

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTADO DE CIENCIAS AGRARIAS**



Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Agrarias

**“Evaluación del rendimiento y de la senescencia poscosecha  
de brócoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) cultivado con  
adición de selenio”**

**Lic. en Biotecnología Betiana Trod**

Director de Tesis: Dr. Lucas Daurelio

Co-director de Tesis: Dr. Fernando Muñoz

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Vegetal (LIFiBVe)  
Instituto de Ciencias Agrarias del Litoral (UNL, CONICET, FCA)

**~ 2023 ~**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral (FCA-UNL) por permitirme enmarcar este trabajo dentro de la carrera de Doctorado en Ciencias Agrarias.*

*Al Instituto Instituto de Ciencias Agropecuarias del Litoral (ICiAgro Litoral) de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL) por brindarme el espacio físico, los equipos e instalaciones necesarias para el desarrollo de esta tesis.*

*Al Dr. Lucas Daurelio, por dirigir mi trabajo, por todas sus enseñanzas, por su estímulo y principalmente por brindarme su apoyo y confianza.*

*Al Dr. Fernando Muñoz, por codirigir mi trabajo en forma crítica.*

*A mis compañeras de Laboratorio, Melina, Laura y Pame por su ayuda en los experimentos de laboratorio y en las tareas de campo, por su apoyo en los momentos críticos y porque hicieron felices mis días de laboratorio.*

*A la Dra. María Dolores Pizarro por su esfuerzo y dedicación desinteresado.*

*A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Vegetal (LIFiBVe) por su compañerismo y buena predisposición para que mi estadía sea fructífera y agradable.*

*A mi Mamá porque es el sostén incondicional en todos los momentos de mi vida y llegué acá gracias a ella.*

*A Ezequiel y Emma, mi motor en la vida, por su amor infinito y su apoyo incondicional.*

*Mis más sinceros agradecimientos.*

## PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- Trod, B. S.,** Buttarelli, M. S., Stoffel, M. M., Céccoli, G., Olivella, L., Barengo, P. B., Llugany, M., Guevara, M. G., Muñoz, F. F., & Daurelio, L. D. (2023). Postharvest commercial quality improvement of broccoli (*Brassica oleracea* L.) after foliar biofortification with selenium. *Crop Science*, 63, 784-800.
- Muñoz, F. F., Stoffel, M. M., Céccoli, G., **Trod, B. S.,** Daurelio, L. D., Bouzo, C. A., & Guevara, M. G. (2021). Improving the foliar biofortification of broccoli with selenium without commercial quality losses. *Crop Science*, 61, 4218-4228.
- Trod, B. S.,** Barengo, P. B., Olivella, L., Bouzo, C. A., Muñoz, F. F., & Daurelio, L. D. (2022). Análisis del efecto fisiológico de la aplicación foliar de selenio en postcosecha de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). XXIV Congreso y XLII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Libro de Resúmenes, p. 150.
- Buttarelli, M., **Trod, B. S.,** Daurelio, L.D., Baroni, C., Bouzo, C.A., & Muñoz, F. F. (2021). Evaluación de la calidad nutricional de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) biofortificado con selenio durante la postcosecha. III Congreso Argentino de Biología y Tecnología Postcosecha. Libro de Resúmenes, p. 54.
- Trod, B. S.,** Bouzo, C. A., Daurelio, L. D., Guevara, M. G., & Muñoz, F. F. (2020). Influencia de la biofortificación con selenio sobre el contenido de clorofila durante la postcosecha de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). XII Congreso y la XXXX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Libro de Resúmenes, p. 48.
- Trod, B. S.,** Buttarelli, M., Gaido, J. D., Bouzo, C. A., Daurelio, L.D., & Muñoz, F. F. (2019). Estudio de efecto de la aplicación foliar de selenio en la vida post-cosecha de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). XXI Congreso y la XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Libro de Resúmenes, p. 54.

## **CONTENIDO**

LISTA DE FIGURAS.....	9
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	11
<b>RESUMEN / ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
RESUMEN.....	13
Palabras claves.....	13
ABSTRACT.....	14
Keywords.....	14
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>15</b>
1.1 ACERCA DE LA PLANTA DE BRÓCOLI .....	16
1.1.1 Origen y diseminación del cultivo .....	16
1.1.2. Clasificación taxonómica y morfología de la especie .....	16
1.1.3. Fenología y requerimientos del cultivo de brócoli.....	18
1.1.4. Valor nutricional.....	22
1.1.5. Importancia económica.....	24
1.1.6. Momento óptimo de cosecha.....	28
1.2. SENESCENCIA EN PLANTAS .....	29
1.2.1. Etapa de senescencia .....	29
1.2.2. Alteraciones metabólicas que ocurren durante la senescencia .....	29
1.2.3. Regulación hormonal de la senescencia .....	31
1.2.4. Senescencia poscosecha en brócoli.....	32
1.3. VIDA ÚTIL O VIDA POSCOSECHA DEL BRÓCOLI .....	33
1.4. TENDENCIAS EN LA CONSERVACIÓN POSCOSECHA DE BRÓCOLI.....	34
1.5. BIOFORTIFICACIÓN DE CULTIVOS .....	37
1.5.1. Estrategias de biofortificación.....	37
1.5.2. Biofortificación con Selenio.....	39
1.5.3. Rol del selenio en la poscosecha.....	42
1.6. HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....	43
1.7. OBJETIVOS DEL TRABAJO .....	44
1.7.1. Objetivo general.....	44
1.7.2. Objetivos específicos.....	44
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>45</b>



## **EFFECTO DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE SALES DE SELENIO EN BRÓCOLI SOBRE EL CRECIMIENTO, RENDIMIENTO Y ACUMULACIÓN DE SELENIO..... 45**

2.1. INTRODUCCIÓN .....	46
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	48
2.2.1. Obtención de plantas biofortificadas con selenio .....	48
2.2.1.1. Material vegetal.....	48
2.2.1.2. Condiciones de crecimiento de las plantas .....	48
2.2.2. Aplicación de tratamientos foliares.....	50
2.2.3. Determinación de parámetros de rendimiento.....	50
2.2.4. Mediciones de intercambio de gases y determinación del índice de clorofila .....	51
2.2.5. Medición del color superficial.....	51
2.2.6. Diámetro de la cabeza y firmeza.....	51
2.2.7. Cuantificación de selenio.....	52
2.2.8. Análisis estadístico.....	52
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
2.3.1. El selenio modifica el crecimiento y aumenta el rendimiento de manera diferencial en los cultivares de brócoli.....	53
2.3.2. Las respuestas de los parámetros fotosintéticos al tratamiento con selenio difieren según el cultivar de brócoli.....	56
2.3.3. La aplicación foliar de selenio no modifica la calidad comercial de las cabezas de brócoli al momento de la cosecha.....	60
2.3.4. La aplicación foliar de selenato o selenito aumenta notablemente el contenido de selenio de las cabezas y hojas de brócoli.....	62
2.4. CONCLUSIONES.....	65

## **CAPÍTULO 3..... 67**

### **EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE SELENIO SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD COMERCIAL EN LA VIDA POSCOSECHA DE BRÓCOLI ..... 67**

3.1. INTRODUCCIÓN .....	68
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	69
3.2.1. Obtención de plantas biofortificadas con selenio .....	69
3.2.1.1. Material vegetal.....	69
3.2.1.2. Condiciones de crecimiento vegetal .....	69
3.2.2. Aplicación de tratamientos foliares precosecha.....	70

3.2.3. Período de conservación poscosecha.....	71
3.2.4. Medición de la apariencia externa y el color superficial .....	71
3.2.5. Determinación del diámetro de la cabeza y firmeza .....	72
3.2.6. Análisis estadístico.....	72
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
3.3.1. Los tratamientos foliares con selenio mantienen la apariencia visual y el color externo de las cabezas de brócoli durante la poscosecha de brócoli.....	73
3.3.2. El tratamiento precosecha con selenio presenta mejoras en cuanto a la firmeza poscosecha de las cabezas de brócoli.....	77
3.3.3. La aplicación foliar de selenio contribuye a mantener el diámetro de las cabezas de brócoli en poscosecha. ....	79
3.3.4. La aplicación precosecha de selenio presentó mejoras en la conservación refrigerada de las cabezas de brócoli. ....	81
3.3.5. El análisis multivariado permite observar las mejoras debido a los tratamientos con selenio, en comparación con el grupo control, en todas las condiciones analizadas.....	84
3.4. CONCLUSIONES.....	87
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>88</b>
<b>EVALUACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE SELENIO EN LA POSCOSECHA DE BRÓCOLI.....</b>	<b>88</b>
4.1. INTRODUCCIÓN .....	89
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	91
4.2.1. Obtención de plantas biofortificadas con selenio .....	91
4.2.1.1. Material vegetal.....	91
4.2.1.2. Condiciones de crecimiento vegetal .....	91
4.2.2. Aplicación de tratamientos foliares precosecha.....	92
4.2.3. Período de conservación poscosecha.....	92
4.2.4. Determinación de la pérdida de peso.....	93
4.2.5. Determinación del contenido de clorofila y carotenoides.....	93
4.2.6. Determinación de la peroxidación de lípidos.....	93
4.2.7. Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	94
4.2.8. Determinación de daño de membranas: <i>Electrolyte Leakage</i> .....	94

4.2.9. Determinación de la producción de etileno, el ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como precursor del etileno y la producción de dióxido de carbono.....	95
4.2.10. Extracción de ARN para análisis de la expresión de genes.....	96
4.2.11. Búsqueda y diseño de oligonucleótidos.....	96
4.2.12. Análisis de los datos de secuenciación masiva de ARN.....	97
4.2.13. Análisis estadístico.....	98
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	98
4.3.1. La aplicación foliar de selenato o selenito aminoran la pérdida de peso de las cabezas de brócoli durante la poscosecha.....	98
4.3.2. La aplicación foliar de selenato o selenito aminora la degradación de clorofila y carotenoides de las cabezas de brócoli.....	100
4.3.3. La aplicación foliar de selenato o selenito produce cambios en la formación de peróxido de hidrógeno y en la peroxidación lipídica en las cabezas de brócoli.....	103
4.3.4. La aplicación foliar de selenato o selenito no induce mayores cambios en el mantenimiento de la membrana celular.....	107
4.3.5. La aplicación foliar de selenio reduce la formación del precursor del etileno en brócoli, la emisión del mismo y la respiración.....	108
4.3.6. Análisis preliminares de la expresión de genes para determinar el efecto de la aplicación de sales de selenio en diferentes vías.....	112
4.4. CONCLUSIONES.....	117
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>118</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>118</b>

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del brócoli <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	16
<b>Tabla 2.</b> Valor nutricional del brócoli por 100 g como es recomendado por USDA.	23
<b>Tabla 3.</b> Propiedades químicas del suelo (0 a 0,20 m de profundidad) en el sitio experimental antes del trasplante.	49
<b>Tabla 4.</b> Efecto de la aplicación foliar de selenio sobre parámetros de rendimiento de las cabezas de brócoli.	55
<b>Tabla 5.</b> Efecto de la aplicación foliar de selenio sobre la calidad comercial de las cabezas de brócoli al momento de cosecha.	61
<b>Tabla 6.</b> Efecto de la aspersión foliar de selenio sobre la concentración de selenio en las cabeza y en las hojas de brócoli.	63
<b>Tabla 7.</b> Efecto de la aplicación foliar de selenio en la firmeza (shore) de las pellas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	79
<b>Tabla 8.</b> Efecto de la aplicación foliar de selenio en diámetro de las pellas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha.	81
<b>Tabla 9.</b> Efecto de la aplicación foliar de selenio en la pérdida de peso (%) de las pellas de brócoli cv. 'Legend' durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	99
<b>Tabla 10.</b> Efecto de la aplicación foliar precosecha de selenio en el contenido de clorofila a y b en las cabezas de brócoli cv. 'Legend' durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	101
<b>Tabla 11.</b> Diseño de los oligonucleótidos para detectar las secuencias de los genes involucrados en la vía de síntesis de etileno. Se indica el nombre del gen, identificación de las secuencias (ID), longitud de los fragmentos amplificados (pb) y secuencias de oligos Left (L) y Righ (R).	114
<b>Tabla 12.</b> Diseño de los oligonucleótidos para detectar las secuencias de los genes involucrados en la vía del catabolismo de la clorofila.	115
<b>Tabla 13.</b> Diseño de los oligonucleótidos para detectar las secuencias de los genes involucrados en la vía de peroxidación de lípidos.	116

## LISTA DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Hortalizas más consumidas de la especie <i>Brassica oleracea</i> . <b>a.</b> <i>Brassica oleracea</i> salvaje. <b>b, c.</b> <i>Brassica oleracea</i> Grupo Acephala: col verde y berza. <b>d.</b> <i>Brassica oleracea</i> Grupo Gemmifera: col de Bruselas. <b>e.</b> <i>Brassica oleracea</i> Grupo Gongylodes: colirrábano. <b>f.</b> <i>Brassica oleracea</i> Grupo Alboglabra: kai-lan (brócoli chino). <b>g, h, i.</b> <i>Brassica oleracea</i> Grupo Capitata: repollo y col de Saboya o de Milán. <b>j.</b> <i>Brassica oleracea</i> Grupo <i>Italica</i> : brócoli. <b>k, l.</b> <i>Brassica oleracea</i> Grupo Botrytis: coliflor y romanesco.	17
<b>Figura 2.</b> Etapas fenológicas del cultivo de brócoli: a. Etapa semillero (Vo), b. Etapa juvenil (V1), c. Etapa de emergencia floral (R2), d. Etapa de formación de la cabeza (R3).	20
<b>Figura 3.</b> Compuestos bioactivos en plantas de brócoli.	24
<b>Figura 4.</b> Esquema de la inflorescencia del brócoli. Se observan los pedúnculos de distinto orden y los floretes. Los “floretes” son conjuntos de yemas sostenidos por un mismo pedúnculo.	26
<b>Figura 5.</b> Esquema de la asimilación del Se en las plantas. 1: ATP sulfurilasa; 2: APS reductasa; 3: Sulfito reductasa; 4: Complejo cisteína sintasa (SAT-OAS-TL); 5: Cistationina sintasa; 6: Metionina sintasa; 7: Metiltransferasa.	42
<b>Figura 6.</b> Efectos de los tratamientos con selenio en ambos cultivares de brócoli sobre el peso seco de la planta (A), el área foliar (B) y la altura de la planta (C).	54
<b>Figura 7.</b> Efectos de la aplicación foliar de selenio en la tasa fotosintética neta de la hoja (A, B), la tasa de transpiración unitaria (C, D), y la eficiencia en el uso del agua (E, F) de brócoli cv. 'Belstar' (A, C, E) and cv. 'Legend' (B, D, F).	58
<b>Figura 8.</b> Efectos de la aplicación foliar de selenio sobre el índice de verdor foliar (SPAD) de brócoli cultivares 'Belstar' y 'Legend'.	59
<b>Figura 9.</b> Imágenes que indican la metodología utilizada para la medición de la firmeza.	72
<b>Figura 10.</b> Efecto de los tratamientos con selenio en el aspecto visual externo de las cabezas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C en oscuridad durante 6 días.	74
<b>Figura 11.</b> Efecto de la aplicación foliar de selenio en los valores de Hue (°h) de las cabezas de brócoli c.v 'Belstar' (a, b) y c.v 'Legend' (c, d) durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	75

<b>Figura 12.</b> Efecto de la aplicación foliar de selenio en los valores de luminosidad (L) de las cabezas de brócoli cv. 'Belstar' (a, b) y cv. 'Legend' (c, d) durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	76
<b>Figura 13.</b> Efectos de la aplicación foliar de selenio sobre los parámetros de calidad comercial (diámetro, Hue (°h), firmeza y luminosidad) de las cabezas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha a 4 °C.	83
<b>Figura 14.</b> Análisis de componentes principales en dos cultivares de brócoli cultivados con aplicación foliar de selenio.	85
<b>Figura 15.</b> Efectos de la aplicación foliar de selenio en el contenido de clorofila total (A) y en el contenido de carotenoides (B) de las cabezas de brócoli cv. 'Legend', durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	102
<b>Figura 16.</b> Efectos de la aplicación foliar de selenio en el contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (A), contenido de MDA (B) y contenido de aldehídos (C) de las cabezas de brócoli cv. 'Legend', durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	106
<b>Figura 17.</b> Pérdida de electrolitos (%) de las cabezas de brócoli tratadas con selenio, durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	107
<b>Figura 18.</b> Contenido de ACC (ng g <sup>-1</sup> PS) en las cabezas de brócoli cv. 'Legend' tratadas con selenio.	109
<b>Figura 19.</b> Efectos de la aplicación foliar de selenio en la emisión de etileno de las cabezas de brócoli cv. 'Legend', durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	110
<b>Figura 20.</b> Efectos de la aplicación foliar de selenio en la respiración de las cabezas de brócoli cv. 'Legend', durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.	112
<b>Figura 21.</b> Electroforesis en gel de agarosa de ARN total aislado de las cabezas de brócoli. Visualización de tres bandas de ARN intactas para 28 S ARN (a), 18 S ARN (b) y 5 S ARN (c).	113
<b>Figura 22.</b> Gráfico de Volcano donde se pueden observar como puntos de diferentes colores los ensamblados de lecturas o transcritos de brócoli según el análisis estadístico de las muestras tratadas con selenio y control.	117

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**ACP:** análisis de componentes principales

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNasa:** nucleasa

**ADNc:** ADN complementario

**APS:** adenosina 5'-fosfosulfato

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** adenosín trifosfato

**Buffer:** solución amortiguadora

**cv:** cultivar

**DEPC:** pirocarbonato de dietilo

**dNTPs:** desoxinucleósidos 5'-trifosfato

**dpc:** días poscosecha

**EDTA:** ácido etilendiamintetracético

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

**°C:** Grados Celsius

**g:** gramos

**GLS:** glucosinolatos

**h:** hora

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** Peróxido de hidrógeno

**ha:** hectárea

**Kcal:** Kilo calorías

**Kg:** kilogramos

**KJ:** Kilo Joules

**L:** litro

**m:** metro

**MDA:** Malondialdehido

**min:** minutos

**ml:** mili litro

**mM:** mili Molar

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

**nm:** nanómetros

**nmol:** nano mol

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

**%:** Porcentaje

**ppm:** partes por millón

**Primers:** cebadores

**PUFAs:** ácidos grasos poliinsaturados

**RNA-Seq:** secuenciación de moléculas de ARN

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

**S<sup>-2</sup>:** Sulfuro

**SAT-OAS-TL:** complejo cisteína sintasa

**Se<sup>-2</sup>:** Seleniuro

**SeO<sub>3</sub><sup>-2</sup>:** Selenito

**SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup>:** Selenato

**SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>:** Sulfito

**SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>:** Sulfato

**TBA:** ácido tiobarbitúrico

**TBARs:** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

**TCA:** ácido tricloroacético

**Tn:** Toneladas

**uL:** micro litros

**1-MCP:** 1-metilciclopropeno

**UV:** radiación ultravioleta

## **RESUMEN / ABSTRACT**

---



## RESUMEN

El brócoli, *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck, es un vegetal popular en varias partes del mundo, debido a su gran valor nutricional. Las partes comestibles del brócoli son las inflorescencias, que se cosechan mientras las cabezas florales están totalmente inmaduras. Este corte genera cambios metabólicos que aceleran el proceso de deterioro poscosecha hasta el consumo. Además, es uno de los grandes acumuladores de selenio, micronutriente crucial para la salud y el desarrollo humano.

En base a esto se planteó como objetivo general del plan de tesis evaluar el efecto de la aplicación foliar precosecha de selenio sobre la producción y senescencia poscosecha de brócoli, buscando generar un incremento del contenido de selenio, sin afectar o mejorando la producción y retrasando la senescencia poscosecha en las inflorescencias. Las aplicaciones fueron realizadas de manera foliar, abarcando dos tipos de sales de selenio y a dos concentraciones cada una de ellas.

Los resultados obtenidos al momento de la cosecha mostraron que los parámetros de rendimiento no fueron influenciados, o mejoraron y se pudo obtener una mayor asimilación de selenio. Cuando se analizó el período de almacenamiento poscosecha, después de dos condiciones de crecimiento y dos temperaturas de conservación diferentes (4 y 20 °C), pudo observarse que varios de los parámetros analizados presentaron mejoras. Finalmente, pudo observarse que los tratamientos con selenio producen mejoras en varios parámetros fisiológicos, incluido una menor emisión de etileno.

Considerando todos los resultados expuestos, este nuevo protocolo de aplicación de selenio es una tecnología prometedora que podría beneficiar la producción de cultivares de brócoli y permitirá tener un producto enriquecido, apto para el consumo humano y con mejor vida útil en el mercado.

## Palabras claves

brócoli, *Brassica oleracea* L. var. *italica*, selenio, aplicación foliar precosecha, biofortificación, poscosecha.

