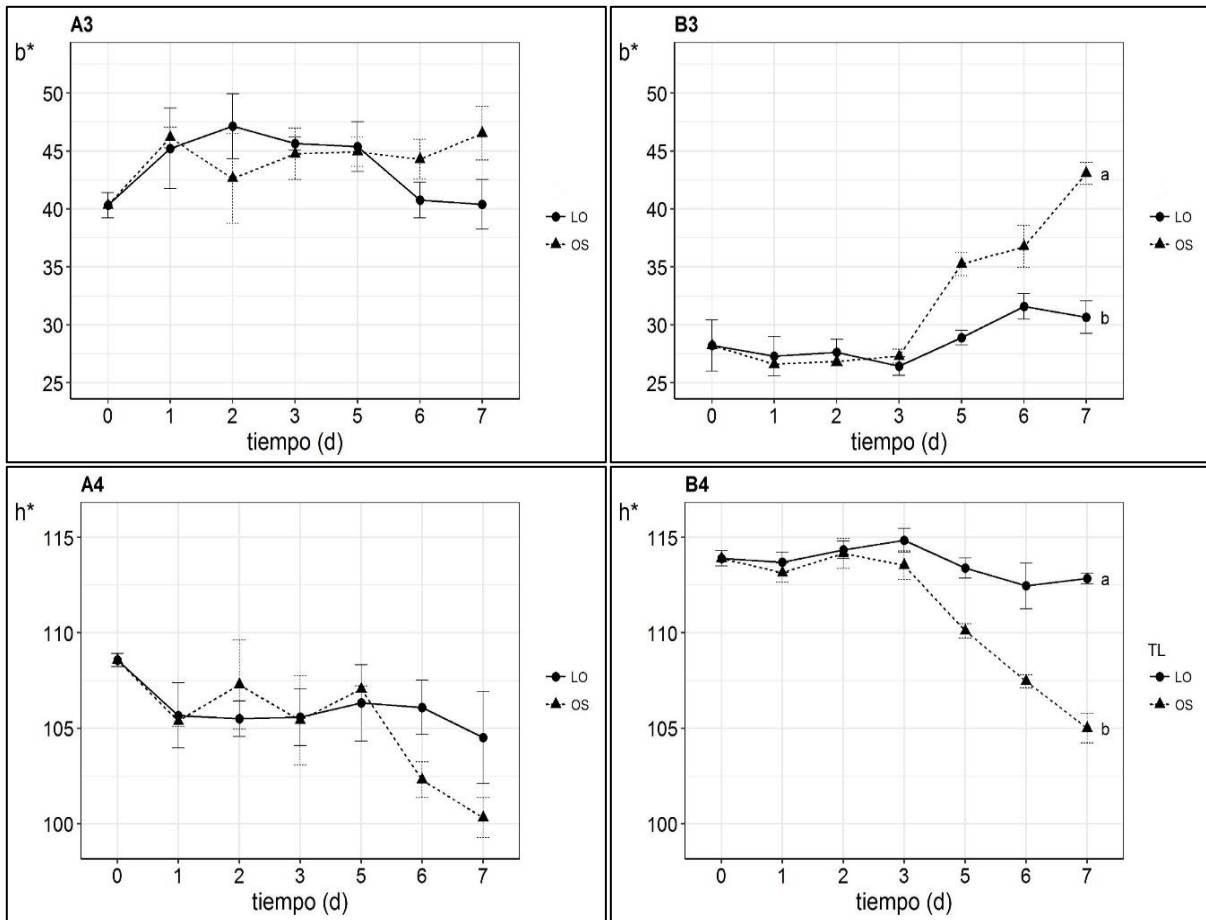
La concentración de proteína soluble sólo mostró diferencias significativas en el día 7 de almacenamiento en ambas especies. En el caso de *A. thaliana* se observó un descenso en la concentración en ambos tratamientos a partir del día 3 (Fig. 27A) mientras que para berro se observó un aumento significativo en el mismo día y posteriormente un descenso (Fig. 27B).

Los resultados difieren de lo reportado para brócoli bajo condiciones de luz continua y almacenado a 22 °C por 5 días. En el día inicial se registró una concentración de proteína soluble de 9.5 mg/g PF mientras que para el día 5 de almacenamiento se observó una concentración menor de proteína soluble para el tratamiento de luz (3 mg ASB/g PF) en comparación con el de oscuridad (5.8 mg ASB/g PF) (Büchert et al., 2011b).