## **ABSTRACT**

Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) stands out because of its elevated nutritional quality. The comestible part of broccoli are the inflorescences, for which harvest is a harmful process, with a high impact on their commercial value.

In order to preserve commercial and nutritional quality during the postharvest life of broccoli, several works were reported. On the other hand, the influence of preharvest conditions has been little analysed to date. Also, broccoli have a strong selenium (Se) intake and enrichment capacity, that gives them a nutraceutical plus. In the present study, we evaluated the effect of foliar application of different mineral forms of selenium on yield and postharvest. The treatment presented improvements in harvest aspects and selenium content of the heads increased markedly in a dose-dependent manner in both cultivars, with both selenium treatments. Then, these preharvest treatments showed a better postharvest shelf-life of broccoli, improving the quality of heads during postharvest.

Finally, a diminution of several parameters related to senescence were observed and, as a most noticeable result, a decrease in the emission of ethylene and in respiration. So, we can conclude that foliar selenium treatment, besides being an overcoming strategy to obtain selenium-enriched broccoli, also contributes to improving the quality of heads during postharvest.

## **Keywords**

broccoli, *Brassica oleracea* L. var. *italica*, selenium, preharvest foliar application, biofortification, postharvest.

## **CAPÍTULO 1**

---

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1.1 ACERCA DE LA PLANTA DE BRÓCOLI

### 1.1.1 Origen y diseminación del cultivo

El brócoli, *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck, se originó por el cultivo y domesticación de la especie *Brassica oleracea* L. en la región del Mediterráneo. El término brócoli, deriva de la palabra italiana “broccolo” que hace referencia a la inflorescencia inmadura de cualquier miembro de la familia Brassicaceae (Das & Ghosh, 2021). Su cultivo se remonta a la época de los etruscos, una antigua civilización italiana localizada en lo que hoy es la región de la Toscana, y conocida porque sus habitantes fueron grandes horticultores. En el siglo XVIII se introdujo en Inglaterra donde comenzó a ser llamado “el espárrago italiano” y en pocos años se convirtió en uno de sus alimentos preferidos (Das & Ghosh, 2021). En las primeras décadas del siglo XX y como consecuencia de la inmigración italiana a Estados Unidos, el brócoli ingresó a América (Das & Ghosh, 2021) pero recién adquiere fama internacional después de la segunda guerra mundial, cuando entra al mercado el cultivar “Walthman 29”, primer cultivar comercial de polinización abierta (Stansell & Björkman, 2020).

### 1.1.2. Clasificación taxonómica y morfología de la especie

El brócoli o brécol como se lo denomina comúnmente, pertenece a la familia *Brasicáceas* la cual incluye entre otros a los repollos, coliflores, repollitos de Bruselas, rabanitos y rúcula, siendo su nombre científico *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del brócoli. Fuente: *Brassica oleracea* Lour., 1790 en GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-01-31.

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
Filo	Traqueofita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	Brasicáceas
Género	<i>Brassica</i> L.
Especie	<i>Brassica oleracea</i> Lour., 1790
Nombre científico: <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck.	
Nombre común: Brócoli, brécol.	

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



**Figura 1.** Hortalizas más consumidas de la especie *Brassica oleracea*. **a.** *Brassica oleracea* salvaje. **b, c.** *Brassica oleracea* Grupo Acephala: col verde y berza. **d.** *Brassica oleracea* Grupo Gemmifera: col de Bruselas. **e.** *Brassica oleracea* Grupo Gongylodes: colirrábano. **f.** *Brassica oleracea* Grupo Alboglabra: kai-lan (brócoli chino). **g, h, i.** *Brassica oleracea* Grupo Capitata: repollo y col de Saboya o de Milán. **j.** *Brassica oleracea* Grupo Italica: brócoli. **k, l.** *Brassica oleracea* Grupo Botrytis: coliflor y romanesco.

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

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

El brócoli es una planta anual, de hábito de crecimiento erecto, con una altura de 60 a 90 cm, que necesita un periodo de vernalización o de baja temperatura para emitir el vástago floral. Presenta un sistema radical pivotante leñoso, que alcanza hasta 80 cm de profundidad en el perfil del suelo. Las raíces secundarias, terciarias y raicillas se concentran mayoritariamente en los primeros 40 a 60 cm de profundidad (Krarup, 1992). Desarrolla un tallo principal relativamente grueso, de diámetro entre 2 a 6 cm y de 20 a 50 cm de longitud, constituyéndose en un tallo muy corto con nudos y entrenudos casi juntos, formando una roseta de hojas, denominado acaule (Rueda, 2001). El tallo termina en una inflorescencia principal, excepto por algunas inflorescencias secundarias en los nudos superiores, no presenta ramificaciones.

Las hojas de esta especie son grandes (pudiendo alcanzar hasta más de 50 cm de longitud y 30 cm de ancho), glabras, presentan nervaduras centrales muy notorias y las mismas varían en número de 15 a 30, según el cultivar. Suelen tener el limbo de color verde oscuro, son rizadas, festoneadas, con ligerísimas espículas, alternas o en roseta, simples o divididas, pecioladas, sin estípulas; con dimorfismo foliar, formadas por foliolos. Se extienden de forma horizontal y abierta dejando al descubierto la futura pella. La superficie foliar está recubierta por ceras epicuticulares que dificultan el ingreso del agua y causan su escurrimiento otorgándoles el color verde azulado opaco común en la especie (Krarup, 1992).

Las flores son amarillas, de simetría actinomorfa y ordenación cíclica (verticilada). El cáliz está formado por cuatro sépalos dialisépalos. La corola es cruciforme, en forma de cruz, de ahí el antiguo nombre de la familia, Cruciferae, y está formado por cuatro pétalos, dialipétalos, amarillos. La inflorescencia se conforma de primordios florales o flores inmaduras, dispuestas en un corimbo principal en el extremo superior del tallo o en ramificaciones de las yemas auxiliares. La inflorescencia es de polinización alógama, y el fruto comprende una silicua, la cual contiene, generalmente, más de diez semillas en su interior las cuales al momento de su madurez (dehiscencia) son liberadas al ambiente. Las semillas son redondas, de color pardo oscuro a rojizo y de tamaño pequeño, cerca de 2 mm de diámetro (Krarup, 1992).

### **1.1.3. Fenología y requerimientos del cultivo de brócoli**

Los estudios fenológicos coinciden en observar básicamente dos fases: fase vegetativa y fase reproductiva, diferenciadas por el momento de la aparición floral, donde se tiene en cuenta la duración de la cosecha. La fase vegetativa se caracteriza por el incremento en

el número de hojas y el engrosamiento del tallo, mientras que la fase reproductiva, por el crecimiento y desarrollo de la cabeza, desde la formación de la inflorescencia hasta la cosecha misma. Estas fases a su vez se subdividen en varias etapas: fase vegetativa que incluye la etapa de semillero y la etapa juvenil, y la fase reproductiva que incluye la etapa de emergencia floral y formación de la inflorescencia (Jaramillo et al., 2005).

*Etapas semillero (Vo):* esta etapa tiene una duración de 30 días; comienza con la germinación de la semilla hasta cuando la plántula, tiene entre tres y cuatro hojas bien formadas y una altura entre 10-12 cm y está lista para el trasplante a campo (Figura 2a).

*Etapas juvenil (V1):* esta etapa se inicia con el trasplante a campo, cuando las plántulas tienen cuatro hojas y finaliza con la visualización de la estructura o primordio floral. Tiene una duración aproximada de 40 días. En este estado la planta tiene una edad total de 70 días (Figura 2b). En esta etapa del crecimiento, la altura, diámetro del tallo, biomasa, número de hojas y área foliar presentan incremento exponencial. El tallo se engrosa y alarga hasta alcanzar un máximo desarrollo; también presenta una gran proliferación de hojas, y las senescentes son escasas en este periodo. El cierre del dosel ocurre al final de esta etapa hacia los 35 días después del trasplante, lo cual muestra el desarrollo acelerado de las hojas y su exposición para la captación de la radiación.

*Etapas de emergencia floral (R2):* la aparición floral ocurre entre los 40-45 días después del trasplante, cuando las plantas tienen entre 18 a 20 hojas. A partir de este momento, se inicia un crecimiento lineal para la planta, donde se prioriza el desarrollo de la cabeza (Figura 2c), como lo confirman la disminución de la tasa de emisión foliar, la tasa de evolución de la superficie foliar y la tasa de crecimiento del tallo.

*Etapas de formación de la cabeza (R3):* durante esta etapa ocurre el crecimiento de la inflorescencia hasta la cosecha, cuando aún no han abierto las flores. Tiene una duración de 20 a 25 días. La inflorescencia presenta un crecimiento exponencial en diámetro y biomasa, caracterizado por un periodo de crecimiento «lento», desde su aparición hasta los 55 días después del trasplante aproximadamente, seguido de un periodo más rápido, que se extiende hasta la cosecha, la cual se inicia a partir de los 60 y 65 días después del trasplante. En esta etapa se da la traslocación de fotoasimilados hacia la inflorescencia; el diámetro del tallo se incrementa lentamente, la altura de la planta presenta un segundo pico en su crecimiento, por el aumento en el tamaño de la cabeza (Figura 2d).



**Figura 2.** Etapas fenológicas del cultivo de brócoli: a. Etapa semillero (Vo), b. Etapa juvenil (V1), c. Etapa de emergencia floral (R2), d. Etapa de formación de la cabeza (R3). Adaptado de Jaramillo et al. (2005).

Algunos autores definen que la duración del período juvenil varía según los cultivares, pudiendo extenderse de 5 a 8 semanas en variedades de otoño hasta 10 a 15 semanas en variedades de verano (Di Benedetto, 2005). Sin embargo, la duración de la fase juvenil es muy poco predecible, no existiendo relaciones cuantitativas que puedan definir la culminación de la misma, debido a ello se han desarrollado múltiples modelos de tiempo térmico que intentan predecir el final de esta fase y el comienzo de la iniciación floral (Tan, 1999).

El brócoli es un cultivo de estación fría que posee ciertos requerimientos climáticos para producir una pella de calidad comercial (Das & Ghosh, 2021). Las temperaturas óptimas están entre 20 a 25 °C para la fase de crecimiento vegetativo y entre 12 a 18 °C para la fase de formación de la pella. La inducción se produce por acumulación de horas de frío en un proceso llamado vernalización. El umbral de temperatura vernalizante en brócoli es mayor que en otras brásicas y depende del cultivar, “Medium late 145” requiere temperaturas menores a 10 °C, “Walthman 29” se mantiene en estado vegetativo a temperaturas de 24/27 °C día/noche, mientras que “Coastal” puede formar cabezas aun estando a temperatura constante de 27 °C. En la mayoría de los cultivares la inducción a floración no se produce cuando la temperatura media supera los 27 °C o las temperaturas



día/noche superan los 30/25 °C respectivamente. La producción de cabezas de calidad se logra en regiones con temperatura media por debajo de 23 °C, temperaturas mayores durante la formación de la pella pueden provocar una apertura prematura de las yemas perdiendo calidad comercial. Por el contrario, las bajas temperaturas no tienen impacto sobre la calidad visual del brócoli y solo producen un retardo en el crecimiento. Para una misma variedad, cuando el cultivo se realiza en ciclos primaverales o de principios de otoño, en los que el desarrollo de las plantas no se ve limitado por la temperatura e iluminación, el tamaño de la inflorescencia suele ser mayor que en los ciclos invernales donde las plantas tienen menor desarrollo antes de comenzar la floración. Las altas temperaturas en el inicio de la formación de la cabeza pueden provocar anomalías y muerte de yemas en algunos sectores de los floretes, lo que se manifiesta a través de manchas marrones en las pellas maduras. Las temperaturas que ocurren durante el crecimiento de la pella también afectan el contenido de compuestos saludables, dado que se observó que temperaturas de 21/15 °C (día/noche) y fotoperiodos de 12 horas las pellas tenían mayor contenido de glucosinolatos alifáticos, quercetinas y kaempferol que a 15/9 °C, aunque el contenido de vitamina C en estas condiciones fue menor (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

En referencia a la luminosidad, para su óptimo desarrollo, el cultivo de brócoli requiere de un fotoperiodo entre 11 a 13 horas luz, siendo una hortaliza de día corto, las cuales requieren menos de 14 horas luz al día (Sakata, 2011). Un exceso de luz durante la formación de la pella produce un cambio de coloración o un florecimiento descontrolado, mientras que una deficiencia influye desfavorablemente en la calidad de las mismas (Bolea, 2002).

Con respecto al suelo; se desarrolla bien en cualquier tipo de suelo, prefiriendo los francos a franco-arenosos, fértiles, con buen contenido de materia orgánica, profundos, con buen drenaje y buena retención de humedad, y pH entre 5,7 y 6,8. Son plantas exigentes en nitrógeno, potasio, azufre, boro y molibdeno, y son medianamente tolerantes a la salinidad. Las extracciones de los nutrimentos son variables en función del cultivar y de las condiciones climáticas y edáficas, con diferentes rendimientos (Jaramillo et al., 2005). En general es importante que el suelo sea profundo, que retenga humedad y que presente un importante contenido de materia orgánica (Gordon, 2010).

En referencia al agua; es necesario asegurar un abundante suministro de agua, sobre todo durante la fase de germinación, desarrollo de plántula, al momento del trasplante y durante la etapa de formación de cabeza. En épocas secas, se hace necesario un riego por

semana. Pero este dependerá del tipo de suelo, de su capacidad de retención de humedad y de su tasa infiltración. Aunque es conveniente llevar los registros de precipitación y evaporación para definir acertadamente las necesidades de riego, hay necesidad de determinar cantidad de agua y frecuencia de riego. El máximo crecimiento y rendimiento se logra sólo cuando se provee a la planta de una buena cantidad de agua a lo largo del ciclo productivo, recordando que la etapa fenológica de mayor demanda de agua es la época de formación de la cabeza; un déficit en esta etapa ocasionará reducciones en los rendimientos. Se debe disponer de agua para riego en las épocas secas; agua de alta calidad, libre de contaminantes biológicos y químicos (Jaramillo et al., 2005).

#### **1.1.4. Valor nutricional**

El brócoli fresco se ha convertido, en un vegetal popular en varias partes del mundo debido a su gran valor nutricional, bajo poder calórico, alto contenido de fibra, importantes niveles de ácido ascórbico, vitaminas y minerales y por su amplio rango de compuestos anticancerígenos y antioxidantes.

El valor nutricional del brócoli lo ha llevado a situarse entre los 20 mejores alimentos en la escala de ANDI (Aggregate Nutrient Density Index) que mide el contenido de vitaminas, minerales y fitonutrientes en relación con las calorías aportadas por los alimentos (AgMRC, 2021).

El brócoli fresco contiene casi un 90 % de agua, 7 % de carbohidratos, 3 % de proteínas y niveles muy bajos de grasas (Tabla 2). El contenido total de carbohidratos es muy bajo, siendo los principales constituyentes los azúcares y las fibras dietéticas. Los azúcares más importantes son fructosa, glucosa, sacarosa, y en pequeñas cantidades se detectan lactosa y maltosa. El brócoli es un vegetal sin grasa, que contiene ácidos grasos saturados totales 0,079 g 100 g<sup>-1</sup>), ácidos grasos monoinsaturados (0,040 g 100 g<sup>-1</sup>), y ácidos grasos poliinsaturados (0,170 g 100 g<sup>-1</sup>) en trazas y sin colesterol en absoluto. El brócoli es muy bajo en calorías, proporcionando sólo 35 Kcal por cada 100 g de brócoli fresco (Das & Ghosh, 2021).

**Tabla 2.** Valor nutricional del brócoli por 100 g o 3,5 oz como es recomendado por USDA. Adaptado de Das y Ghosh (2021).

<b>BROCÓLI</b>			
<b>Fitoquímicos</b>	<i>Valores 100 g</i>	<b>Fitoquímicos</b>	<i>Valores 100 g</i>
<i>Energía</i>	35,00 Kcal	<i>Vitaminas</i>	
<i>Agua</i>	89,25 g	<i>Vitamina C</i>	64,9 mg
<i>Proteínas</i>	2,38 g	<i>Tiamina</i>	0,063 mg
<i>Lípidos</i>	0,41 g	<i>Riboflavina</i>	0,123 mg
<i>Carbohidratos</i>	7,18 g	<i>Niacina</i>	0,553 mg
<i>Fibras</i>	3,30 g	<i>Vitamina B6</i>	0,200 mg
<i>Azúcares</i>	1,39 g	<i>Folato</i>	108 ug
<i>Minerales</i>		<i>Vitamina B12</i>	0,00 ug
<i>Calcio</i>	40,00 mg	<i>Vitamina A</i>	77 ug
<i>Hierro</i>	0,67 mg	<i>Vitamina A</i>	1548 IU
<i>Magnesio</i>	2,00 mg	<i>Vitamina E</i>	1,45 mg
<i>Fósforo</i>	67,00 mg	<i>Vitamina C</i>	64,9 mg
<i>Potasio</i>	293,00 mg	<i>Tiamina</i>	0,063 mg
<i>Sodio</i>	41,00 mg	<i>Riboflavina</i>	0,123 mg
<i>Zinc</i>	0,45 mg	<i>Niacina</i>	0,553 mg

Sin embargo, el brócoli contiene todos los minerales esenciales y vitaminas en cantidades suficientes. Una taza de brócoli fresco picado contiene alrededor de 43 miligramos (mg) de calcio (4,3 % del valor diario recomendado, o VD), 288 mg de potasio (6,1 % VD), 81 mg de vitamina C (90 % VD para hombres y más del 100 % VD para mujeres), 92 microgramos de vitamina K (115 % VD), y 567 unidades internacionales de vitamina A (alrededor del 11 % VD). También una pequeña cantidad de otras vitaminas, incluyendo tiamina, riboflavina, ácido fólico, vitamina E, y la vitamina B6. Además, el brócoli es una rica fuente de algunos antioxidantes que puede ayudar a prevenir la toxicidad de los radicales libres o reactivos oxígeno durante procesos naturales como el metabolismo y tensiones ambientales (Das & Ghosh, 2021).

Por otro lado, la popularidad de esta hortaliza se debe a los potenciales efectos benéficos sobre la salud producidos por el alto contenido de glucosinolatos (GLS), compuestos del metabolismo secundario con S y N en su estructura y, en consecuencia, de isotiocianatos (ITC), ya que estos últimos son el producto bioactivo obtenido a partir de la hidrólisis de los GLS (Figura 3). Entre los GLS presentes en brócoli se destacan, por su concentración, la glucorafanina y la glucobrasicina y los ITC derivados el sulforafano y el indol-3-

carbinol. Los ITC tienen actividad biológica benéfica disminuyendo o evitando el estrés oxidativo en células por lo que podrían reducir el riesgo de contraer distintos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas. Estos compuestos se producen en las plantas como un mecanismo de defensa contra insectos y patógenos ya que en altas concentraciones les producen un estrés metabólico que termina dañando su crecimiento. Los glucosinolatos se encuentran localizados en vacuolas y ante un daño en la planta (rotura de los tejidos a causa de daños por insectos o por el procesamiento para el consumo), son liberados y se ponen en contacto con enzimas localizada en el citoplasma *B*-glucosidasas, especialmente mirosinasas, produciendo ITC a una concentración que resulta tóxica para herbívoros y patógenos, pero con acción benéfica en la salud humana.

El brócoli también contiene compuestos fenólicos como flavonoides, antocianos y ácidos hidroxycinámicos, cuya principal actividad biológica es su capacidad antioxidante (Cuesta & Fusari Gómez, 2022) (Figura 3).



**Figura 3.** Compuestos bioactivos en plantas de brócoli. Adaptado de Cuesta y Fusari Gómez (2022).

### 1.1.5. Importancia económica

#### Producción mundial de brócoli y mercados

Las estadísticas sobre producción mundial de hortalizas realizan sus análisis de mercado agrupando productos similares, en el caso del brócoli, las mediciones incluyen también a coliflor. El mercado internacional de coliflor y brócoli creció a una tasa del 4,6 % entre

2013 y 2019 y se espera que continúe a una tasa del 4,2 % entre 2022 y 2027 (Cuesta y Fusari Gómez, 2022). El rendimiento medio mundial es de 19 Tn ha<sup>-1</sup> y se ha mantenido estable en los últimos años (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

A nivel mundial, los países con mayor producción son China (11 M de Tn), India (9,2 M de Tn) y Estados Unidos (1,2 M de Tn), quienes concentran el 78 % de la producción. España y México en conjunto aportan un 5,6 %, y concentran el 51 % de las exportaciones.

En América, la reducción gradual de la superficie cultivada en Estados Unidos, como consecuencia del alto costo de la mano de obra, estimuló el crecimiento de México como productor y exportador. El bajo costo de la mano de obra y la cercanía a los mercados de consumo posicionaron a este último como el principal proveedor de brócoli de Estados Unidos y Canadá (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

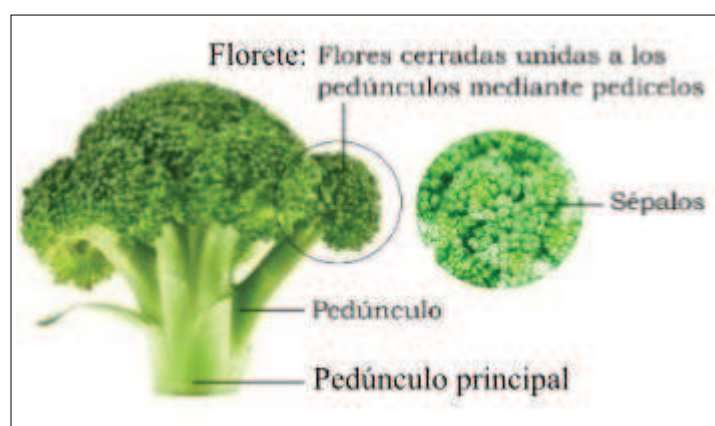
En Argentina, el brócoli no es una hortaliza de consumo tradicional, aunque su demanda tiene un crecimiento constante desde hace diez años. Las variables son muchas, pero los productores coinciden en que se trata de modas y que las recomendaciones por parte de chefs famosos argentinos es uno de los motivos que impulsa a las personas a elegir esta hortaliza. El mayor volumen que llega al Mercado Central de Buenos Aires proviene del cinturón verde de Buenos Aires donde representa una alternativa para la diversificación productiva, no obstante, su rentabilidad está ligada a la posibilidad de obtener rendimientos mayores a las 15 Tn ha<sup>-1</sup> debido al fuerte impacto de los costos fijos del cultivo. El 60 % de la superficie cultivada con brócoli se encuentra en Buenos Aires, le siguen en importancia Santa Fe y Córdoba con un 15 % cada una. En San Juan y en Mendoza los cultivos de brócoli se destinan principalmente a la industria del congelado y se comercializan en el país o se exportan a Estados Unidos y Canadá. San Juan también realiza exportaciones de brócoli orgánico a la Unión Europea y el Reino Unido (Cuesta & Fusari Gómez, 2022). La provincia de Santa Fe participa con el 8 % de la superficie nacional cultivada de hortalizas y, según el censo Hortícola 2012, realizado por la Agencia de Extensión Rural INTA Monte Vera, el 39 % de los productores del Cinturón Hortícola de la ciudad de Santa Fe (situado en el departamento La Capital) posee al brócoli dentro de su cartera de productos (Teran et al., 2013).

La continua difusión de noticias y de resultados de investigaciones que relacionan la ingesta regular de brócoli con beneficios para la salud humana está promoviendo un mayor consumo de esta hortaliza y, consecuentemente, de su producción (Mukherjee et al., 2008). Por ejemplo, en el Cinturón Hortícola de la ciudad de Santa Fe, la superficie

destinada a brócoli fue incrementada de 2 ha en el año 1978 a 42 ha en el año 2012 arrojando una producción de aproximadamente 1000 toneladas anuales destinadas en su mayoría al mercado fresco, si bien todo parece indicar que el sector hortícola requiere de tecnologías para incrementar la calidad de su producción de manera creciente (Teran et al., 2013).

#### Formas de comercialización

El órgano de consumo o parte comestible del brócoli es la inflorescencia junto con el raquis y las partes tiernas de la sección superior del tallo. La inflorescencia principal, “cabeza” o “pella”, se forma en el extremo de un tallo no ramificado y se compone de yemas florales diferenciadas, pero todavía inmaduras, sostenidas por un pedúnculo grueso y muy ramificado (Welbaun, 2015). Se denomina florete al conjunto de flores individuales que se insertan mediante un pedúnculo común al tallo principal de la inflorescencia (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de la inflorescencia del brócoli. Se observan los pedúnculos de distinto orden y los floretes. Los “floretes” son conjuntos de yemas sostenidos por un mismo pedúnculo. Adaptado de Cuesta y Fusari Gómez (2022).

El brócoli es un producto que se puede comercializar en fresco o procesado. Para venta en fresco se comercializan las “cabezas” enteras o cortadas (floretes), en algunos casos acondicionadas en bolsas de polietileno o cubiertas con film de polietileno (Welbaum, 2015).

El creciente mercado de productos cuarta gama, donde el brócoli se presenta en floretes seleccionados o preparado en ensalada lista para consumir, ha permitido expandir el mercado aportando valor agregado al productor y conveniencia al consumidor. Otra

forma de consumo con demanda creciente son los germinados de brócoli, tal es así que este producto representa el 18 % de las exportaciones desde México a Estados Unidos (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

Cuando se destina a industria, lo más frecuente es el brócoli congelado, ya sea en floretes, o en trozos y en menor proporción deshidratado para la elaboración de comidas listas para preparar (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

#### *Demanda, consumo per cápita:*

La preferencia por esta hortaliza varía con el país de origen, la edad y el nivel socio cultural de los consumidores. La mayor demanda de brócoli se encuentra en los Países Bajos y en Inglaterra, y entre ciertos grupos étnicos como los asiáticos siendo uno de los principales componentes del “yan-tsai-shim”, comida tradicional de Taiwán elaborada con brócoli fermentado y de otros platos de Malasia quienes demandan en especial brócoli orgánico. En Estados Unidos, el mayor consumo se produce en personas mayores de 60 años, aunque se ha observado un aumento del 12 % en jóvenes entre 18 a 29 años. Para la mayoría de los consumidores el color y la textura son atributos importantes en la decisión de compra, mientras que la ausencia de pesticidas lo es entre los compradores más jóvenes y con mayor nivel educativo.

En Alemania, el 88 % de los encuestados de un total de mil personas indicó que consume brócoli al menos una vez al mes y el 41 % lo hace semanalmente. Los compradores prefieren pellas turgentes y firmes con tallos delgados, la presencia de yemas amarillas o marrones es causa para rechazar el producto. En Argentina hay una demanda creciente en la población de altos ingresos que se atribuye a la mayor conciencia sobre la salud y a la mejora del nivel de vida de los consumidores. Además, la tendencia hacia el vegetarianismo y veganismo y la necesidad de reducir la ingesta de hidratos de carbono han contribuido a expandir el mercado. Acompañando a la demanda, el precio de estos productos también muestra una tendencia creciente (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

En el año 2019, el mayor consumo *per cápita* se registró en China (7,45 kg), India (6,68 kg) y México (3,81 kg), en Estados Unidos el consumo de brócoli fresco aumentó de 0,6 a 3,23 kg por persona entre 1980 y 2017 mientras el brócoli congelado pasó de 0,68 a 1,18 kg por persona en el mismo periodo. En ese país, con una tasa de crecimiento anual de 3,6 %, el brócoli es la 6<sup>ta</sup> hortaliza más popular (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

### **1.1.6. Momento óptimo de cosecha**

Para el consumo de brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras. Las inflorescencias deben ser de forma regular, sin deformaciones ni huecos en el tallo, estar suficientemente compactadas, con botones florales uniformemente cerrados, de pequeño calibre, de color verde, verde grisáceo o verde azulado brillante y sin mostrar amarilleos, amarronamiento, bracteación, etc (Maroto, 1997).

El período de cosecha es crítico. Es importante que la recolección sea en el momento oportuno, ya que el periodo ideal de cosecha de las inflorescencias con condiciones óptimas de calidad es muy breve (alrededor dos días), principalmente en épocas secas con altas temperaturas. La recolección debe efectuarse una vez que las cabezas están formadas, con la inflorescencia prieta, cuando ha desarrollado el tamaño máximo, sin llegar a mostrar abertura floral o sobremaduración (Pomares García et al., 2007c). Si se cosecha demasiado pronto, la pella pesa poco y la producción baja. Cuando la recolección es tardía, los granos o yemas florales se abren mostrando pétalos de color amarillo y se aflojan las cabezas; pierden color, compacidad, aumenta la fibrosidad del tallo o pedicelo, perdiendo de esta manera calidad comercial complicando el manejo postcosecha (Jaramillo et al., 2005).

La cosecha de esta hortaliza se realiza de forma manual y también de forma mecanizada, aunque la primera práctica es la más utilizada. Debe comenzarse en las primeras horas de la mañana y se deben mantener en condiciones de alta humedad para minimizar la deshidratación y evitar la recolección en momentos del día en que la temperatura sea elevada (López et al., 2008).

La recolección del brócoli comienza con el corte de las inflorescencias principales, con una longitud de tallo de 5 o 6 cm. Posteriormente se van recolectando los rebrotes de inflorescencias laterales, a medida que se van formando.

Debido a que es un órgano que se cosecha en estado inmaduro ya que posee una tasa respiratoria muy elevada, se trata de un producto altamente perecedero, por lo que luego de la cosecha, se recomienda bajar rápidamente la temperatura. El brócoli de elevado índice de calidad debe tener los floretes cerrados y de color verde oscuro brillante con una cabeza compacta, es decir firme a la presión de la mano, el tallo bien cortado y de la longitud requerida (una longitud total entre pella y tallo de 15 a 20 cm) y no debe estar presente ninguna flor amarilla (Cantwell & Kasmire, 2002).



## **1.2. SENESCENCIA EN PLANTAS**

### **1.2.1. Etapa de senescencia**

La senescencia se puede representar como una secuencia de eventos metabólicos que ocurren en la fase final del desarrollo y culmina en la muerte celular programada, de toda la planta, órganos, tejidos o células. Es un proceso activamente ordenado que resulta en cambios del metabolismo altamente coordinados y el dismantelamiento programado de la célula (Jones, 2004).

La senescencia puede iniciarse en un órgano unido a la planta o en la planta entera como consecuencia de la edad o determinado estado fisiológico. Sin embargo, la senescencia también se puede desencadenar por diversos factores bióticos y abióticos causantes de estrés: infección por patógenos, déficit de agua o nutrientes, estrés oxidativo, etc. Los estudios de las vías de señalización de respuesta a estrés, han mostrado que existen muchos genes involucrados en este proceso que también están vinculados a senescencia. De todas maneras, en los casos de senescencia no inducida por estrés, muchos de los genes que se expresan en estas situaciones se manifiestan luego de iniciada la senescencia, por lo que se considera que dicha expresión se activa porque la senescencia condujo a una situación de estrés (Buchanan-Wollaston et al., 2003).

Independientemente de cuál sea el estímulo inicial, los diferentes patrones de senescencia podrían compartir el mismo programa interno en el cual un gen regulador de la senescencia inicia una cascada de expresión de genes secundarios que eventualmente conducen a la senescencia y muerte (Zeiger & Taiz, 2004).

### **1.2.2. Alteraciones metabólicas que ocurren durante la senescencia**

Los tejidos en senescencia redirigen su metabolismo destinando el mismo a reciclar nutrientes. Cuando un órgano entra en senescencia cesa la fotosíntesis (si el órgano previamente la realizaba) y deja de ser autótrofo para pasar a tener un metabolismo heterótrofo dominado por un intenso catabolismo. El objeto central de la senescencia es proveer energía y nutrientes a otras partes de la planta que puede necesitarla para diversos usos: acumulación de reservas en semillas, desarrollo de frutos, desarrollo de flores, formación de polen, etc.

Durante la senescencia, se expresan un gran número de enzimas hidrolíticas que degradan proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Los azúcares liberados, nucleósidos y aminoácidos son entonces transportados vía floema hacia las partes en desarrollo de la

planta, en particular hacia los órganos reproductores y de almacenamiento, donde serán utilizados para procesos biosintéticos (Kuai et al., 2018).

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

#### Degradación de clorofila

Una vez que la clorofila es liberada de los complejos tilacoidales debe ser rápidamente degradada para evitar su fotoactividad y consecuente generación de radicales libres y lesión tisular. Se ha postulado que la primera reacción es la eliminación del fitol catalizada por la clorofilasa. Posteriormente, se produce la remoción del ión central de  $Mg^{+2}$  por la Mg dequelatasa (MDS) para generar feofórbido (Hörtensteiner, 2006). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que en una primera etapa podría liberarse el  $Mg^{+2}$  de la clorofila por la acción de una enzima desconocida generando feofitina, y luego hidrolizarse el fitol por acción de una feofitinasasa (Schelbert et al., 2009), conduciendo también a feofórbido. La enzima clave en la ruta de degradación parece ser la feofórbido a oxigenasa (PaO), que cliva el feofórbido para producir RCCs (*Red Chlorophyll Catabolites*), logrando de esta manera eliminar la fotoactividad de la clorofila, pero también deverdeizando el tejido (Matile et al., 1999).

#### Degradación de proteínas

Durante la senescencia se produce una importante degradación y movilización de proteínas, la mayor parte de las cuales están localizadas dentro del cloroplasto. La disminución del contenido de proteínas provoca a su vez una acumulación de aminoácidos libres y amoníaco si estos no son traslocados a otra parte de la planta. Numerosos trabajos han demostrado una intensa degradación de proteínas del estroma y los tilacoides del cloroplasto (Thomas & Donnison, 2000). Por otra parte, se detecta la síntesis de nuevas proteínas, particularmente proteasas que son direccionadas hacia vacuola y cloroplastos. A medida que la senescencia progresa, el nivel de proteínas disminuye y la actividad proteasa aumenta (Coupe et al., 2003). Se cree que el rol primario de las proteasas durante la senescencia de la planta es la removilización de nutrientes desde las células que mueren hacia tejidos en activo crecimiento de la planta, aunque también se ha asociado a las proteasas en un papel de mediadores en las señales de transducción y como efectores de la muerte celular (Beers et al., 2000).

### Degradación de lípidos

Durante la senescencia hay una disminución en la integridad estructural y funcional de las membranas celulares, lo que es el resultado del metabolismo acelerado de los lípidos de membrana (Thompson et al., 1998). En el momento de senectud de la hoja, el suministro de hidratos de carbono se ve disminuido por el dismantelamiento del aparato fotosintético y ante la escasez de producción de azúcares, toma importancia la vía del glioxilato para la obtención de energía necesaria para las restantes reacciones catabólicas. Los genes que codifican enzimas como fosfolipasas, ácido fosfatídico fosfatasa, y todas aquellas involucradas en la beta-oxidación de los ácidos grasos aumentan su expresión durante la senescencia sugiriendo que dichas enzimas podrían estar involucradas en el metabolismo acelerado de lípidos (Thompson et al., 1998). Es por ello que las enzimas que llevan a cabo estas reacciones normalmente en los peroxisomas, están presentes también en hojas maduras (Graham & Eastmond, 2002).

### **1.2.3. Regulación hormonal de la senescencia**

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

Entre el grupo de fitohormonas que regulan esta etapa se pueden destacar el etileno, el ácido jasmónico y el ácido abscísico, que han sido propuestas en diversos trabajos como prosenescentes (Song et al., 2016; Hu et al., 2017; Iqbal et al., 2017), y a las citoquininas, giberilinas como anti senescentes (Trivellini et al., 2015). Además, se ha sugerido que la señalización mediada por azúcares también podría jugar un rol importante en el desarrollo de este proceso (Rolland et al., 2002).

El control hormonal de la senescencia está dado por dos hormonas principales de acción antagónica: citocininas y etileno. Elevadas concentraciones de citocininas retrasan la senescencia, mientras que la presencia de etileno la acelera.

Las citoquininas son un grupo de fitohormonas vinculadas a procesos de desarrollo vegetal como la división y diferenciación celular; muchas veces actúan en conjunto con fitohormonas del tipo auxinas, para cumplir estos roles (Mok & Mok, 2001). El efecto de las citocininas sobre la senescencia ha sido comprobado a través de aplicaciones exógenas

de estas hormonas, o en plantas transgénicas con niveles aumentados de citocininas endógenas. En ambos casos, las inflorescencias de brócoli se mantienen verdes y no presentan síntomas de senescencia por un tiempo más prolongado (Gan & Amasino, 1997). La aplicación de citoquininas sintéticas, como es el 6-bencilamonopurina (6-BAP), en tratamientos poscosecha ha demostrado un retraso en la senescencia de petunias (Trivellini et al., 2015) y otras flores de uso ornamental (Meir et al., 2007). Asimismo, la aplicación en hortalizas también ha mostrado efectos beneficiosos, como el retraso en la degradación de clorofilas y pérdida de peso, y retención del contenido de ácido ascórbico, en especies tan variadas como espárragos (Wei et al., 2011), pepino (Chen & Yang, 2013), coliflor (Siddiqui et al., 2015) y brócoli (Rushing, 1990). El tratamiento con 6 $\Delta$ BAP en brócoli inhibe la actividad clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasa y el aumento de la expresión de genes asociados a la degradación de clorofilas (Büchert et al., 2011a).

Por otro lado, el etileno es una fitohormona gaseosa que actúa en bajas concentraciones en una gran variedad de procesos durante el desarrollo vegetal. Regula la división y elongación celular, el proceso de maduración de los frutos, la abscisión de las hojas y flores, la entrada en senescencia y la respuesta a estrés biótico y abiótico (Broekgaarden et al., 2015). Se ha demostrado que plantas expuestas al etileno presentan senescencia acelerada (Pogson et al., 1995). En el brócoli, el etileno juega un rol central en la entrada en senescencia del tejido posterior a su cosecha. Presenta, de manera similar a lo observado en frutos climatéricos, un aumento en su tasa respiratoria seguida de un aumento en la liberación de etileno durante esta etapa (Ma et al., 2009).

#### **1.2.4. Senescencia poscosecha en brócoli**

El proceso de cosecha de un órgano implica la separación del mismo de la planta madre. En consecuencia, se produce un severo estrés, ya que los órganos cosechados pierden drásticamente los aportes de energía, nutrientes, minerales, hormonas provenientes de la planta madre y de agua. En muchos casos, esto desencadena rápidamente el proceso de senescencia, por lo que el tiempo de vida poscosecha para estos vegetales es corto (King & Morris, 1994).

Como se mencionó anteriormente, del brócoli se consume su inflorescencia, la cual se cosecha en un estado completamente inmaduro. Precisamente, estos órganos requieren un aporte más importante de nutrientes, hormonas y energía por lo que se desencadena una senescencia muy acelerada durante la poscosecha.

Muchos de los cambios observados en los vegetales verdes durante el almacenamiento, como pérdida de clorofila, deterioro de la estructura celular y finalmente, muerte celular, muestran similitudes con los cambios observados durante el desarrollo de la senescencia en hojas. Page et al. (2001) encontraron que durante la senescencia foliar ocurre la expresión de numerosos genes similares a los de los floretes del brócoli en poscosecha, lo que indica que en ambos casos estarían involucradas las mismas rutas metabólicas que conducen a la senescencia.

El efecto más notorio de la senescencia poscosecha en brócoli es la rápida pérdida de clorofila de los sépalos de las flores inmaduras, con el consecuente amarillamiento de las cabezas florales (King & Morris, 1994). Asimismo, a esta pérdida de calidad visual, se ha reportado la disminución en el contenido de proteínas, azúcares, ácido ascórbico y glucosinolatos, acompañado de una pérdida de agua y por lo tanto de turgencia de los tejidos en el almacenamiento poscosecha (Page et al., 2001).

Durante el almacenamiento a 20 °C se produce una disminución del contenido de ácidos grasos y un aumento de la peroxidación de lípidos que se correlacionan con el deterioro que se produce durante la poscosecha (Zhuang et al., 1997)

### **1.3. VIDA ÚTIL O VIDA POSCOSECHA DEL BRÓCOLI**

Los vegetales que son cosechados cuando su desarrollo no está completo o su crecimiento no ha finalizado, están sujetos a un estrés considerable debido a la abrupta disrupción en el suministro de energía, nutrientes, hormonas y agua. Por ello, un producto como el brócoli sufre una rápida senescencia durante su almacenamiento y tiene una vida útil muy corta.

El brócoli sufre un deterioro de la calidad muy rápido durante la poscosecha a causa de la senescencia acelerada, tiene una vida útil estimada de 3 a 4 semanas a una temperatura de almacenamiento de 0 °C, pero tan solo de dos o tres días cuando el almacenamiento se realiza en aire a 20 °C (King & Morris, 1994).

Las hortalizas que se encuentran dentro de la familia *Brassicaceae*, tienen un amplio rango de tasas de senescencia e intensidades respiratorias; las actividades respiratorias pueden variar desde moderadas como el caso de la coliflor, hasta intensidades respiratorias muy altas como es el caso de brócoli, que alcanza valores entre 40 a 60 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (a 5 °C) y son comparables con hortalizas como espárragos, arvejas y el maíz dulce, que generan una vida de almacenamiento poscosecha muy corta. Sumado a esto, el brócoli tiene escasas reservas alimenticias, es decir un muy bajo contenido de hidratos

de carbono que permitirían mantener al tejido activo en el período poscosecha. Este es, un factor que contribuye a que la vida potencial útil sea más corta, respecto a otras hortalizas que cuentan con grandes cantidades de estas reservas como papas, batata, mandioca, entre otras.