En hojas de *A. thaliana* mantenidas en la planta y bajo oscuridad continua, se reportó un descenso en la concentración de proteína soluble. En el día inicial se reportó un valor de 10 mg/g PF y de 4 mg/g PF en el día 5. En este estudio también se reportó una concentración inicial de Rubisco de 4.5 mg/g PF y una final de 1 mg/g PF (medida de forma individual) (Ono et al., 2013).

#### 7.4.4 Color





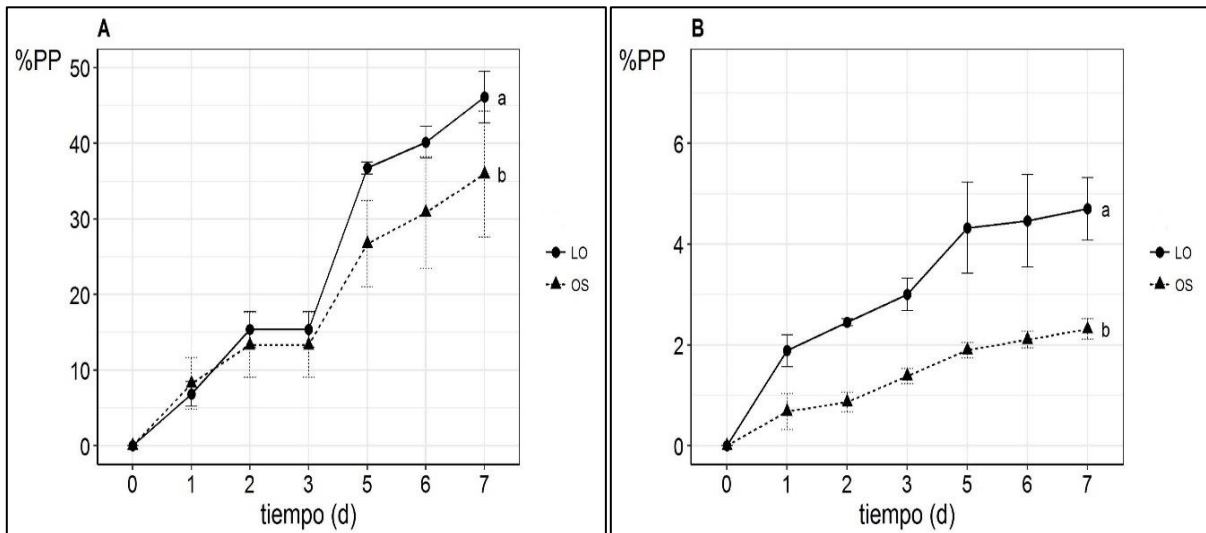
**Figura 28.** Parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  y  $h^*$  durante el almacenamiento a  $9.9 \pm 1.4$  °C y  $HR = 90.6 \pm 2.3\%$  en plantas de *A. thaliana* (A1-4) y manojos de berro (B1-4) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Los resultados para  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  y  $h^*$  mostraron diferencias significativas en el caso de berro (Fig. 28B1-4). En *A. thaliana* sólo se encontraron diferencias significativas en el parámetro  $L^*$  (Fig. 28A-1), observándose valores mayores para el tratamiento de luz oscuridad. La falta de significancia en los parámetros cromáticos de *A. thaliana* pudo deberse a la variabilidad observada en los resultados para estas variables o la reducción del metabolismo debido a la baja temperatura (Thompson, 2007).

En berro se observó un comportamiento parecido a lo que se había registrado en experimentos anteriores, un paso más lento de tonalidades verdes a amarillas por efecto del tratamiento de ciclos luz oscuridad. En brócoli almacenado a 22 °C se ha reportado un comportamiento similar en los parámetros  $h^*$  y  $L^*$  (Büchert et al., 2011b).

Aunque para *A. thaliana* no sea común realizar este tipo de mediciones, es posible apreciar un paso del verde al amarillo conforme avanza la senescencia inducida por oscuridad (Fig. 3) (Luschin-Ebengreuth & Zechmann, 2016).