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

#### **1.4. TENDENCIAS EN LA CONSERVACIÓN POSCOSECHA DE BRÓCOLI**

Además de los eventos descritos anteriormente, el material vegetal recién cortado sigue respirando y transpirando, disminuyendo su calidad comercial y duración poscosecha. Por medio de diferentes técnicas poscosecha, se busca retrasar o controlar los procesos de maduración y retardar la senescencia, evitar las pérdidas de peso por deshidratación y sus cualidades organolépticas.

Se han reportado diversas tecnologías para regular la senescencia y prolongar la vida poscosecha de brócoli. Las mismas abarcan métodos físicos como son los tratamientos térmicos (Costa et al., 2005b), el envasado en atmósferas modificadas, la irradiación UV-C, y UV-B (Aiamla-or et al., 2009) y almacenamiento con luz visible (Büchert et al., 2011b; Büchert et al., 2011a), así como aplicaciones exógenas de químicos, como citoquininas sintéticas (6-BAP), 1-metilciclopropeno (1-MCP), entre otros.

Debido a su alta tasa respiratoria y a fin de conservar la calidad visual, el color y el valor nutritivo, el brócoli debe ser enfriado a 0 °C inmediatamente después de la cosecha, para ello se puede utilizar hielo molido, aire frío u otros métodos de preenfriado. A fin de preservar el máximo contenido de flavonoides y glucosinolatos ha sido aconsejado continuar con temperaturas de 0 °C durante el almacenaje y transporte y mantener el

producto en oscuridad ya que la acción de genes relacionados con la degradación de los GSL en poscosecha está fuertemente ligada a la presencia de luz (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

La tasa de pérdida de agua de las frutas y hortalizas depende de la diferencia en el déficit de la presión de vapor entre el producto y el medio ambiente, lo cual está influenciado por la temperatura y humedad relativa (HR), por lo que ambos parámetros se deben controlar de manera conjunta en el almacenamiento. Los requerimientos de brócoli recién cosechado para optimizar la vida de almacenamiento (21-28 días) son de 0 °C de temperatura y una HR > 95 %. El brócoli almacenado a 5 °C puede tener una vida útil de 14 días, pero a 10 °C es de sólo 5 días (Cantwell & Suslow, 1999). Por otro lado, el brócoli posee una alta tasa respiratoria en la poscosecha, pero el almacenamiento refrigerado puede reducirla y prolongar la vida poscosecha. Además, se ha propuesto que atmósferas controladas con alta concentración de CO<sub>2</sub> y bajas de O<sub>2</sub> también reducen la tasa respiratoria (King & Morris, 1994).

El tratamiento térmico tiene como objetivo reducir la carga bacteriana e inactivar enzimas como las peroxidasas (POD), polifenol oxidasas (PPO) y pectínmetilesterasas (PME) que catalizan reacciones indeseables. La tasa de degradación de los GLS durante el procesamiento térmico se incrementa con el aumento de la temperatura entre 13 a 82 %, siendo mayor en los tejidos con mayor contenido de agua y obteniéndose como resultado de la degradación isotiocianatos, tiocianatos o nitrilos, epitonitrilos y oxazolidinas en concentraciones variables que dependen del GLS de origen, del cultivar, del pH y la presencia de iones Fe<sup>+2</sup>. A diferencia de lo que sucede en el tratamiento térmico, durante el proceso de congelado aumentó el contenido extraíble de GLS y de carotenoides totales entre 60 a 300 % respecto al brócoli fresco en siete cultivares sugiriendo que luego del congelado los compuestos bioactivos se encuentran más disponibles que en el producto fresco (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

Las brassicáceas no se caracterizan por la producción de etileno (menos de 0,1 µL kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 20 °C), sin embargo, son sensibles a él principalmente cuando está presente en el ambiente poscosecha, provocando el amarillamiento de los floretes. El contacto con 2 ppm de etileno a 10 °C reduce la vida del brócoli en un 50 % (Cantwell & Suslow, 1999). El pico de etileno puede ser reducido por efecto del almacenamiento refrigerado (Pogson & Morris, 1997).

Se puede prolongar la vida poscosecha utilizando distintos tipos de radiaciones, la irradiación con haz de electrones a 3 kGy mantiene la calidad del producto fresco hasta

14 días sin afectar el color, pH, peso o aroma. Bajas dosis e intensidad de luz UV-B y UV-C (entre 1,5 a 10 kJ m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) retardan la degradación de la clorofila y evitan la reducción en el contenido de azúcares y proteínas manteniendo el producto con valor comercial por más de 12 días, además su utilización puede ser un complemento útil en las cámaras de frío para brócoli fresco.

A nivel minorista o de venta al público, la vida en estante y la calidad visual y nutritiva de brócoli puede extenderse conservando los productos bajo luz verde LED o luz fluorescente, en estas condiciones se reduce la degradación de la clorofila, retardando el amarillamiento de las yemas. Los LED verdes tienen la ventaja de aumentar el contenido de GLS, mientras que no afectan el contenido de sulforafanos. La temperatura durante esta etapa se recomienda que oscile entre 10 a 18 °C (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

Productos como la melatonina o los metiljasmonatos, aplicados en brócoli, estimulan la síntesis de glucosinolatos, en especial de glucorafanina, uno de los más potentes glucosinolatos con poder anticancerígeno. Además, permiten reducir el amarillamiento, probablemente estimulando la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, peroxidasa y superóxidodismutasa) y reducen la expresión de los genes BoCLH1 y BoCLH3, quienes codifican la síntesis de clorofilasa (Cuesta & Fusari Gómez, 2022).

Como parte de los tratamientos químicos poscosecha se destacan las aplicaciones de 1-MCP el cual es un gas que actúa ocupando los receptores de etileno, inhibiendo por lo tanto la señalización de etileno y su acción (Chen et al., 2008). Debido a que este compuesto es un bloqueador selectivo de los receptores de etileno, puede ser utilizado como tratamiento para retrasar la senescencia y la maduración de frutos (Gong & Mattheis, 2003). Además, la pérdida de clorofila en brócoli puede ser retrasada por inhibidores de la síntesis de etileno y acelerada por la aplicación exógena de etileno y ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) (Aharoni, 1985; Tian et al., 1994).

Si bien la aplicación exógena de citoquininas retrasa notablemente la senescencia poscosecha de brócoli, posponen la pérdida de clorofila, de proteína y la deshidratación, su aplicación comercial no se encuentra permitida (Costa et al., 2005a).

En general, la problemática poscosecha ha sido estudiada aisladamente de todo aquello que implica condiciones y manejo durante el cultivo. Hay relativamente pocos ejemplos en los que se estudia el efecto de factores precosecha sobre el comportamiento poscosecha de frutos o vegetales. Por ejemplo, en albahaca (*Ocimum basilicum*), lechuga (*Lactuca sativa* cv. Ravita), acelga roja (*Beta vulgaris* L. var *flavescens* Lam) y rúcula (*Eruca vesicaria* spp. *sativa*), se encontró que cosechando las hojas hacia la tarde se incrementó



la vida útil de las muestras respecto de las cosechas a la mañana, con menores niveles de carbohidratos (Clarkson et al., 2005). En brócoli se ha descrito, por ejemplo, que inflorescencias cosechadas de plantas sometidas a estrés hídrico mostraron un retraso en el amarillamiento y niveles superiores de citocininas. Se ha sugerido que, en momentos de escasez de agua, la raíz incrementa su volumen para aumentar la superficie de exploración, lo que a su vez favorece la síntesis de mayores cantidades de dicha hormona, que luego de ser traslocada a la inflorescencia, permitiría retrasar la senescencia durante la poscosecha (Zaicovski et al., 2008).

La calidad de las frutas y de los vegetales a la cosecha y durante su almacenamiento poscosecha está afectada en gran medida por factores agronómicos como la fertilización, la administración de agua y los tratamientos hormonales (Pezzarossa et al., 2014). Por ello, el tratamiento precosecha mediante fertilización del cultivo de brócoli también podría ser una herramienta exitosa para retrasar la senescencia y prolongar el tiempo de conservación poscosecha a un costo menor. Además, esta tecnología para regular la senescencia y prolongar la vida poscosecha de brócoli presenta una ventaja frente a los métodos físicos y aplicaciones exógenas de químicos nombrados anteriormente; dado que no requiere un procesamiento extra de las inflorescencias (Able et al., 2002; Büchert et al., 2011a).

## **1.5. BIOFORTIFICACIÓN DE CULTIVOS**

### **1.5.1. Estrategias de biofortificación**

Actualmente la crisis por insuficiencia e inseguridad alimentaria afecta a cerca de dos tercios de la población mundial (FAO, 2020). Esto se debe principalmente al insuficiente acceso a alimentos de calidad y con alto valor nutricional, o el consumo de alimentos deficientes en micronutrientes importantes, como el Hierro (Fe), Cobre (Cu), Yodo (I), Selenio (Se) y Zinc (Zn), en la ingesta diaria de la población (Shahzad et al., 2014).

La sociedad no solo demanda una gran producción, sino que necesita productos con una alta calidad nutricional, capaces de satisfacer las necesidades nutricionales humanas tras su consumo. Por ejemplo, los seres humanos requieren más de 22 elementos minerales para cubrir sus necesidades fisiológicas alimentarias. Algunos de estos elementos son requeridos en elevadas cantidades, como por ejemplo el calcio y el fósforo. Sin embargo, otros, como Fe, Zn, Cu, I y Se, solo son necesarios en pequeñas cantidades (White & Broadley, 2005). A pesar de ser estos nutrientes esenciales requeridos en menor cantidad, en la dieta humana actual se observa que existen deficiencias en los mismos. Se estima

que, de 6 mil millones de personas, entre el 60-80 % son deficientes en Fe, más del 30 % son deficientes en Zn, el 30 % en I y un 15 % en Se (White & Broadley, 2005). Las deficiencias en estos elementos minerales o compuestos repercuten en la salud de la población, afectando mayoritariamente a niños, adolescentes y mujeres embarazadas, y a pesar de encontrarlas en los países desarrollados, afectan principalmente a los países en vías de desarrollo, donde se incrementa dado su pobre y escasa alimentación.

Dado que la mayoría de estos micronutrientes son tomados principalmente a través de la ingestión de los vegetales, y que el contenido de los mismos en las cosechas no es muy elevado, en los últimos años se está investigando sobre una novedosa forma de enriquecer los productos vegetales destinados tanto al consumo humano como al ganado, en estos micronutrientes esenciales, a través de los denominados programas de biofortificación (Welch, 2002).

Así, la biofortificación fue definida por White y Broadley (2005) como el proceso de incrementar la concentración biodisponible de elementos esenciales en la parte comestible de los productos cosechados mediante la intervención agronómica o la selección genética. Posteriormente, Mayer et al. (2008), definieron a la biofortificación como una técnica que busca aumentar el contenido de nutrientes minerales de los cultivos agrícolas, mediante el manejo agronómico con base en prácticas agrícolas como la fertilización del suelo química y orgánica, cruzamiento tradicional entre variedades o transgénesis, comúnmente denominada alimentos transgénicos, mejorando su estado y valor nutricional, al producir alimentos con alto valor nutricional o enriquecidos con ciertos compuestos naturales o minerales para mejorar la ingesta y de los mismos deficientes en la dieta humana.

La biofortificación de alimentos desde sus inicios se ha desarrollado frecuentemente sobre alimentos como los granos, semillas y tubérculos (cereales, leguminosas y tubérculos), como arroz (*Oryza sativa* L.), yuca o cassava (*Manihot esculenta* Crantz), trigo (*Triticum aestivum* L.), mijo (*Pennisetum americanum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz, (*Zea mays* L.) y papa dulce o camote (*Ipomoea batatas* L.) (Bouis et al., 2011; Mallari, 2019), considerados prioritarios por su alto valor energético, proteico, mineral, sus tasas de rendimiento agrícola en todas las regiones del mundo y amplio consumo (Mayer et al., 2008; Saltzman et al., 2013). Por lo tanto, es considerada como una estrategia viable de intervención agrícola para incrementar la rentabilidad de los cultivos, sus rasgos agronómicos (productividad, rendimiento, nutrición vegetal, etc.) y valor nutricional (Bouis & Welch, 2010).

Recientemente, la biofortificación de cultivos se ha encaminado a cultivos alternativos (granos, semillas oleaginosas, frutas y verduras), es decir, cultivos no tradicionales, pero que ocupan un nicho en el mercado e importancia agrícola, desde cultivos hortícolas hasta frutales. La biofortificación de cultivos alternativos tiene el objetivo de incrementar su estado nutricional y tener una buena aceptación en el mercado para el consumo humano (Ayoub et al., 2020). Lo que implica, aumentar en alimentos hortícolas y frutícolas los rasgos de las características organolépticas (sabor, textura, apariencia, etc.) y componentes esenciales para la salud humana como los carotenoides  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, Zeaxantina,  $\alpha$  y  $\beta$ -Criptoxantina, Luteína, Fitoeno, Violaxantina, Capsantina, el Licopeno, entre otros (Meléndez-Martínez et al., 2004) y el contenido de vitaminas A, D, E, K, C, tiamina, niacina, B6, B12, y la biotina) en las raíces, hojas y en el fruto (Zheng et al., 2020).

#### **1.5.2. Biofortificación con Selenio**

El Selenio es un oligoelemento esencial en la nutrición humana, el cual participa en varias funciones dentro del organismo que mantienen el crecimiento y adecuado funcionamiento de las células (Schiavon et al., 2020). Este elemento es un cofactor de la enzima glutatión peroxidasa (GSH peroxidasa), la cual es un catalizador en la reducción de peróxidos que pueden dañar las células y tejidos, además puede actuar como antioxidante (Puccinelli et al., 2017).

En los animales y humanos, una dieta suplementada con Se, particularmente compuestos orgánicos de Se, aumenta la defensa antioxidante, lo que puede reducir la susceptibilidad a enfermedades como el cáncer y otros trastornos relacionados con el estrés oxidativo (Mimmo et al., 2017). Por ejemplo, los trabajos experimentales con animales demostraron que el aporte de Se en la dieta, fundamentalmente bajo su forma orgánica de origen vegetal, supone un efecto preventivo muy eficaz del cáncer inducido por diversos agentes químicos (Finley et al., 2001); en humanos también se ha demostrado el efecto del Se como un agente quimio protector, encontrándose que reduce la aparición de ciertos tipos de cáncer, como el de mama, próstata y colon (Köhrle et al., 2000).

Las formas de Se que están biodisponibles para el ser humano son los selenoaminoácidos (Selenometionina o SeMet y Selenocisteína o SeCys), estos aminoácidos forman parte constituyente de las selenoproteínas, las cuales tienen un papel importante en sistemas antioxidantes, equilibrio hormonal, inmunidad, fertilidad masculina, resistencia a infecciones virales y prevención de cáncer (Rayman, 2020). Las selenoproteínas

necesitan varios cofactores para su síntesis y dependen principalmente de la ingesta del Se contenido en la carne o pescado (Willers et al., 2015), debido a que los alimentos de origen vegetal presentan un bajo contenido de este oligoelemento (Kleine-Kalmer et al., 2021), como un reflejo de la concentración de este elemento en el suelo (White, 2016). Lo anterior se manifiesta como una deficiencia de Se que afecta al 15 % de la población mundial (Wu et al., 2015; García- Márquez et al., 2020).

Muchas zonas del mundo, tienen poca concentración de Se en suelo, lo que hace que sus productos agrícolas destinados al consumo humano y animal sean pobres en este micronutriente. Por ejemplo, hay estudios que demuestran que en países como Alemania, Noruega, Finlandia y Austria la concentración de Se en el suelo suele ser inferior a  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ , (Stadlober et al., 2001). Esto conlleva a que sus habitantes consuman una cantidad de Se entre 20 a  $35 \text{ } \mu\text{g día}^{-1}$ , bastante alejada de la que aconseja la Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS establece una ingesta máxima tolerable (IMT) de selenio de  $400 \text{ } \mu\text{g/día}$  y el aporte dietético recomendado es de  $55 \text{ } \mu\text{g/día}$  para adultos (Food and Nutrition Board, 2000). Sigrist et al. (2012), realizaron una estimación aproximada de la ingesta diaria de Se en Argentina obteniendo como resultado 24 y  $32 \text{ } \mu\text{g día}^{-1}$  para hombres y mujeres adultos, respectivamente. Estos valores son relativamente bajos en comparación con el aporte dietético recomendado lo que sugiere una ingesta deficiente de Se en Argentina.

Por otro lado, el Se no es considerado un elemento esencial para las plantas, pero si un elemento benéfico, especialmente por inducir en dosis bajas tolerancia a diferentes factores ambientales que generan estrés oxidativo, entre los que destacan: tolerancia al arsénico en arroz (Singh et al., 2018), a cadmio y plomo en canola (Wu et al., 2016), a estrés salino en tomate (Mozafariyan et al., 2016) y déficit hídrico en maíz (Nawaz et al., 2016). El Se disminuye los efectos adversos del estrés oxidativo induciendo diferentes componentes del sistema antioxidante enzimático y no enzimático de las plantas, así como la actividad de GSH peroxidasa, incrementos en los niveles de ácido ascórbico, glutatión, tioles no proteicos y compuestos fenólicos (Srivastava et al., 2009; Chauhan et al., 2017; Singh et al., 2018).

Recientemente, el Se es utilizado como fertilizante para aumentar su contenido en la parte comestible de las plantas, en cultivos como zanahoria y lechuga (Smolen et al., 2016) maíz (Nawaz et al., 2016) y rábano (Schiavon et al., 2016), lo que implica la producción de cultivos con mayores beneficios para la salud. También se ha reportado que la aplicación de Se incrementa el rendimiento y calidad del grano de maíz (Nawaz et al.,

2016), mejora los niveles de compuestos nutraceuticos (glucorafanina) en raíces de rábano (Schiavon et al., 2016) y en fresa incrementa el contenido de flavonoides y compuestos polifenólicos (Mimmo et al., 2017).

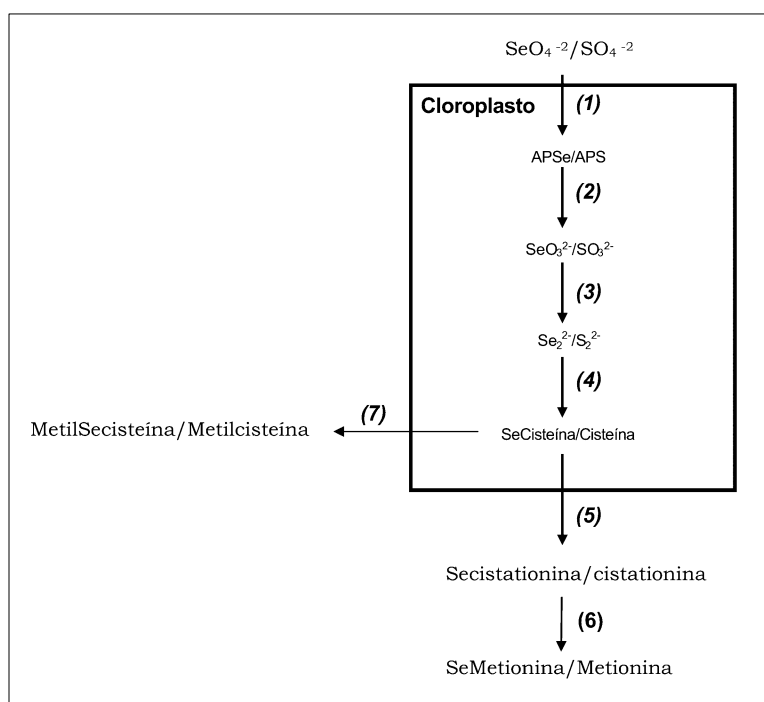
Debido a que las formas más abundantes de Se en las plantas son fundamentalmente orgánicas como seleniomietionina y metilseleniocisteína (Figura 5), la ingesta de este elemento a través de frutos y verduras será más efectiva en la prevención del cáncer, en comparación con su ingesta bajo sus formas inorgánicas, es el método más eficaz para obtener este elemento, ya que su biodisponibilidad es máxima. Esto fue demostrado utilizando ratas, donde aquellas que consumían  $3 \mu\text{g g}^{-1}$  de plantas de brócoli fertilizadas con Se, en comparación con la ingesta en su forma inorgánica, producía un aumento significativo de la actividad glutatión peroxidasa, así como una reducción de la aparición de tumores (Finley et al., 2001).

Una estrategia para aumentar el contenido de Se en los alimentos de origen vegetal es mediante la biofortificación que consiste en potenciar la bioactividad y el contenido de Se en las partes comestibles de las plantas (Gaucín-Delgado et al., 2020). De esta manera, la biofortificación con selenio de cultivos que se utilizan para consumo humano representa una solución inmediata para incrementar la ingesta de este micronutriente (Boldrin et al., 2018).

La forma utilizada actualmente para aumentar la cantidad de selenio en los cultivos es mediante la aplicación en suelo de fertilizantes que contengan selenio o mediante la aplicación foliar de sales de selenio (selenato o selenito de sodio) (Ellis & Salt, 2003). Diferentes estudios indicaron que es preferible la aplicación foliar de selenio a la aplicación en suelo, debido a la mayor eficiencia de ingreso a la planta y, además, porque no fueron observados efectos residuales en el ambiente (Gupta & Gupta, 2017; Ellis & Salt, 2003). Las técnicas de aplicación foliar implican un mínimo consumo de sales, son más efectivas, seguras y económicamente aceptables y permitieron incrementar el contenido de selenio en cultivos como trigo y cebada (Céccoli et al., 2012; Ellis & Salt, 2003). A su vez, en plantas de té, la aplicación foliar de selenio no solo ha incrementado el contenido de este micronutriente, sino que además su rendimiento, el contenido de aminoácidos totales y la cantidad de vitamina C (Hu et al., 2003).

Las dos formas de Se más utilizadas son el Selenato y el Selenito sódico debido a que las plantas los absorben con mayor facilidad que otras formas de Se como las orgánicas, mucho menos disponible para las plantas (Terry et al., 2000). Aunque el selenato sódico

es la forma más utilizada, se piensa que el selenito sódico es más eficaz puesto que su asimilación a compuestos orgánicos de Se en la planta suele ser mayor (Terry et al., 2000). Reportes previos han demostrado que las Brasicáceas son plantas acumuladoras de selenio y que el brócoli es capaz de acumularlo en la forma orgánica de seleno-metil-seleno-cisteína (SeMSeC), cuando es cultivado en un medio rico en este compuesto. (Kotrebai et al., 2000; Ellis & Salt, 2003). Debido a que el SeMSeC es un aminoácido no proteinogénico, se lo considera como uno de los compuestos orgánicos de selenio más efectivo en la quimio protección contra el cáncer. De esta forma, la elevada concentración de SeMSeC encontrada en el brócoli podría explicar la prevención contra el cáncer observada en animales alimentados con una dieta conteniendo este vegetal biofortificado (Yamanoshita et al., 2007).



**Figura 5.** Esquema de la asimilación del Se en las plantas. 1: ATP sulfurilasa; 2: APS reductasa; 3: Sulfito reductasa; 4: Complejo cisteína sintasa (SAT-OAS-TL); 5: Cistationina sintasa; 6: Metionina sintasa; 7: Metiltransferasa.

### 1.5.3. Rol del selenio en la poscosecha

Varios trabajos han reportado los efectos benéficos de los micronutrientes esenciales sobre la calidad de los cultivos (Fageria et al., 2002; Esringüa et al., 2011). Sin embargo, existen pocos reportes sobre elementos no esenciales como es el caso del selenio (Alcaraz-Lopez et al., 2003; Hu et al., 2003; Malorgio, et al., 2009; Pezzarossa et al.,

2012; Pezzarossa et al., 2014). El rol benéfico del selenio para las plantas ha sido considerado en especies capaces de acumularlo en altas concentraciones y en otros cultivos en los cuales ayuda a contrarrestar el estrés oxidativo (Djanaguiraman et al., 2005; Terry et al., 2000).

Asimismo, en plantas de tomate cultivadas en hidroponia, el selenio adicionado a la solución nutritiva es capaz de retrasar la maduración de los frutos a través de la disminución de la biosíntesis de etileno, hormona involucrada en distintas vías metabólicas durante la senescencia poscosecha. Por lo tanto, la aplicación de este elemento puede prolongar el tiempo de conservación y al mismo tiempo tener efectos beneficiosos sobre la salud de los consumidores (Pezzarossa et al., 2014). Del mismo modo, en lechuga y achicoria, el selenio es capaz de disminuir la degradación de clorofila y consecuentemente aumentar la vida poscosecha de ambas especies (Malorgio et al., 2009). De esta manera, el selenio parece tener un efecto positivo retrasando la senescencia de varias plantas; aunque todavía no se conoce el efecto de la aplicación foliar precosecha de selenio sobre la senescencia poscosecha de las pellas de brócoli.

## **1.6. HIPÓTESIS DEL TRABAJO**

De esta manera, sobre la base de los antecedentes descriptos anteriormente, se planteó analizar desde diferentes perspectivas el efecto de la aplicación foliar precosecha de selenio en el cultivo de brócoli, sobre el rendimiento y la poscosecha de las inflorescencias; para su comercialización en el mercado fresco y su uso para producir alimentos con mayores propiedades nutricionales.

Se postula como hipótesis de trabajo que la biofortificación, mediante la aplicación foliar de sales de selenio precosecha, genera un incremento del contenido de selenio en la pella de brócoli, un aumento en la producción y un retraso en la senescencia poscosecha de las partes comestibles (inflorescencias), mediante una reducción de la síntesis de etileno, y un retraso la degradación de clorofila y de lípidos de membrana.

## **1.7. OBJETIVOS DEL TRABAJO**

### **1.7.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la aplicación foliar precosecha de selenio sobre la producción y senescencia poscosecha de brócoli.

### **1.7.2. Objetivos específicos**

- 1) Determinar el efecto de la aplicación foliar de sales de selenio precosecha sobre el crecimiento, rendimiento y acumulación de selenio en plantas de brócoli al momento de la cosecha.
- 2) Analizar el efecto de la aplicación foliar de sales de selenio sobre la calidad comercial de pellas de brócoli durante la poscosecha.
- 3) Evaluar el efecto de la aplicación foliar de sales de selenio sobre parámetros fisiológicos relacionados a la calidad comercial poscosecha de pellas de brócoli.
- 4) Analizar el efecto de la aplicación foliar de sales de selenio en la expresión de genes involucrados diferentes vías metabólicas relacionadas a la calidad comercial postcosecha en pellas de brócoli.



## **CAPÍTULO 2**

---

### **EFFECTO DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE SALES DE SELENIO EN BRÓCOLI SOBRE EL CRECIMIENTO, RENDIMIENTO Y ACUMULACIÓN DE SELENIO**

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El micronutriente selenio es un elemento crucial que los seres humanos necesitan para una buena salud y desarrollo, que normalmente puede ser suministrado por una dieta adecuada. En la actualidad, existe una ingesta insuficiente de selenio en muchos países, y la deficiencia de selenio en la dieta afecta a aproximadamente mil millones de personas en el mundo (Newman et al., 2019). La ingesta de selenio recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que no debe superar los 70  $\mu\text{g día}^{-1}$ , siendo su consumo mínimo considerado de deficiencia dietética los inferiores a 40  $\mu\text{g día}^{-1}$  y como niveles tóxicos aquellos que superan los 400  $\mu\text{g día}^{-1}$  (Kieliszek & Błazejak, 2013). Notablemente, el contenido de selenio en la dieta diaria promedio es mucho menor que el contenido recomendado (Kieliszek & Błazejak, 2016; Sigrist et al., 2012), a pesar de que la ingesta dietética baja en selenio se puede asociar con trastornos de salud relacionados con el estrés oxidativo, hipotiroidismo, sistema inmunitario debilitado, enfermedades cardiovasculares, fertilidad masculina reducida y mayor riesgo de cáncer (Drutel et al., 2013; Rayman, 2020; Sattar, 2021).

Una de las formas mediante las cuales el selenio se incorpora a la cadena alimentaria es a través de los cultivos, lo cual a su vez depende del nivel de selenio en el suelo (Hawrylak-Nowak, 2013). Durante los últimos años, existe un esfuerzo creciente por aumentar el contenido de selenio en plantas para consumo humano mediante biofortificación; ya que sus niveles en los cultivos están disminuyendo debido a la producción intensiva de plantas (Hossain et al., 2021; Schiavon et al., 2020). En consecuencia, los estudios que intentan optimizar las estrategias de biofortificación con selenio para mejorar el valor nutricional de los cultivos alimentarios presentan un gran interés a escala mundial.

El éxito de la biofortificación para enriquecer las plantas con selenio depende de la especie de cultivo, el modo de fertilización y las formas minerales de selenio que se utilizarán (Schiavon et al., 2020). En base a su capacidad de absorción de Se y tolerancia, las plantas son divididas en tres grupos: no acumuladoras de Se, Se-indicadoras, y acumuladoras de Se (Wiesner-Reinhold et al., 2017). La mayoría de las plantas son no acumuladoras, es decir, que no toleran concentraciones tisulares de Se de más de 10-100  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco, y rápidamente muestran signos de toxicidad por Se sobre la exposición a concentraciones de Se más altas que las mencionadas anteriormente. Esta toxicidad se debe a la incorporación no específica de seleno-aminoácidos en proteínas, reemplazando

Cys y Met, interrumpiendo así la función de la proteína y causando toxicidad a la planta. (Wiesner-Reinhold et al., 2017).

Varios miembros de la familia Brassicaceae entran en la categoría de plantas indicadoras de Se (también conocidas como plantas de acumulación secundaria de Se) y son capaces de tolerar concentraciones de Se de hasta  $1000 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco en sus tejidos y por lo tanto puede colonizar suelos descritos como seleníferos. Estos incluyen el brócoli, mostaza india, col rizada, nabo y repollo. (Wiesner-Reinhold et al., 2017).

Las plantas acumuladoras de Se (también conocidas como hiperacumuladoras de Se) son capaces de acumular concentraciones de Se  $>1,000 \mu\text{g g}^{-1}$  PS en sus tejidos sin efectos nocivos aparentes. De hecho, estas muestran un efecto de crecimiento particularmente fuerte que puede exceder el doble aumento de la producción de biomasa. También son las únicas plantas capaces de colonizar suelos altamente seleníferos. Entre la familia Brassicaceae se encuentra *Cardamine hupingshanensis* y especies dentro del género *Stanleya* y *Thelypodium*, tales como *S. pinnata* y *T. laciniatum* Endl (Wiesner-Reinhold et al., 2017).

Se han utilizado diferentes métodos de biofortificación con selenio para estas especies, que incluyen aspersión foliar, cultivo hidropónico y fertilización del suelo; aunque en cada uno de ellos varía la tasa de asimilación del selenio (Wiesner-Reinhold et al., 2017). Varios estudios han sugerido que la aplicación foliar de selenio tiene ciertas ventajas sobre la aplicación al suelo; debido principalmente a la sencillez de aplicación, la prevención de las transformaciones químicas del selenio en el suelo, así como con la limitada translocación a órganos aéreos desde las raíces (Bañuelos et al., 2017; Hawrylak-Nowak, 2013). Además, el impacto ambiental de las aplicaciones foliares podría ser menor debido a la pequeña cantidad de sales de selenio utilizadas (Hawrylak-Nowak et al., 2018). Sin embargo, dado que la absorción foliar y radicular se ve afectada por el genotipo, la forma de selenio aplicado y las condiciones de crecimiento; se requieren estudios específicos para evaluar métodos y dosis adecuados (Hasanuzzaman et al., 2020; Puccinelli et al., 2017).

En lo que respecta a las formas de selenio utilizada, los más comunes por su costo y accesibilidad son las sales de selenato y el selenito de sodio, las cuales se han probado principalmente para obtener Brassicas enriquecidas con selenio. En estudios previos pudo observarse que la asimilación de selenio es menor cuando las plantas son expuestas a selenito en comparación con aquellas fertilizadas por la raíz con selenato (Lyi et al., 2005; Ximénez-Embún et al., 2004). Esta diferencia se debe a que el selenito ingresa a las

células de la raíz por transportadores de fosfato que son menos eficientes que los transportadores de azufre utilizados para la entrada del selenato. Algunos estudios han reportado la aplicación foliar de selenio en plantas de brócoli para lograr una producción comercial de brócoli enriquecido con selenio en condiciones de campo; sin embargo, solo han investigado la aplicación de selenato de sodio en un grupo de cultivares (Ghasemi et al., 2016; Hsu et al., 2011; Sindelarova et al., 2015).

Por lo expuesto, puede observarse que se requieren más estudios para optimizar la metodología de aplicación con el fin de mejorar la producción y biofortificación de selenio. Debido a esto, en el presente capítulo se evaluó el efecto de la aplicación foliar de diferentes formas minerales de selenio (selenato y selenito) en dos dosis diferentes, con el uso adicional de un coadyuvante en condiciones de campo. Se analizaron el crecimiento de la planta, parámetros fisiológicos, la acumulación de selenio y la calidad comercial de las cabezas de brócoli en dos cultivares utilizados para el mercado fresco.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Obtención de plantas biofortificadas con selenio**

#### ***2.2.1.1. Material vegetal***

Las plantas de brócoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) utilizadas en el presente trabajo corresponden a dos híbridos comerciales, los cultivares 'Belstar' F1 (Bejo, Warmenhuizen, The Netherlands) y 'Legend' F1 (Nongwoo Bio, Gyunggi-do, Republic of Korea). Ambos cultivares son adecuados para crecer en otoño, primavera y verano. Tienen una amplia gama de adaptabilidad y maduran antes que la mayoría de los cultivares (ciclo de crecimiento de aproximadamente 85-90 días). Producen pellas compactas y muy uniformes, ideales para mercado fresco. Además, estos dos cultivares son los utilizados en esta zona geográfica.

#### ***2.2.1.2. Condiciones de crecimiento de las plantas***

En primer lugar, las semillas de brócoli se seleccionaron, de acuerdo con la uniformidad de tamaño y las características externas, y se descartaron aquellas con alteraciones y malformaciones. Las semillas se sembraron (13/05/2015) en bandejas multiceldas de poliestireno expandido de 228 celdas con sustrato compuesto por GROW MIX Terrafertil® para obtener plántulas con un correcto desarrollo del sistema radical, en condiciones de cultivo controladas. Posteriormente, a las 4 semanas post-germinación (20/06/2015), se trasplantaron para su crecimiento bajo condiciones estándares a campo,

según parámetros determinados por la Agencia de Extensión Rural del INTA Monte Vera para cultivos hortícolas de la zona Santa Fe en el Campo Experimental de Cultivos Intensivos y Forestales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina). El experimento se realizó sobre un suelo Mollisol, subgrupo Argiudol típico de la Serie Esperanza, con 29 % arena, 66 % limo y 5 % arcilla en el horizonte Ap (0-0,27 m de profundidad) (Soil Survey Staff, 2010; INTA, 1991). Antes del trasplante, se realizó un análisis químico del suelo en una muestra compuesta utilizando un muestreador de tubo de acero inoxidable a una profundidad de 0,20 m (Tabla 3). Las plántulas se trasplantaron a 0,6 m una de otra en hileras espaciadas a 0,7 m durante el comienzo de la primavera. Las plantas de los diferentes cultivares se colocaron en tres subparcelas (49 plantas por subparcela) donde se aplicó un diseño de parcelas completamente al azar. En cada subparcela se consideró el efecto borde de las plantas. Se mantuvieron las prácticas agronómicas normales para el cultivo de las plantas y las malezas se eliminaron manualmente después de la emergencia.

**Tabla 3.** Propiedades químicas del suelo (0 a 0,20 m de profundidad) en el sitio experimental antes del trasplante.

Propiedades del suelo <sup>a</sup>	Valores
pH (proporción suelo: agua 1:2.5)	6,65 ± 0,03
Conductividad eléctrica (dS m <sup>-1</sup> )	2,82 ± 0,07
Materia orgánica (%)	2,05 ± 0,05
N total (%)	0,13 ± 0,01
P disponible (ppm)	20,20 ± 1,96
Ca <sup>++</sup> intercambiable (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	8,52 ± 1,55
Mg <sup>++</sup> intercambiable (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	0,93 ± 0,55
Na <sup>+</sup> intercambiable (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	0,80 ± 0,22
K <sup>+</sup> intercambiable (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	1,46 ± 0,54
Capacidad de Intercambio Catiónico (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	13,30 ± 1,01
Se total (mg kg <sup>-1</sup> )	0,49 ± 0,21

<sup>a</sup>Los métodos analíticos siguieron la metodología argentina estandarizada (SAMLA) (SAGPyA, 2004). El Se total se determinó según Sigrist et al. (2012). Los resultados se expresan como la media (n = 3) ± error estándar (ee).

### **2.2.2. Aplicación de tratamientos foliares**

La aplicación foliar de sales de Selenio (Se) se realizó al inicio de la formación de la cabeza (03/07/2015, momento de la aparición del botón floral) utilizando soluciones de selenato o selenito ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , Sigma-Aldrich, USA) a dosis de 25 y 50 g ha<sup>-1</sup>, conteniendo Rizospray Extremo® al 0,1 % (RIZOBACTER, Argentina) como coadyuvante. Para los tratamientos sin aporte de Se (control) se utilizó agua destilada en presencia del coadyuvante. Las plantas control se cultivaron en las mismas condiciones que las plantas tratadas con Se, pero se separaron físicamente con una lámina de plástico para evitar la contaminación cruzada durante la pulverización. La aplicación, de 10 ml para cada planta, se realizó por la tarde (entre las 17:00 y las 19:00 h) con un pulverizador de presión de 0,5 L de capacidad en un día seco, soleado y sin viento y se repitió después de una semana hasta llegar a dosis finales de 50 y 100 g Se ha<sup>-1</sup> en los tratamientos. Las plantas fueron cosechadas en madurez comercial (23/08/2015, cuando las cabezas alcanzaron su tamaño máximo y presentaron botones florales verdes compactos) y transportadas inmediatamente al laboratorio en cámara frigorífica para preservar su frescura.

### **2.2.3. Determinación de parámetros de rendimiento**

Para el análisis del crecimiento y rendimiento al final del experimento se determinaron como parámetros indicadores la altura de la planta, el área foliar, el peso de la cabeza y la materia seca.

En el caso de la altura de la planta se midieron diez plantas por tratamiento desde la línea del suelo hasta el meristema apical. La estimación del área foliar (LA) se realizó mediante el modelo de regresión desarrollado por Stoppani et al. (2003):

$$LA = 3.07 \times W + 1.13 \times W^2$$

donde W es el ancho de la hoja y se midió de extremo a extremo entre los lóbulos más anchos de la lámina perpendicular a la nervadura central de la lámina.

Las cabezas principales de brócoli, como partes consumibles, se cortaron dejando un tallo de 5 cm, se pesaron y reportaron como peso fresco de la cabeza. Luego, las cabezas, tallos y hojas de brócoli cosechados se secaron a 65 °C hasta peso constante para calcular el porcentaje de materia seca. Posteriormente se utilizaron estas muestras de tejidos secos para evaluar la concentración de selenio.

#### **2.2.4. Mediciones de intercambio de gases y determinación del índice de clorofila**

Las medidas de intercambio gaseoso se realizaron a diferentes horas del día (9, 11, 13, 15 y 17 h), una semana después de la última aplicación de selenio. La tasa fotosintética neta (FN), la tasa de transpiración neta (TRN) y la eficiencia del uso del agua (EUA) de las hojas maduras superiores se midieron con un sistema de fotosíntesis portátil CIRAS-2 (PP Systems Ltd., Reino Unido) en condiciones de luz natural donde la radiación fotosintéticamente activa (RFA) fue de 780-1915  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y la temperatura del aire fue de 20-35,8 °C. Se registraron de cuatro a cinco valores estables de diferentes plantas en cada hora del día. Las mediciones de RFA durante el día se realizaron con un sensor cuántico de línea RFA modelo LI-191R (LI-COR, Lincoln, EE. UU.). El índice de clorofila se determinó en campo, en 3 hojas por planta, con un medidor de clorofila SPAD-502 (Minolta Camera Co., Ltd, Osaka, Japón) en los mismos momentos que se midió la fotosíntesis (Markwell et al., 1995).

#### **2.2.5. Medición del color superficial**

El color se evaluó con un colorímetro (Minolta CR-400, Osaka, Japón) midiendo los valores L (luminosidad),  $a^*$  (valor del eje a en la escala de Hunter) y  $b^*$  (valor del eje b en la escala de Hunter) en la superficie de cada cabeza de brócoli. La fuente de luz utilizada fue D65/10° la cual fue calibrada con placa blanca. El ángulo de tonalidad HUE ( $h^\circ$ ) se calculó como  $h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  cuando  $a^* > 0$  y  $b^* > 0$ , o como  $h^\circ = 180 - \tan^{-1}(b^*/a^*)$  cuando  $a^* < 0$  y  $b^* > 0$ . Es importante recordar que  $h^\circ$  varía continuamente de 0° a 360°, con 90° indicando amarillo y 180° indicando verde (Duarte-Sierra et al., 2017). Se tomaron medidas por triplicado, en cinco puntos de cada cabeza y luego se promediaron.

#### **2.2.6. Diámetro de la cabeza y firmeza**

El diámetro de la cabeza de brócoli se midió con un calibrador digital. Las medidas, realizadas por triplicado, se tomaron en dos lados opuestos en la zona ecuatorial de cada cabeza. Los promedios de los valores obtenidos se expresaron en centímetros.

Las mediciones de firmeza de la superficie se realizaron en tres posiciones diferentes en cada cabeza, utilizando un durómetro digital Turoni con punta esférica (modelo 53215TT; T.R. Turoni, Forli, Italia). Los promedios de los valores obtenidos se reportaron como unidades de firmeza.