#### 7.4.5 Porcentaje de pérdida de peso



**Figura 29.** Pérdida de peso durante el almacenamiento  $9.9 \pm 1.4$  °C y  $HR = 90.6 \pm 2.3\%$  de plantas de *A. thaliana* (A) y manojos de berro (B) sometidos a oscuridad continua (OS) y a ciclos 12 h/12 h de luz oscuridad (LO,  $18.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos de iluminación (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

Los resultados para pérdida de peso mostraron diferencias significativas en ambas especies (Fig. 29A-B). La mayor pérdida de peso para el tratamiento de luz oscuridad fue similar a lo observado en los experimentos anteriores y a lo reportado en brócoli almacenado a 7 °C durante 10 días, en este estudio se reportaron valores finales de 2.17% y 1.95% para un tratamiento de luz ( $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y uno de oscuridad continua, respectivamente (Zhan et al., 2012).

En hojas de kale almacenadas durante 10 días a 1 °C y a una humedad relativa de 95%, se reportó un porcentaje de pérdida de peso de 3.9% para un tratamiento de luz continua ( $21.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y de 1.8% para uno de oscuridad. La mayor pérdida de peso puede atribuirse, como se ha mencionado, a la mayor apertura de estomas inducida por la luz, lo cual favorece una tasa de transpiración más alta (Noichinda et al., 2007).

Al igual que en el experimento anterior, es importante resaltar que la pérdida de peso para los tratamientos de ciclos de luz oscuridad y oscuridad continua en el caso de berro se mantuvo por debajo del límite máximo recomendado de 7% (Holcroft, 2015).



## 8. Conclusiones

- La aplicación de ciclos 12 h/12 h luz oscuridad en los experimentos 1, 2 y 4 contribuyó a retrasar la degradación de clorofilas, carotenoides y proteína soluble durante el almacenamiento de hojas y manojos de berro a 10 °C, en comparación con el tratamiento de oscuridad continua.
- La aplicación de ciclos luz oscuridad en los experimentos 1, 2 y 4 contribuyó a retrasar el paso de tonalidades verdes a amarillas en hojas y manojos de berro almacenados a 10 °C, en comparación con el tratamiento de oscuridad continua.
- En hojas de berro almacenadas a 4 °C, la aplicación de ciclos luz oscuridad mostró una tendencia a retrasar la degradación de varios componentes en comparación con el tratamiento de oscuridad. Se obtuvieron valores mayores para el tratamiento de luz oscuridad, en los días 3 y 5 de almacenamiento, en la concentración de clorofila, carotenoides totales y proteína soluble.
- En manojos de berro almacenados a 4 °C la aplicación de ciclos luz oscuridad también mostró una tendencia a retrasar la pérdida de clorofila (días 5 y 7 de almacenamiento) y carotenoides totales (solo entre los días 3, 5 y 7, pero no en días individuales de almacenamiento) en comparación con el tratamiento de oscuridad continua.
- A 4 °C los parámetros cromáticos L\*, a\*, b\* no mostraron una pauta de comportamiento clara en ninguno de los tratamientos y para ninguna de las presentaciones de berro. Solo en el parámetro h\* para hojas cortadas se registró un retraso en el paso de tonalidades verdes a amarillas para el tratamiento de luz oscuridad.
- En el experimento 3, la aplicación de ciclos luz oscuridad en plantas de *A. thaliana* almacenadas a 10 °C contribuyó a retrasar la disminución, en los días 3 y 5 de almacenamiento, en la concentración de clorofila, carotenoides totales y proteína soluble.
- Los resultados en el experimento 4 para *A. thaliana* a una temperatura de 10 °C mostraron valores mayores para el tratamiento de luz oscuridad en la concentración de clorofila total (días 5 y 7), carotenoides totales (día 5) y proteína soluble (día 7).

- Los resultados de color en *A. thaliana* mostraron una tendencia similar a lo obtenido en berro en los parámetros L\* (solo en el experimento 4), a\* y h\* (experimento 3). En los tres parámetros la aplicación de ciclos luz oscuridad mostró una tendencia a retrasar el paso de tonalidades verdes a amarillas.
- En todos los experimentos se registraron mayores pérdidas de peso para el tratamiento de luz oscuridad. Sin embargo, para el caso de manojos de berro almacenados a 10 °C las pérdidas no superaron el máximo recomendado.