### **2.2.7. Cuantificación de selenio**

Las concentraciones de selenio total en hojas y cabezas de brócoli se determinaron después de digestión con ácido nítrico y reducción con ácido clorhídrico, siguiendo el método descrito por Foster y Sumar (1996). Los productos de digestión se analizaron mediante un método FI-HGAAS optimizado (espectrometría de absorción atómica de generación de hidruro e inyección de flujo) desarrollado por Sigrist et al. (2012). Se utilizó como detector un espectrómetro de absorción atómica de llama Perkin-Elmer Modelo 3110 (Connecticut, EE. UU.), equipado con una lámpara de cátodo hueco de selenio Photron (Victoria, Australia) ajustada a una longitud de onda de 196,0 nm, una corriente de lámpara de 12 mA y un ancho de rendija de 0,7 nm. Se usó un sistema de generación de hidruro de inyección de flujo Perkin-Elmer FIAS 100 (Connecticut, EE. UU.) con un atomizador de tubo de cuarzo calentado (10 mm de d.i. x 160 mm de longitud) para la generación de hidruro y se acopló al AAS.

Para la cuantificación en las muestras se utilizó el método de adiciones estándar. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), basados en 10 desviaciones estándar de los blancos, fueron de 0,15 y 0,45 mg kg<sup>-1</sup> de selenio; respectivamente. Se incluyó material de referencia certificado (DOLT-3 NRC, material de hígado de mielga para metales traza) en cada lote de muestras para el control de calidad, y la recuperación promedio fue del 103 %. Cada muestra se analizó al menos por duplicado.

### **2.2.8. Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial considerando como factores de clasificación: el tratamiento con selenio (a 5 niveles: control sin selenio y las 2 sales a 2 concentraciones) y el tiempo si corresponde, considerando en el análisis la interacción entre los factores. Por otro lado, no se incluyó como factor estadístico en el estudio el cultivar, ambos cultivares se analizaron por separado. Se incluyeron dos cultivares debido a que, como el efecto puede ser dependiente del cultivar, tener más chances de observar el mismo. Además, en aquellos casos donde se obtiene un resultado similar, permite inferir que dicho efecto puede ser general. Los factores analizados fueron incluidos en las leyendas de las figuras y tablas.

La significación de la diferencia entre los valores medios se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD). La correcta aplicación de ANOVA se comprobó mediante distribución normal residual (prueba de Shapiro-Wilks, gráficos QQ) y homocedasticidad (prueba de Levene, gráficos

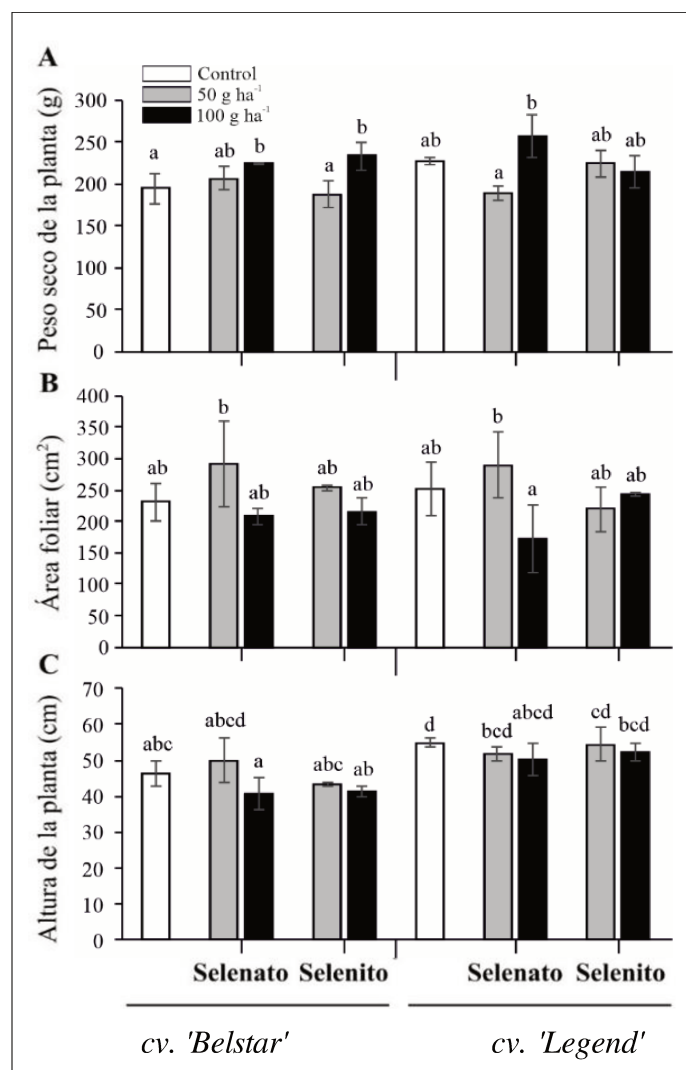


de dispersión de residuos). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ . Los datos de los experimentos se expresaron como media  $\pm$  ee (error estándar) y se analizaron estadísticamente utilizando el software estadístico InfoStat (Di Renzo et al., 2017).

## **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.3.1. El selenio modifica el crecimiento y aumenta el rendimiento de manera diferencial en los cultivares de brócoli.**

En primer lugar, para considerar si las aplicaciones de selenio que se iban a probar podían ser aplicables en el ámbito productivo, se consideró necesario evaluar su efecto en los parámetros de rendimiento agronómicos más relevantes. De acuerdo a los parámetros de crecimiento evaluados, el peso seco de las plantas aumentó significativamente con la aplicación de  $100 \text{ g ha}^{-1}$  de selenato o selenito en el cultivar 'Belstar' con respecto a las plantas control, mientras que no tuvieron efecto sobre el cultivar 'Legend' (Figura 6A). El área foliar de brócoli y la altura de la planta no se vieron afectados significativamente por la aplicación de selenio en ambos cultivares analizados (Figura 6B, C, respectivamente), si bien pudo observarse que el cultivar 'Legend' presentó mayor altura que el cultivar 'Belstar'.



**Figura 6.** Efectos de los tratamientos con selenio en ambos cultivares de brócoli sobre el peso seco de la planta (A), el área foliar (B) y la altura de la planta (C). ANOVA a un factor: tratamiento con selenio. Los resultados se expresan como la media ( $n = 10$ )  $\pm$  ee. Los valores que poseen al menos una letra en común, no son estadísticamente diferentes entre tratamientos, a un nivel de significación de  $P < 0,05$  según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

La aplicación de ambas dosis de selenato y la dosis mayor de selenito indujo un aumento significativo en el peso fresco de la cabeza (PF) en el cultivar 'Belstar' (Tabla 4). La aplicación foliar de 50 g ha<sup>-1</sup> y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato aumentó el PF en 49 % y 102 %, respectivamente; mientras que 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito aumentó el PF en un 54 %, en comparación con la condición de control (Tabla 4). En el caso del cultivar 'Legend', no se observaron diferencias en el peso fresco para los diferentes tratamientos (Tabla 4).

Además, el contenido de materia seca de las cabezas no se vio afectado significativamente por el selenio ni por el cultivar de brócoli (Tabla 4). En este caso se puede notar nuevamente que los diferentes cultivares de brócoli responden diferencialmente a los tipos de sales de selenio aplicadas en comparación con sus respectivos controles.

**Tabla 4.** Efecto de la aplicación foliar de selenio sobre parámetros de rendimiento de las cabezas de brócoli.

<i>Cultivar</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Peso fresco (g)</i>	<i>Materia seca (%)</i>
<b>'Belstar'</b>	<i>Control</i>	233,50 ± 29,16 a	9,89 ± 1,69 a
	<i>Selenato</i> 50 g ha <sup>-1</sup>	347,50 ± 60,65 b	10,45 ± 3,29 a
	100 g ha <sup>-1</sup>	472,67 ± 27,42 c	9,61 ± 0,30 a
	<i>Selenito</i> 50 g ha <sup>-1</sup>	254,25 ± 13,87 ab	9,41 ± 0,55 a
	100 g ha <sup>-1</sup>	360,20 ± 41,66 bc	8,92 ± 0,14 a
<b>'Legend'</b>	<i>Control</i>	305,50 ± 28,50 ab	7,94 ± 1,52 a
	<i>Selenato</i> 50 g ha <sup>-1</sup>	262,33 ± 12,67 ab	9,22 ± 0,48 a
	100 g ha <sup>-1</sup>	286,67 ± 33,20 ab	9,62 ± 0,03 a
	<i>Selenito</i> 50 g ha <sup>-1</sup>	304,33 ± 61,50 ab	10,43 ± 3,20 a
	100 g ha <sup>-1</sup>	354,67 ± 33,78 bc	10,49 ± 2,16 a

ANOVA a un factor: tratamiento con selenio. Los resultados se expresan como la media (n = 10) ± ee. Los valores que poseen al menos una letra en común, no son estadísticamente diferentes entre tratamientos, a un nivel de significación de P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

El análisis de los parámetros de crecimiento y rendimiento indicó que la respuesta a diferentes tratamientos con selenio difirió entre los cultivares de brócoli. Se observaron resultados similares en achicoria (*Cichorium intybus* L.) donde la materia seca total de las plantas fue mayor en las plantas tratadas con selenio que en los controles en el cultivar 'Monivip', pero en 'Anivip' no hubo diferencias significativas entre las plantas tratadas y control (Germ et al., 2007). Por el contrario, la masa de cabezas no difirió entre plantas tratadas con selenio y controles en cualquiera de los cultivares (Germ et al., 2007). En coincidencia con los resultados obtenidos en este trabajo Ghasemi et al. (2016) informaron que la altura de la planta de brócoli y la materia seca de la cabeza no se vieron afectadas significativamente por la aplicación de selenio.

Por otro lado, en contraposición a nuestros resultados, Sindelarova et al. (2015) documentaron que el PF de la pella de diferentes cultivares de brócoli ('Heraklion',

'Marathon', 'Parthenon' y 'Naxos') no se fue significativamente afectado por la aplicación de selenio, mientras que este estudio se observó que el tratamiento con ambas dosis de selenato y la dosis máxima de selenito produjo, en comparación con el respectivo control, el cultivar 'Belstar', cabezas más pesadas.

Estos resultados mostraron que los tratamientos con selenio, considerando variaciones que pueden depender del cultivar, del tipo de sal de selenio y de la dosis evaluada, no afectan o incluso mejoran los parámetros de producción. En este caso, se obtuvo un efecto positivo en el contenido de agua de las cabezas, y por lo tanto aumentando el rendimiento consumible de brócoli en condiciones de campo, en el cultivar 'Belstar'. En su conjunto, las diferencias obtenidas dan indicio de que hay un efecto del cultivar, y posiblemente de su interacción con el medio ambiente, que condicionarían el efecto obtenido.

### **2.3.2. Las respuestas de los parámetros fotosintéticos al tratamiento con selenio difieren según el cultivar de brócoli.**

Para analizar si la aplicación de selenio presenta un efecto sobre el crecimiento de las plantas de brócoli en cuanto a su capacidad de captar dióxido de carbono, se realizó el estudio de los respectivos parámetros fotosintéticos en diferentes momentos del día (Figura 7). En 'Belstar' no se observaron variaciones la tasa fotosintética neta (FN), a excepción del tratamiento con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato el cual aumentó significativamente la misma a las 15 h, para luego volver a los valores de control a las 17 h (Figura 7A). En 'Legend', donde mayoritariamente no hubo variaciones tampoco, la aplicación foliar de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato redujo significativamente el valor de FN al nivel más bajo a las 13 h (Figura 7B).

La tasa de transpiración neta (TRN) se redujo significativamente con el tratamiento de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato en 'Legend' a las 9 h, sin presentar diferencias en los demás tiempos de medición tanto en este como en los demás tratamientos con respecto al control. En cambio, en el cv. 'Belstar', se observó una reducción significativa con la aplicación de selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (9 h, 13 h y 15 h), de selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (9 h y 15 h) y de selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (15 h) (Figura 7C).

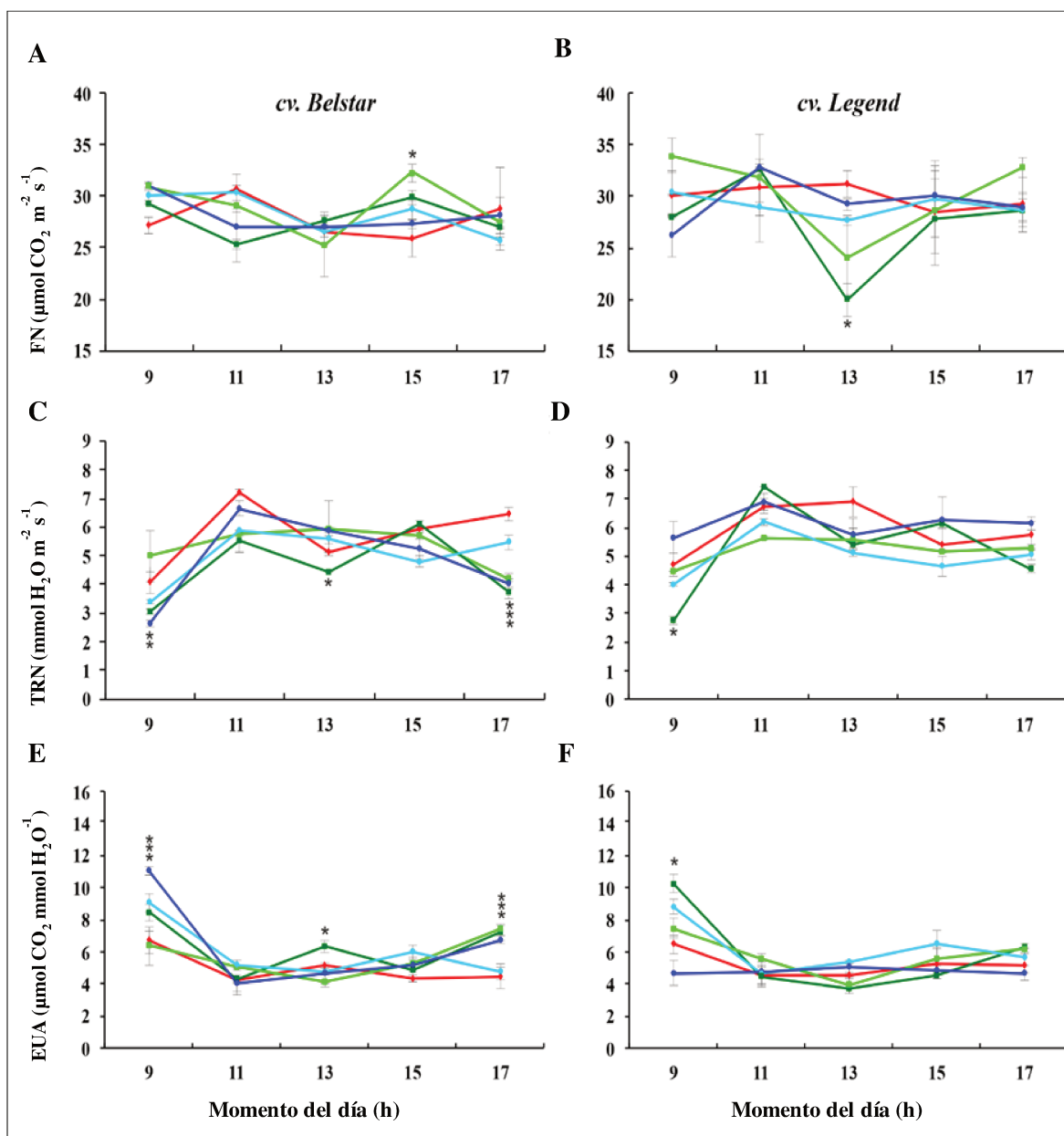
En general ha sido planteado que la aplicación con selenio en su mayoría mejora o no influye en la fotosíntesis según la especie de planta examinada y el método de aplicación (Mechora et al., 2017; Yin et al., 2019). Por ejemplo, en arroz, el riego de raíces con selenio mejoró notablemente el crecimiento, asociado con el aumento simultáneo de FN, mientras que la aplicación foliar de selenio no produjo cambios en la fotosíntesis y la

acumulación de biomasa (Yin et al., 2019). En plántulas de brócoli, la aplicación de selenio tuvo un pequeño efecto en tiempos iniciales disminuyendo la fotosíntesis, para luego equipararse a los controles (Mechora et al., 2017). Por otro lado, el incremento en FN por tratamiento foliar en el cv. 'Belstar', podría corresponder al incremento en el peso seco de la planta luego del tratamiento con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato (Figura 7A).

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, la eficiencia en el uso del agua (EUA), definida como la cantidad de carbono asimilado como biomasa por unidad de agua utilizada por el cultivo (Hatfield & Dold, 2019), aumentó significativamente con la aplicación foliar de selenio en el cultivar 'Belstar', durante diferentes horas del día (Figura 7E), mientras que para el cultivar 'Legend', solo el tratamiento con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato aumentó significativamente la EUA a las 9 h (Figura 7F).

En ambos casos, el aumento de EUA, se debe principalmente a la reducción de TRN y no al aumento de FN (Figura 7). Además, las dosis y sal de selenio aplicadas no solo se relacionaron con el nivel de aumento de la EUA, sino también con el nivel de aumento del PF de la cabeza, sin modificar el contenido de materia seca (Tabla 4).

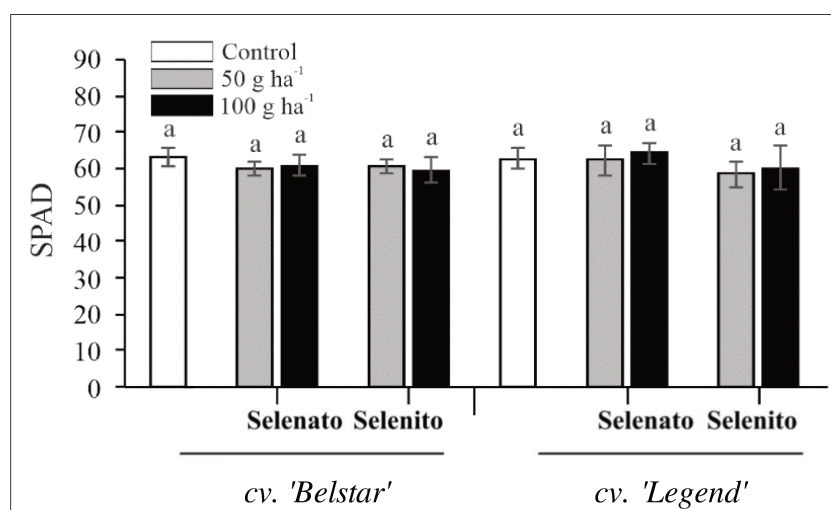
Como se ha visto en otras plantas, los tratamientos con selenio podrían dar como resultado respuestas promotoras del crecimiento (Hartikainen, & Xue, 1999; Djanaguiraman et al., 2005; Yassen et al., 2011; Puccinelli et al., 2017). Por ejemplo, el número de brotes y el rendimiento aumentaron significativamente cuando se aplicó foliarmente selenito o selenato en las plantas de té (Hu et al., 2003). Sin embargo, estas respuestas están relacionadas con una concentración conveniente de selenio aplicada que reforzaría el sistema de defensa antioxidante de las plantas (Hartikainen, & Xue, 1999; Cartes et al., 2005; Hasanuzzaman et al., 2010). De esta forma, el aumento observado en el PF de cabeza de brócoli podría estar relacionado con la mejora de la capacidad antioxidante de las plantas frente al estrés oxidativo (Ghasemi et al., 2016).



**Figura 7.** Efectos de la aplicación foliar de selenio en la tasa fotosintética neta de la hoja (A, B), la tasa de transpiración unitaria (C, D), y la eficiencia en el uso del agua (E, F) de brócoli cv. 'Belstar' (A, C, E) y cv. 'Legend' (B, D, F). Los tratamientos foliares fueron: control (-♦-), selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (-■-), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (-■-), selenito 50 g ha<sup>-1</sup> (-●-), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (-●-). ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 10) ± ee. El asterisco representa diferencias significativas entre tratamientos a un nivel de significancia de P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

Por último, se obtuvieron mediciones del índice SPAD, el cual no mostró ninguna diferencia entre los tratamientos con selenio y los cultivares de brócoli (Figura 8). En general, los valores del medidor SPAD son proporcionales a la cantidad de clorofila presente en el tejido vegetal y sirven como un buen indicador no destructivo de la misma (El-Mogy et al., 2019).

En reportes previos se observó, de manera similar, que la aplicación de suplementos de selenio no mostró un efecto significativo sobre el contenido de clorofila en la colza (Ulhasan et al., 2019), o en el trigo (Filek et al., 2019) bajo condiciones de control. Además, las semillas de Stevia tratadas con selenito de sodio desarrollaron plántulas con un contenido total de clorofila similar al de las plantas de control (Shahverdi et al., 2017). Por otro lado, en pepino, se observó una disminución significativa en el nivel de clorofila a una concentración de selenio que no inhibía el crecimiento, en comparación con concentraciones que provocan la inhibición (Hawrylak-Nowak et al., 2015). Además, la caída de las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos se considera un indicador más sensible de la fitotoxicidad por selenio que la reducción del PF o del área foliar (Hasanuzzaman et al., 2020). En conclusión, se pudo establecer que la ausencia de cambios en el índice SPAD en hojas de brócoli, es un buen indicio de que las concentraciones de selenio aplicadas no fueron tóxicas para las plantas.



**Figura 8.** Efectos de la aplicación foliar de selenio sobre el índice de verdor foliar (SPAD) de brócoli cultivares 'Belstar' y 'Legend'. ANOVA a un factor: tratamiento con selenio. Los valores que poseen al menos una letra en común, no son estadísticamente diferentes entre tratamientos, a un nivel de significación de  $P < 0,05$  según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

En base a los resultados expuestos se puede concluir que, en general, los parámetros fotosintéticos de las plantas de brócoli no se afectan con los tratamientos foliares de las sales de selenio. Por otro lado, en ciertos tratamientos, hay un efecto de mejora de estos parámetros, en concordancia con los valores obtenidos de rendimiento en el apartado anterior.

### **2.3.3. La aplicación foliar de selenio no modifica la calidad comercial de las cabezas de brócoli al momento de la cosecha.**

El aspecto visual de las cabezas de brócoli es un factor crítico en la evaluación de la calidad del producto por parte del comerciante y del consumidor al momento de las decisiones de compra, siendo el rasgo de calidad más importante que determina su comerciabilidad y valor económico (Dixon, 2007). Por lo tanto, en este estudio analizamos si la aplicación foliar de selenio modifica los parámetros relacionados al momento de la cosecha. En general, no hubo modificaciones en los parámetros relacionados al color, salvo en el tratamiento con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato, el cual aumentó significativamente el ángulo de tonalidad Hue (h°) en 'Belstar', en comparación con el control, indicando una mayor presencia de color verde y menos de amarillo (Tabla 5). Por otro lado, no hubo cambios en la luminosidad, a excepción del tratamiento con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito, el cual incrementó significativamente el valor de este parámetro en 'Belstar'.



**Tabla 5.** Efecto de la aplicación foliar de selenio sobre la calidad comercial de las cabezas de brócoli al momento de cosecha.

Cultivar	Tratamiento	Color		Diámetro	Firmeza
		Hue	Luminosidad		
		$^{\circ}h$	$L$	$cm$	$shore$
'Belstar'	Control	108,80 $\pm$ 2,04a	38,77 $\pm$ 1,35a	14,60 $\pm$ 1,10a	24,72 $\pm$ 2,44a
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	121,20 $\pm$ 5,39b	40,06 $\pm$ 0,98ab	16,00 $\pm$ 0,91ab
		100 g ha <sup>-1</sup>	113,77 $\pm$ 1,21ab	39,72 $\pm$ 0,93ab	18,67 $\pm$ 0,33b
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	115,08 $\pm$ 1,60ab	38,87 $\pm$ 2,32a	15,00 $\pm$ 0,54a
		100 g ha <sup>-1</sup>	111,27 $\pm$ 2,94a	42,86 $\pm$ 1,11b	16,30 $\pm$ 0,69ab
	Control	106,91 $\pm$ 3,04a	38,86 $\pm$ 0,91a	16,17 $\pm$ 1,83ab	22,10 $\pm$ 2,48a
'Legend'	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	111,38 $\pm$ 2,28a	38,15 $\pm$ 1,08a	14,50 $\pm$ 1,04a
		100 g ha <sup>-1</sup>	111,03 $\pm$ 3,34a	39,41 $\pm$ 1,79ab	15,75 $\pm$ 0,43ab
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	113,31 $\pm$ 1,29ab	39,16 $\pm$ 0,60a	13,83 $\pm$ 0,93a
		100 g ha <sup>-1</sup>	110,49 $\pm$ 3,14a	41,02 $\pm$ 0,47ab	15,00 $\pm$ 0,58a
	Control	106,91 $\pm$ 3,04a	38,86 $\pm$ 0,91a	16,17 $\pm$ 1,83ab	22,10 $\pm$ 2,48a
	Selenato	111,38 $\pm$ 2,28a	38,15 $\pm$ 1,08a	14,50 $\pm$ 1,04a	20,23 $\pm$ 2,93a

ANOVA a un factor: tratamiento con selenio. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia  $P < 0,05$  según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

El desverdizado o amarillamiento causado por la degradación de la clorofila es la característica más importante que determina la pérdida de calidad poscosecha en el brócoli. El amarillamiento es causado por el desensamblaje de los cloroplastos y el catabolismo de la clorofila (Fukasawa et al., 2010). El etileno parece ser el principal promotor de la senescencia y el amarillamiento (King & Morris, 1994). Informes anteriores indicaron que los frutos de tomate y la lechuga enriquecidos con selenio retrasan la maduración y la senescencia, respectivamente, a través de una disminución en la biosíntesis de etileno, debido a la aplicación de selenio (Pezzarossa et al., 2014; Malorgio et al., 2009). Además, se reportó que cuando las cabezas de brócoli recién cortadas se remojaron durante 20 min en agua con 2 mg kg<sup>-1</sup> de selenito, hubo un efecto positivo en el mantenimiento de la calidad sensorial y poscosecha al reducir la intensidad respiratoria y la producción de etileno (Lv et al., 2017).

Dos parámetros que son muy importantes desde el punto de calidad visual de las pellas, son el diámetro de la misma y la dureza, dado que una pella de menor diámetro y mayor dureza se asocia con un producto más fresco para el consumo. Estos parámetros fueron analizados en las plantas tratadas con las distintas sales de selenio al momento de la cosecha. El único valor de diámetro de pella significativamente mayor que el control se

obtuvo después de la aplicación foliar de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato en 'Belstar' (Tabla 5), mientras que los demás tratamientos no presentaron cambios significativos con respecto al testigo en ambos cultivares. En coincidencia con los resultados obtenidos, Ghasemi et al. (2016) también informaron que el diámetro de las cabezas de brócoli no se vio afectado significativamente por la aplicación de selenio en diferentes dosis; obteniendo diámetros dentro del rango de 12,58-16,08 cm. Asimismo, los diferentes tratamientos con selenio no afectaron significativamente la firmeza de las cabezas (Tabla 5). Si bien se ha informado previamente que la adición foliar de selenato a los perales resultó en valores más altos de firmeza de la pulpa de la fruta y redujo la pérdida de firmeza poscosecha (Pezzarossa et al., 2012). Además, Wu y Tian (2009) observaron un efecto positivo del selenio sobre la firmeza en frutos de durazno, en este caso se ha demostrado que la aplicación de selenio no disminuye la firmeza y no perjudicaría la vida útil de las frutas y verduras, en parte al evitar la reducción de la firmeza.

#### **2.3.4. La aplicación foliar de selenato o selenito aumenta notablemente el contenido de selenio de las cabezas y hojas de brócoli.**

La obtención de pellas biofortificadas en selenio, sin detrimento o con mejoras en los parámetros comerciales, fue planteado como objetivo de este capítulo. Las mediciones de selenio total arrojaron como resultado un aumento en la concentración de selenio en ambos cultivares, expresado en relación al peso seco. La concentración de selenio aumentó significativamente de manera dependiente de la dosis, independientemente de que se aplique selenato o selenito, tanto en hoja como en pella (Tabla 6). Por ejemplo, en el cv. 'Belstar', el contenido de selenio en la cabeza aumentó de 0,27 mg kg<sup>-1</sup> en las plantas de control a 2,98 y 6,98 mg kg<sup>-1</sup> en las plantas tratadas con 50 y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato, respectivamente. De manera similar, el contenido de selenio en las hojas aumentó de 0,69 mg kg<sup>-1</sup> en las plantas de control a 4,41 y 9,60 mg kg<sup>-1</sup> cuando se aplicó selenato en dosis finales de 50 y 100 g ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 6).

Si bien el nivel de concentración de selenio fue menor en la pella que en las hojas, el aumento relativo al control del contenido de selenio fue mayor en la pella (Tabla 6). Por ejemplo, en 'Belstar', el contenido de selenio en pella aumentó aproximadamente 1000 % y 2400 % en plantas tratadas con 50 y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato en comparación con las plantas control, respectivamente. De manera similar, el contenido de selenio en las hojas de las plantas tratadas con las mismas dosis de selenato fue considerablemente mayor (alrededor de 540-1300 %) que en las plantas control. Estos resultados muestran que la

aplicación foliar de diferentes formas de selenio en plantas de brócoli, al comienzo de la formación de la cabeza, tiene una translocación efectiva de hoja a cabeza de selenio en condiciones de campo.

**Tabla 6.** Efecto de la aspersión foliar de selenio sobre la concentración de selenio en la cabeza y en las hojas de plantas de brócoli.

<i>Tratamiento</i>		<i>Concentración de selenio (mg kg<sup>-1</sup> MS)</i>	
		<i>Cabeza</i>	<i>Hojas</i>
<b><i>cv. 'Belstar'</i></b>			
	Control	0,27 ± 0,11a	0,69 ± 0,30a
<i>Selenato</i>	50 g ha <sup>-1</sup>	2,98 ± 0,46bc	4,41 ± 0,32b
	100 g ha <sup>-1</sup>	6,89 ± 1,13e	9,60 ± 0,82c
<i>Selenito</i>	50 g ha <sup>-1</sup>	3,49 ± 0,48cd	3,64 ± 0,14b
	100 g ha <sup>-1</sup>	6,54 ± 0,16e	7,57 ± 1,62c
<b><i>cv. 'Legend'</i></b>			
	Control	0,68 ± 0,22a	0,95 ± 0,24a
<i>Selenato</i>	50 g ha <sup>-1</sup>	2,99 ± 0,32bc	3,52 ± 0,4b
	100 g ha <sup>-1</sup>	6,61 ± 1,06e	8,27 ± 2,16c
<i>Selenito</i>	50 g ha <sup>-1</sup>	3,13 ± 0,34bcd	4,01 ± 0,09b
	100 g ha <sup>-1</sup>	5,41 ± 0,39de	6,69 ± 1,48c

Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee . ANOVA a un factor. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia  $P < 0,05$  según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

La efectividad de este método para la biofortificación con selenio ha sido exitosamente reportada en varios cultivos como arroz, zanahoria, repollo y papa (Hu et al., 2002; Kápolna et al., 2009; Mechora et al., 2014; Poggi et al., 2000). Sindelarova et al. (2015) informaron que el brócoli acumula selenio principalmente en la pella y menos en las hojas en aplicación foliar de selenato de sodio a dos dosis (25 y 50 g ha<sup>-1</sup>). Además, reportaron que los contenidos de selenio aumentaron en los tratamientos selenizados, pero de manera dosis-dependiente solo en dos cultivares analizados ('Parthenon' y 'Naxos'). Para los demás cultivares ('Heraklion' y 'Marathon'), la dosis de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato no resultó en un aumento significativo del contenido de selenio en cabezas en comparación con la dosis más baja aplicada (25 g ha<sup>-1</sup>). En nuestro caso, en base a los resultados obtenidos, se pudo observar que el contenido en hoja es similar o mayor al obtenido en pella, y esa diferencia

es más notoria en el caso de las sales de selenato. De estos resultados se puede notar que los diferentes cultivares de brócoli responden diferencialmente a las aplicaciones.

Por otro lado, en este trabajo, el mayor contenido de selenio observado en pella fue de  $1,01 \text{ mg kg}^{-1}$  en el cultivar 'Heraklion' (Sindelarova et al., 2015). Este resultado fue consistente con los hallazgos de otras investigaciones previas que reportaron que la mayor concentración de selenio en cabeza de brócoli ( $1,41 \text{ mg kg}^{-1}$ ) se registró después del tratamiento con  $50 \text{ g ha}^{-1}$  de selenato (Ghasemi et al., 2016). Es importante resaltar que en nuestro estudio obtuvimos contenidos de selenio en cabeza entre 2 y 4 veces mayores aproximadamente en ambos cultivares y tipo de sales, en la menor y mayor dosis respectivamente.

Por lo expuesto, puede observarse que la capacidad de acumulación de selenio del brócoli, en las condiciones de aplicación utilizadas en este trabajo, induce un aumento en comparación de otros trabajos similares. Aquí, en los dos cultivares probados, la capacidad de aumentar significativamente el contenido de selenio fue de manera dependiente de la dosis, pero independientemente de la forma de selenio aplicada.

A su vez, la diferencia en la cantidad de selenio acumulado podría deberse al uso de coadyuvante para la preparación de la solución de aplicación foliar, ya que en ambos reportes previos solo se utilizó una solución acuosa de selenato de sodio para aspersión foliar, lo cual debería confirmarse mediante comparaciones en el mismo experimento (Ghasemi et al., 2016; Sindelarova et al., 2015). Los resultados de la aspersión dependen de las características de la superficie de la hoja, como la presencia de pelos, la composición química de la cera epicuticular o la deposición de plaquetas de cera (Pezzarossa et al., 2012). Rich y Pokroy (2018) informaron que la superficie de las hojas de brócoli es súper repulsiva y autolimpiante con respecto al agua. Por ello, es muy recomendable utilizar coadyuvantes durante la aplicación foliar en brócoli para facilitar la entrada de selenio en la planta. Además, los coadyuvantes también pueden minimizar muchos problemas de aplicación aérea, como la deriva de la aspersión, lo que reduce el riesgo ambiental asociado con las aplicaciones foliares (Celen, 2010). Al mismo tiempo, la comparación del impacto ambiental a largo plazo de la aplicación de selenio directamente en los suelos o como rociado foliar ha demostrado que la aplicación foliar reduce la acumulación potencial de selenio en el medio ambiente (Hossain et al., 2021). Otro aspecto novedoso a destacar de este trabajo consistió en la utilización de la sal de selenito de sodio, dado que en los reportes previos solo se utilizaron sales de selenato. Las sales de selenito en principio, son más económicas en calidad laboratorio, pero sobre

todo en cantidades importantes para utilizar en aplicaciones a campo. Debido a que los resultados obtenidos son similares, entre ambo tipos de sales, podrían utilizarse indistintamente.

Varios informes sugieren el consumo de vegetales selenizados como una posible fuente de ingesta de selenio para humanos (Mechora et al., 2014; Pezzarossa et al., 2014; Sindelarova et al., 2015). El Panel de Oxidantes Dietéticos y Compuestos Relacionados de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos estableció un límite superior tolerable para el selenio en  $400 \mu\text{g día}^{-1}$  y recomendó una ingesta de  $55 \mu\text{g día}^{-1}$ , tanto para hombres como para mujeres (NAS, 2000). Este nivel también fue recomendado por la FAO/OMS y el Grupo de Expertos en Vitaminas y Minerales del Reino Unido (EGVM, 2002; FAO/OMS, 1998). Teniendo en cuenta que el contenido máximo de selenio en cabezas fue de aproximadamente  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  de materia seca en 'Belstar' y 'Legend' después del tratamiento de  $50 \text{ g ha}^{-1}$  de selenio, para un promedio de 10 % de materia seca (Tabla 4), se puede estimar que 1 kg de brócoli fresco contendrá  $300 \mu\text{g}$  de selenio. De esta manera, con la ingesta de una sola porción comestible de brócoli (200 g de cabeza), será posible incorporar  $60 \mu\text{g}$  de selenio, que ronda aproximadamente un 15 % de la cantidad recomendada semanal. Así, la producción de brócoli biofortificado en condiciones de campo con estos niveles de contenido de selenio podría ser una buena fuente de ingesta de selenio, y no debería representar un riesgo de toxicidad para el consumo humano.

## 2.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se analizó el efecto de un sistema novedoso de aplicación foliar de sales de selenato y selenito sobre el crecimiento de las plantas de brócoli, el rendimiento, la fotosíntesis, la calidad comercial de las cabezas y el contenido de selenio, al momento de la cosecha. Nuestros resultados muestran que los parámetros de crecimiento de la planta (área foliar y altura) no fueron influenciados por los tratamientos foliares en ambos cultivares evaluados ('Belstar' y 'Legend'); mientras que el peso seco de la planta aumentó significativamente en 'Belstar'. De manera similar, el PF de la cabeza aumentó en 'Belstar' en comparación con el tratamiento de control. Sin embargo, los tratamientos con selenio previos a la cosecha, no tuvieron efecto sobre el contenido de materia seca de la cabeza en ambos cultivares. Además, se observó un aumento en la tasa de transpiración en 'Belstar'; lo que aumentó la eficiencia en el uso del agua. Por otra parte, se obtuvieron incrementos significativos en el contenido de selenio en hojas y cabezas de ambos cultivares; independientemente del tipo de sal de selenio utilizada (selenato o selenito) y

sin disminuir la calidad comercial de la cabeza en el momento de la cosecha. Comparado con otros trabajos, se destaca que pudimos obtener una mayor asimilación de selenio en hojas y pellas de brócoli, a través de una aplicación foliar.

## **CAPÍTULO 3**

---

### **EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE SELENIO SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD COMERCIAL EN LA VIDA POSCOSECHA DE BRÓCOLI**

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Las hortalizas son valiosas para los consumidores debido a su alto contenido vitaminas y moléculas antioxidantes, de las cuales las del orden de las Brassicales son unas de las más consumidas en todo el mundo. En particular, en este grupo se encuentra el Brócoli (*B. oleracea* L. var. *italica*), por su elevada calidad nutricional (Dixon, 2007). La parte comestible del brócoli son las inflorescencias, que se cosechan mientras las cabezas florales, están totalmente inmaduros, con los sépalos rodeando completamente la flor. El proceso de cosecha les impide mantener la homeostasis y también produce la aparición de síntomas de senescencia (Perini et al., 2017, Lemoine et al., 2007).

La cosecha produce cambios metabólicos significativos, que aumentan el proceso de senescencia dando lugar a un producto más perecedero (Costa et al., 2005a). Posteriormente, desde el momento de la cosecha hasta su consumo, las diversas etapas que atraviesa (transportes, centralización en los mercados, transporte a los puntos de venta, exposición en las góndolas) implican un deterioro que se hace progresivo. Durante el período de poscosecha, las inflorescencias sufren decoloración y amarillamiento de los sépalos acompañado de degradación de la clorofila (Lemoine et al., 2007), pierden su dureza y reducen su valor nutricional, como principales procesos nocivos, con un alto impacto en la calidad comercial (Jia et al., 2009; Lemoine et al., 2007).

Con el fin de preservar la calidad comercial y nutricional durante la vida poscosecha del brócoli, varios trabajos de investigación han estudiado el efecto de diferentes tratamientos luego de la cosecha, tales como la refrigeración (Serrano et al., 2006), aplicación de 1-MCP (Gómez-Lobato et al., 2012a), UV (Aiamla-or et al., 2009), calor (Costa et al., 2006), atmósferas modificadas (Barth et al., 1993), y cosechas en diferentes momentos del día (Hasperué et al., 2011), entre otros. En contraposición, la influencia de las condiciones previas a la cosecha, tales como el tipo de suelo, el clima, el estrés de las plantas y el manejo del cultivo, durante la vida útil poscosecha de las hortalizas, ha sido poco analizado hasta la fecha.

Como se ha mencionado anteriormente, las hortalizas que pertenecen a la familia de las Brasicáceas (Brassicaceae) tienen una mayor capacidad de absorción y enriquecimiento de selenio, particularmente el brócoli que se considera como uno de los grandes acumuladores, esta característica les otorga una ventaja nutracéutica (Wiesner-Reinhold et al., 2017). Dado que el selenio es un micronutriente crucial para la salud y el desarrollo humano, que en su mayoría se incorpora a la cadena alimentaria a través de los cultivos,



varios estudios han reportado la aplicación de selenio para llegar a una producción comercial de brócoli enriquecido con selenio, pero en ningún caso su efecto fue estudiado en poscosecha.

En el capítulo previo, se evaluó el impacto de la aplicación foliar de diferentes formas minerales de selenio (selenato de sodio y selenito de sodio), a dos dosis diferentes (50 y 100 g ha<sup>-1</sup>), y el uso adicional de un coadyuvante en plantas de brócoli cultivadas en condiciones de campo. Los resultados indican que el uso de ambas sales de selenio podría ser una estrategia superadora para obtener brócoli enriquecido con selenio, sin afectar, al momento de la cosecha, la calidad comercial de las cabezas.

En este capítulo el objetivo propuesto fue analizar si esta práctica simple, que permite mejorar la calidad nutricional del brócoli utilizando una tecnología de bajo costo, tiene un efecto positivo en su vida útil poscosecha, por el contrario, para analizar si no genera un efecto adverso lo que impediría su utilización a escala productiva.