## 9. Perspectivas y recomendaciones

- Los porcentajes de pérdida de peso en las hortalizas o plantas tratadas con ciclos de luz oscuridad indican que éstas deben protegerse de la excesiva deshidratación, esto se podría lograr incrementando la humedad relativa del almacén, colocando los productos en envases cerrados sin perforaciones y/o introduciendo una almohadilla humedecida en los envases.
- Se podrían explorar otras alternativas para reducir la pérdida de peso en combinación con los tratamientos de luz oscuridad. Se ha probado la utilización por tiempos cortos de luz infrarroja (860 nm) proveniente de *LEDs*. Este tipo de tratamiento demostró reducir la apertura de estomas y por tanto la tasa de transpiración, en hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Kozuki et al., 2015).
- El uso de atmósferas modificadas también podría ser otra alternativa que ayudaría a reducir la pérdida de peso al utilizar ciclos de luz oscuridad. Este tipo de tecnología se utiliza, entre otras aplicaciones, con el objetivo de reducir la tasa de transpiración y la producción de etileno. Su aplicación requeriría el uso de envases que permitan el paso de la luz, como los que se fabrican con polipropileno (Kader, 2007; Silveira et al., 2014).
- La irradiancia utilizada en el presente estudio fue cercana a la utilizada en estudios con brócoli y otras hortalizas. Este factor podría tomarse en cuenta en el diseño experimental de futuros trabajos con el objetivo de determinar la irradiancia óptima.
- Los resultados en este estudio podrían servir como indicativo de bajo qué temperaturas de almacenamiento refrigerado (4 y 10 °C) podría ser más ventajoso aplicar ciclos de luz oscuridad.
- En estudios futuros sería importante realizar la evaluación de otro tipo de variables, lo que ayudaría a aumentar la comprensión del papel que tiene la luz durante el almacenamiento refrigerado del berro. Para esto resultaría conveniente determinar el estado funcional de los cloroplastos mediante microscopía confocal, la concentración de glucosinolatos por HPLC-Masas, la expresión de genes relacionados con la senescencia mediante RT-qPCR y la aceptabilidad del berro mediante pruebas sensoriales.

## 10. Literatura citada

AOAC. (1940). *AOAC Official Method 940.03 Chlorophyll in Plants*.

Avila-Ospina, L., Moison, M., Yoshimoto, K., & Masclaux-Daubresse, C. (2014). Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of Experimental Botany*, 65(14), 3799–3811. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru039>

Ay, N., Janack, B., & Humbeck, K. (2014). Epigenetic control of plant senescence and linked processes. *Journal of Experimental Botany*, 65(14), 3875–3887. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru132>

Ayala, F., Echáarri, J. F., Olarte, C., & Sanz, S. (2009). Quality characteristics of minimally processed leek packaged using different films and stored in lighting conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(7), 1333–1343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01962.x>

Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). *Fundamentos de fisiología vegetal* (2da edición). Madrid, España: McGrawHill.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Balazadeh, S., Schildhauer, J., Araújo, W. L., Munné-Bosch, S., Fernie, A. R., Proost, S., ... Mueller-Roeber, B. (2014). Reversal of senescence by N resupply to N-starved *Arabidopsis thaliana*: Transcriptomic and metabolomic consequences. *Journal of Experimental Botany*, 65(14), 3975–3992. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru119>

Barrientos-Priego, A. F., Nieto-Ángel, R., & Nieto-Ángel, D. (2001). Unidades De Medida, Símbolos Y Terminología Importantes. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 7(1), 5–20.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Brouwer, B., Gardeström, P., & Keech, O. (2014). In response to partial plant shading, the lack of phytochrome A does not directly induce leaf senescence but alters the fine-tuning of chlorophyll biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 65(14), 4037–4049. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru060>

Brouwer, B., Ziolkowska, A., Bagard, M., Keech, O., & Gardeström, P. (2012). The impact of light intensity on shade-induced leaf senescence. *Plant, Cell and Environment*, 35(6), 1084–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02474.x>

Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Second edition). Chichester, England: John Wiley & Sons. Recuperado de <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470714212.html>

Buchanan, V. (2007). Senescence in Plants. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020133>

Büchert, A. M., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2011a). 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(3), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.11.001>

Büchert, A. M., Gómez Lobato, M. E., Villarreal, N. M., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2011b). Effect of visible light treatments on postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), 355–361. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4193>

Cantwell, M. I., & Reid, M. (2007). Sistemas de Manejo Postcosecha: Hierbas Frescas. In A. A. Kader (Ed.), *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas* (3ra edición, pp. 367–372). Universidad de California. Centro de Investigación e Información en Tecnología Postcosecha.

Chen, M. C. M., Chao, P. Y., Huang, M. Y., Yang, J. H., Yang, Z. W., Lin, K. H., & Yang, C. M. (2012). Chlorophyllase activity in green and non-green tissues of variegated plants. *South African Journal of Botany*, *81*, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.04.004>

COFEPRIS. (2009). NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Recuperado el 1 de junio de 2017 de [http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/COMISIÓN DE OPERACIÓN SANITARIA\\_Documentos para publicar en la sección de MEDICAMENTOS/SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS/NOM 251 SSA1 2009.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/COMISIÓN_DE_OPERACIÓN_SANITARIA_Documentos_para_publicar_en_la_sección_de_MEDICAMENTOS/SUPLEMENTOS_ALIMENTICIOS/NOM_251_SSA1_2009.pdf)

Comisión Nacional Forestal. (2010). Plantas medicinales de la Farmacia Viviente del CEFORFOR: usos terapéuticos tradicionales y dosificación. Recuperado el 1 de abril de 2016 de [www.conafor.gob.mx/biblioteca/plantas\\_medicinales\\_de\\_la\\_farmacia\\_viviente-conafor.pdf](http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/plantas_medicinales_de_la_farmacia_viviente-conafor.pdf)

Costa, L., Millan Montano, Y., 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. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.017>

Feng, C.-M., Qiu, Y., Van Buskirk, E. K., Yang, E. J., & Chen, M. (2014). Light-regulated gene repositioning in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, *5*, 3027. <https://doi.org/10.1038/ncomms4027>

Fujiki, Y., Nakagawa, Y., Furumoto, T., Yoshida, S., Biswal, B., Ito, M., ... Nishida, I. (2005). Response to darkness of late-responsive dark-inducible genes is positively regulated by leaf age and negatively regulated by calmodulin-antagonist-sensitive signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *46*(10), 1741–1746. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci174>

Gonçalves, E. M., Cruz, R. M. S., Abreu, M., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2009). Biochemical and colour changes of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) during freezing and frozen storage. *Journal of Food Engineering*, *93*(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.027>

Goodspeed, D., Liu, J. D., Chehab, E. W., Sheng, Z., Francisco, M., Kliebenstein, D. J., & Braam, J. (2013). Postharvest circadian entrainment enhances crop pest resistance and phytochemical cycling. *Current Biology*, 23(13), 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.034>

Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C., & Masclaux-Daubresse, C. (2010). Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies*, 333(4), 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.01.016>

Guo, Y. (2013). Towards systems biological understanding of leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 82(6), 519–528. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9974-2>

Hasperué, J. H., Guardianelli, L., Rodoni, L. M., Chaves, A. R., & Martínez, G. A. (2016a). Continuous white-blue LED light exposition delays postharvest senescence of broccoli. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.041>

Hasperué, J. H., Rodoni, L. M., Guardianelli, L. M., Chaves, A. R., & Martínez, G. A. (2016b). Use of LED light for Brussels sprouts postharvest conservation. *Scientia Horticulturae*, 213, 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.004>

Hassan, F. A. S., & Mahfouz, S. A. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on sweet basil leaf senescence and ethylene production during shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 55(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.07.008>

Himmelblau, E., & Amasino, R. M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*, 158(10), 1317–1323. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00608>

Holcroft, D. (2015). *Water Relations in Harvested Fresh Produce. The Postharvest Education Foundation White Paper*. Recuperado de [http://www.postharvest.org/Water relations PEF white paper FINAL MAY 2015.pdf](http://www.postharvest.org/Water%20relations%20PEF%20white%20paper%20FINAL%20MAY%202015.pdf)

Hopkins, R. J., Van Dam, N. M., & Van Loon, J. J. A. (2009). Role of Glucosinolates in Insect-Plant Relationships and Multitrophic Interactions. *Annu. Rev. Entomol*, *54*, 57–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090623>

Hu, X., Tanaka, A., & Tanaka, R. (2013). Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant Methods*, *9*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-19>

Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, *64*(1), 48–59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>

Jiao, Y., Lau, O. S., & Deng, X. W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews. Genetics*, *8*(3), 217–230. <https://doi.org/10.1038/nrg2049>

Jones, R., Ougham, H., Thomas, H., & Waaland, S. (2013). *The Molecular Life of Plants*. Chichester, England: John Wiley & Sons.

Kader, A. A. (2007). Atmósferas Modificadas en el Transporte y Almacenamiento. In A. A. Kader (Ed.), *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas* (3ra edición, pp. 157–168). Universidad de California. Centro de Investigación e Información en Tecnología Postcosecha.

Khanna-Chopra, R. (2012). Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma*, *249*(3), 469–481. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0308-z>

Konica Minolta. (2016). Espacios de Color. Recuperado de <http://sensing.konicaminolta.com.mx/learning-center/color-measurement/color-spaces/>

Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., & Vreugdenhil, D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review in Plant Biology*, *55*, 141–172.



- Kozuki, A., Ishida, Y., Kakibuchi, K., Mishima, T., Sakurai, N., Murata, Y., ... Kubo, Y. (2015). Effect of postharvest short-term radiation of near infrared light on transpiration of lettuce leaf. *Postharvest Biology and Technology*, *108*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.010>
- Leonelli, S. (2007). Arabidopsis, the botanical Drosophila: from mouse cress to model organism. *Endeavour*, *31*(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2007.01.003>
- Lester, G. E., Makus, D. J., & Mark Hodges, D. (2010). Relationship between fresh-packaged spinach leaves exposed to continuous light or dark and bioactive contents: Effects of cultivar, leaf size, and storage duration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(5), 2980–2987. <https://doi.org/10.1021/jf903596v>
- Li, H., Washburn, T., & Chory, J. (1993). Regulation of gene expression by light. *Current Opinion in Cell Biology*, *5*(3), 455–460. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90011-E](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90011-E)
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, *148*(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lim, P. (2003). Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, *8*(6), 272–278. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00103-1)
- Liu, J. D., Goodspeed, D., Sheng, Z., Li, B., Yang, Y., Kliebenstein, D. J., & Braam, J. (2015). Keeping the rhythm: light/dark cycles during postharvest storage preserve the tissue integrity and nutritional content of leafy plants. *BMC Plant Biology*, *15*, 92. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0474-9>
- Luschin-Ebengreuth, N., & Zechmann, B. (2016). Compartment-specific investigations of antioxidants and hydrogen peroxide in leaves of Arabidopsis thaliana during dark-induced senescence. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(6). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2150-6>

Mastropasqua, L., Tanzarella, P., & Paciolla, C. (2016). Effects of postharvest light spectra on quality and health-related parameters in green *Asparagus officinalis* L. *Postharvest Biology and Technology*, *112*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.010>

Muñoz, M., Ledesma, J.-A., Chávez, A., Pérez-Gil, F., Mendoza, E., Calvo, M., & Ávila, A. (2010). *Composición de alimentos. Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo* (2da edición). Ciudad de México: McGrawHill.

Nam, H. (1997). The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology*, *8*(2), 200–7. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9079732>

Noichinda, S., Bodhipadma, K., Mahamontri, C., Narongruk, T., & Ketsa, S. (2007). Light during storage prevents loss of ascorbic acid, and increases glucose and fructose levels in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*). *Postharvest Biology and Technology*, *44*(3), 312–315. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.12.006>

Olarte, C., Sanz, S., Federico Echávarri, J., & Ayala, F. (2009). Effect of plastic permeability and exposure to light during storage on the quality of minimally processed broccoli and cauliflower. *LWT - Food Science and Technology*, *42*, 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.07.001>

Ono, Y., Wada, S., Izumi, M., Makino, A., & Ishida, H. (2013). Evidence for contribution of autophagy to Rubisco degradation during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, *36*(6), 1147–1159. <https://doi.org/10.1111/pce.12049>

Page, T., Griffiths, G., & Buchanan-Wollaston, V. (2001). Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiology*, *125*(2), 718–727. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.718>

Parlitz, S., Kunze, R., Mueller-roeber, B., & Balazadeh, S. (2011). Regulation of photosynthesis and transcription factor expression by leaf shading and re-illumination in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Plant Physiology*, *168*(12), 1311–1319. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.001>

Perrin, P. W. (1982). Poststorage effect of light, temperature and nutrient spray treatments on chlorophyll development. *Canadian Journal of Plant Science*, 62, 1023–1026.

Photosynthetically Active Radiation (PAR) Units. (2000). Recuperado el 11 de mayo de 2016 de <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=54636162d3df3e00698b4623&asKey=AS%3A273633266601989%401442250662257>

Pinela, J., Barreira, J. C. M., Barros, L., Antonio, A. L., Carvalho, A. M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Postharvest quality changes in fresh-cut watercress stored under conventional and inert gas-enriched modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.004>

R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria.

Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K., & Hörtensteiner, S. (2009). Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(3), 767–785. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064089>

Sharma, M., & Bhatt, D. (2015). The circadian clock and defence signalling in plants. *Molecular Plant Pathology*, 16(2), 210–218. <https://doi.org/10.1111/mpp.12178>

Silveira, A. C., Araneda, C., Hinojosa, A., & Escalona, V. H. (2014). Effect of non-conventional modified atmosphere packaging on fresh cut watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) quality. *Postharvest Biology and Technology*, 92, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.012>

Sobieszczuk-Nowicka, E., Kubala, S., Zmienko, A., Małecka, A., & Legocka, J. (2016). From Accumulation to Degradation: Reprogramming Polyamine Metabolism Facilitates Dark-Induced Senescence in Barley Leaf Cells. *Frontiers in Plant Science*, 6(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01198>

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant physiology*. California, EE. UU.: Sinauer.

The Arabidopsis Information Resource. (2016). Recuperado el 24 de marzo de 2016 de <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>

Thompson, J. E. (2007). Sistemas de almacenamiento. In A. A. Kader (Ed.), *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas* (3ra edición, pp. 131–148). Universidad de California. Centro de Investigación e Información en Tecnología Postcosecha.

Uzelac, B., Janosević, D., Simonović, A., Motyka, V., Dobrev, P. I., & Budimir, S. (2016). Characterization of natural leaf senescence in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown in vitro. *Protoplasma*, 253(2), 259–275. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0802-9>

Van Doorn, W. G. (2005). Plant programmed cell death and the point of no return. *Trends in Plant Science*, 10(10), 478–483. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.08.003>

Xie, Q., Michaeli, S., Peled-Zehavi, H., & Galili, G. (2015). Chloroplast degradation: One organelle, multiple degradation pathways. *Trends in Plant Science*, 20(5), 264–265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.013>

Yoshida, S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 79–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00009-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00009-2)

Zhan, L., Hu, J., Li, Y., & Pang, L. (2012). Combination of light exposure and low temperature in preserving quality and extending shelf-life of fresh-cut broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 72, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.05.001>

# 11. Anexos

## A.1 Formulación del medio de Hoagland

Se deben preparar soluciones stock de macro y micro nutrientes, así como una solución de Fe-EDTA. La composición de cada solución stock se muestra en los siguientes cuadros.

<b>Macronutrientes 10X</b>			
<b>Compuesto</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>Concentración (mM)</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
KNO <sub>3</sub>	101.1	6	6.066
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	236.2	4	9.448
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.03	1	1.15
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	246.5	2	0.493

<b>Micronutrientes 100X</b>			
<b>Compuesto</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>Concentración (mM)</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	197.91	0.009	0.178
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	0.046	0.2844
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	287.54	0.0008	0.023
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	249.68	0.0003	0.0749
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	179.98	0.0001	0.00179

La solución de Fe-EDTA debe prepararse a una concentración de 1 g/200 mL.

Para preparar 1 L de medio de Hoagland se toman y se mezclan los siguientes volúmenes de cada solución stock.

<b>Solución</b>	<b>Volumen (mL)</b>
Macronutrientes (10X)	100
Micronutrientes (100X)	10
Fe-EDTA	1

Finalmente, la mezcla se afora al volumen indicado y el pH de la solución se ajusta a un valor entre 5.2 y 5.5.