Además, en este capítulo, se consideró un abordaje de ensayos empleando diferentes metodologías de cultivo, intensivo en macetas bajo invernadero y el cultivo a campo. Los resultados logrados con el ensayo exploratorio en invernadero ofrecen una aproximación, considerando las condiciones controladas a las cuales se trabaja y se comparan y complementan con los resultados obtenidos en el ensayo en el campo (escala de experimentación real en el cultivo de brócoli).

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Obtención de plantas biofortificadas con selenio**

#### ***3.2.1.1. Material vegetal***

Las plantas de brócoli (*B. oleracea* var. *itálica*) utilizadas en el presente trabajo correspondieron a dos híbridos comerciales, cultivares 'Belstar' F1 (Bejo, Warmenhuizen, The Netherlands) y 'Legend' F1 (Nongwoo Bio, Gyunggi-do, Republic of Korea). Las características de los mismos fueron descriptas en el Capítulo 2, sección materiales y métodos.

#### ***3.2.1.2. Condiciones de crecimiento vegetal***

Previamente al inicio del estudio las semillas de brócoli se seleccionaron, de acuerdo con la uniformidad de tamaño y las características externas, y se descartaron aquellas con alteraciones y malformaciones. Las plántulas se iniciaron a partir de semillas en bandejas multiceldas de poliestireno® expandido de 228 celdas con sustrato compuesto por

GROW MIX Terrafertil para obtener un correcto desarrollo del sistema radical, en condiciones de cultivo controladas, fecha de siembra 25/04/2017. Posteriormente, el 01/06/2017 las plántulas se trasplantaron para su crecimiento bajo condiciones estándares, según parámetros determinados por la Agencia de Extensión Rural del INTA Monte Vera para cultivos hortícolas de la zona Santa Fe. Los experimentos se realizaron en el Campo Experimental de Cultivos Intensivos y Forestales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los ensayos se realizaron a dos escalas experimentales: condiciones de maceta, para evaluar lo que sucede en un invernadero bajo un ambiente controlado, y condiciones de campo, para emular cómo se producen las cabezas de brócoli para el consumo. El experimento en condiciones de campo se realizó de la misma manera que lo expuesto en materiales y métodos del Capítulo 2. En el experimento que se realizó en invernadero, las plántulas se trasplantaron a macetas de 15 litros llenas de un sustrato compuesto por GROW MIX® Terrafertil. Las plántulas se colocaron con el mismo espaciamiento utilizado en condiciones de campo, obteniendo una densidad de plantación de 2 plantas  $\text{m}^{-2}$ . Las plantas de los diferentes cultivares se colocaron en tres subparcelas (49 plantas por subparcela) donde se aplicó un diseño de parcelas completamente al azar. En cada subparcela se consideró el efecto de borde de las plantas. Se mantuvieron las prácticas agronómicas normales para el cultivo de las plantas y las malezas se eliminaron manualmente.

### **3.2.2. Aplicación de tratamientos foliares precosecha**

La aplicación foliar de selenio se realizó al inicio de la formación de la cabeza (12/07/2017) utilizando soluciones de selenato o selenito ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , Sigma-Aldrich) a dosis de 25 y 50 g de selenio  $\text{ha}^{-1}$ , conteniendo 0,1 % de Rizospray Extremo (RIZOBACTER) como un coadyuvante para pulverización foliar. Se utilizó agua destilada en presencia del coadyuvante para los tratamientos sin aporte de selenio (control). Las plantas de control se cultivaron en las mismas condiciones que las plantas tratadas con selenio, pero se separaron físicamente con una lámina de plástico para evitar la contaminación cruzada durante la pulverización. La aspersión, de unos 10 ml por cada planta, se realizó por la tarde (entre las 17:00 y las 19:00 h) con un aspersor a presión de 0,5 L de capacidad en un día seco, soleado y sin viento y se repitió después de 1 semana hasta llegar a la dosis final de 0, 50 y 100 g de selenio  $\text{ha}^{-1}$ .

### **3.2.3. Período de conservación poscosecha**

Las plantas de brócoli fueron cosechadas en madurez comercial (05/08/2017, cuando las cabezas alcanzaron su tamaño máximo y presentaron botones florales verdes compactos) y transportadas inmediatamente al laboratorio en cámara frigorífica para preservar su frescura como se informó en ensayos similares (Casajús et al., 2021; Gómez-Lobato et al., 2012a, Gómez-Lobato et al., 2014).

Las mismas se colocaron en posición vertical en recipientes de plástico, con una pequeña cantidad de agua destilada con los tallos tocando el agua para evitar la deshidratación, y se almacenaron en una cámara ventilada y aislada de la luz externa, con una humedad relativa del 85 % a la temperatura de almacenamiento asignada. Se analizaron dos temperaturas de almacenamiento poscosecha, por un lado las pellas se almacenaron a 20 °C, temperatura la cual permite acelerar la senescencia, y por otro a 4 °C, siendo la temperatura a la cual se suele mantener el brócoli cuando se comercializa en los supermercados y se mantiene en los hogares de los consumidores. Con el objetivo de evaluar el efecto del selenio sobre parámetros fisiológicos que están involucrados en la determinación de la calidad comercial durante la senescencia poscosecha, se analizaron parámetros de color, firmeza y diámetro en las cabezas cada 2 días hasta los 6 días poscosecha (dpc) para el almacenamiento a 20 °C, y hasta los 16 dpc para el respectivo a 4 °C, tomando como referencia 2 días antes de que la calidad visual disminuyera a un nivel más bajo que el aceptable comercialmente.

### **3.2.4. Medición de la apariencia externa y el color superficial**

Se realizaron mediciones de los parámetros de color  $L^*$ (luminosidad),  $a^*$  (valor del eje a en la escala de Hunter),  $b^*$  (valor del eje b en la escala de Hunter) en cada cabeza de brócoli con un colorímetro (CR- 400, Minolta, Osaka, Japón). La fuente de luz utilizada fue D65/10° calibrada con placa blanca. Los valores  $a^*$  positivos y negativos representan rojo y verde, respectivamente; los valores  $b^*$  positivos y negativos representan amarillo y azul, respectivamente. El ángulo HUE ( $h^\circ$ ) se determinó como  $h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  cuando  $a^* > 0$  y  $b^* > 0$ , o como  $h^\circ = 180^\circ - \tan^{-1}(b^*/a^*)$  cuando  $a^* < 0$  y  $b^* > 0$   $h^\circ$  varía continuamente de 0° a 360°, con 90° indicando amarillo y 180° indicando verde (Duarte-Sierra et al., 2017). Las medidas fueron realizadas por triplicado, en tres puntos de cada cabeza y luego se promediaron.

### 3.2.5. Determinación del diámetro de la cabeza y firmeza

El diámetro de la cabeza de brócoli se midió con un calibre digital. Las medidas, realizadas por triplicado, se tomaron en dos lados opuestos en la zona ecuatorial de cada cabeza. Los promedios de los valores obtenidos se expresaron en centímetros.

La firmeza de las cabezas de brócoli se midió con un durómetro marca Turoni con punta esférica (modelo 53215TT; T.R. Turoni, Forlì, Italia). Estas medidas fueron tomadas en tres floretes diferentes en cada cabeza, equidistantes entre ellas, y equidistantes entre el punto central y el borde de las cabezas (Figura 9). El durómetro se colocó contra las cabezas hasta que el gris sótano del émbolo estaba completamente en contacto y mantenido en esta posición mientras la medida se estabilice (Figura 9). El valor de cada cabeza se reporta como el promedio en unidades de firmeza Shore.



**Figura 9.** Imágenes que indican la metodología utilizada para la medición de la firmeza. A la izquierda, los tres puntos utilizados se indican con asteriscos blancos, sobre un círculo de líneas discontinuas blancas, mientras que el punto central de la cabeza y el borde se indican con una cruz y un círculo amarillo, respectivamente. A la derecha, la imagen muestra la posición utilizada para tomar la medida con el durómetro.

### 3.2.6. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial considerando como factores de clasificación: el tratamiento con selenio (a 5 niveles: control sin selenio y las 2 sales a 2 concentraciones) y el tiempo si corresponde, considerando en el análisis la interacción entre los factores.

Por otro lado, no se incluyeron como factores en estudio el cultivar la forma de cultivo o la temperatura de almacenamiento. Se incluyeron dos cultivares debido a que, como el efecto puede ser dependiente del cultivar, tener más chances de observar el mismo. Además, en aquellos casos donde se obtiene un resultado similar, permite inferir que dicho efecto puede ser general. Similarmente, no eran objetivos comparar entre temperaturas de almacenamiento ni formas de cultivo, si no evaluar el efecto de los tratamientos en cada una de ellas. Los factores analizados fueron incluidos en las leyendas de las figuras y tablas.

La significación de la diferencia entre los valores medios se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD). La correcta aplicación de ANOVA se comprobó mediante distribución normal residual (prueba de Shapiro-Wilks, gráficos QQ) y homocedasticidad (prueba de Levene, gráficos de dispersión de residuos). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ . Los datos de los experimentos se expresaron como media  $\pm$  ee (error estándar) y se analizaron estadísticamente utilizando el software estadístico InfoStat (Di Renzo et al., 2017).

El análisis global de resultados se realizó mediante Análisis de Componentes Principales (ACP), representado por Biplot y Árbol de Expansión Mínimo (ARM). La calidad del ACP se analizó mediante el Coeficiente de Correlación Cofenética (CCC). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software estadístico InfoStat (Di Renzo et al., 2017).

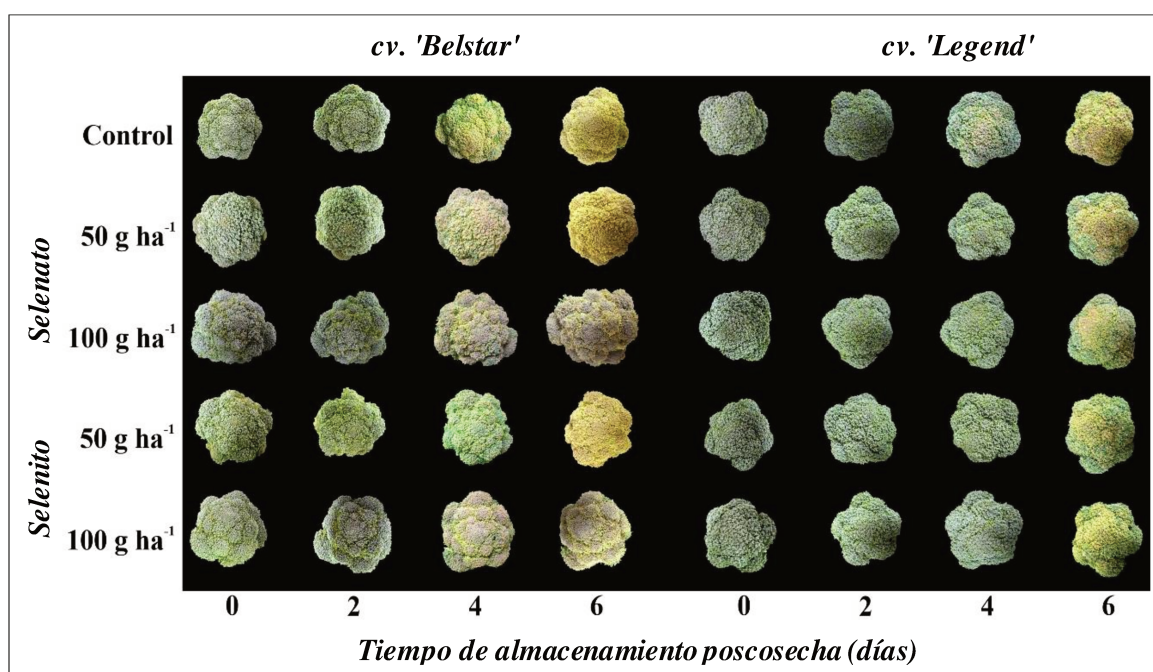
### **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.3.1. Los tratamientos foliares con selenio mantienen la apariencia visual y el color externo de las cabezas de brócoli durante la poscosecha de brócoli.**

Las cabezas de brócoli presentaron el típico color verde oscuro en el momento de la cosecha y se fueron volviendo amarillas a medida que avanzaba el tiempo de poscosecha. Sin embargo, el amarillamiento se retrasó en las plantas tratadas con soluciones de selenio, en ambos cultivares, cultivados en condiciones de campo y almacenados a 20 °C (Figura 10). En 'Belstar', las plantas tratadas con ambas dosis de selenato y selenito se mantuvieron completamente verdes, mientras que las plantas de control comenzaron a amarillear a los cuatro días poscosecha (dpc). En 'Legend', el amarillamiento fue menos significativo que en 'Belstar' en todas las condiciones. Además de esta diferencia entre

cultivares, las pellas pertenecientes a todos los grupos tratados mostraron menos amarillamiento en comparación con el control a los 4 y 6 dpc.

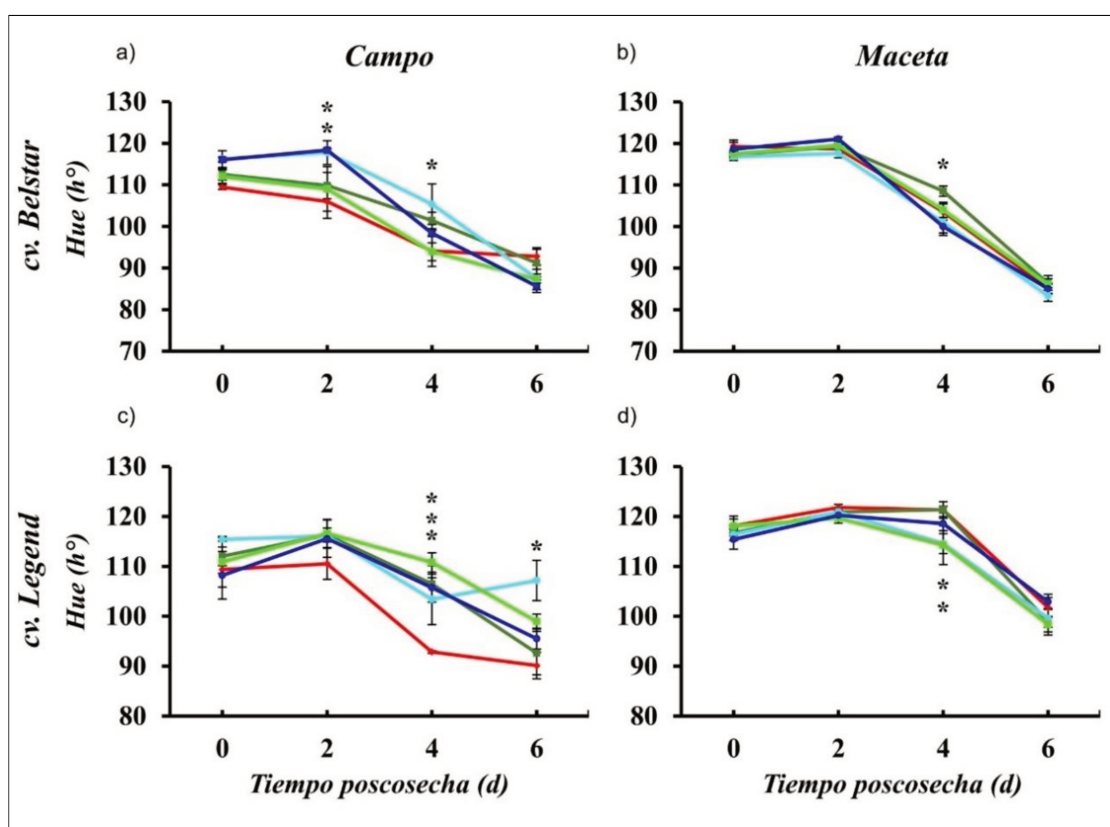
Los cultivos hortícolas son sometidos a un severo estrés al momento de la cosecha, lo que conduce a un rápido inicio del deterioro del aspecto comercial (Büchert et al., 2011b). La apariencia externa es un factor fundamental en la evaluación de la calidad del producto por parte de los consumidores y en las decisiones que toman en el momento de la compra. En el caso del brócoli, uno de los principales síntomas de deterioro es la falta de coloración verde, debido al catabolismo de la clorofila (Büchert et al., 2011a). Por lo tanto, el color de las cabezas de brócoli es una de las características más importantes que determina su comerciabilidad y valor económico (Dixon, 2007). En el capítulo previo, analizamos si la aplicación foliar de selenio en precosecha modifica el aspecto visual y color de las pellas al momento de cosecha, mientras que, en el presente capítulo, se efectuó este análisis durante el período de poscosecha.



**Figura 10.** Efecto de los tratamientos con selenio en el aspecto visual externo de las cabezas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C en oscuridad durante 6 días. La imagen muestra una cabeza representativa de un total de seis (n = 6) para cada tratamiento.

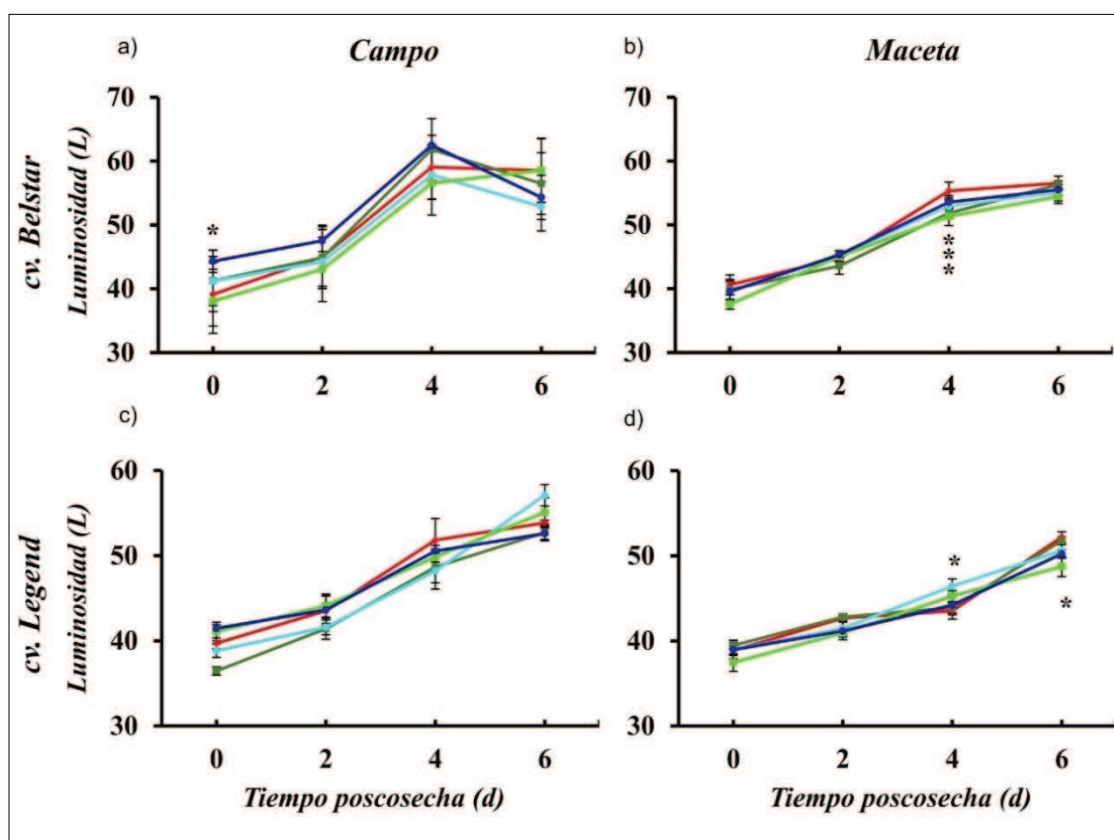
Posteriormente, con el fin de comparar cuantitativamente el aspecto externo de las pellas de brócoli, se evaluaron los parámetros de color superficial, Hue y L, durante el periodo poscosecha. En condiciones de campo, los valores de Hue mostraron una disminución rápida en las plantas control, a partir de los 2 dpc y en ambos cultivares. Por otro lado, en

las plantas tratadas con Se, los valores de Hue mostraron en general un retraso en la disminución, con valores significativamente más altos para los tratamientos con 50 y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito a los 2-4 y 4 dpc respectivamente en 'Belstar', y para los tratamientos con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato, 50 y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito a los 4, 4-6 y 4 dpc respectivamente en 'Legend' (Figura 11). Por el contrario, los experimentos en macetas mostraron comportamientos similares en todos los tratamientos, con una disminución de los valores de Hue a los 2 y 4 dpc para los cultivares 'Belstar' y 'Legend'. En particular, en 'Belstar', el tratamiento con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato fue significativamente mayor que el control, mientras que se observó una disminución significativa para 50 g ha<sup>-1</sup> de selenito y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato a los 4 días de almacenamiento poscosecha en 'Legend' (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de la aplicación foliar de selenio en los valores de Hue (°h) de las cabezas de brócoli c.v 'Belstar' (a, b) y c.v 'Legend' (c, d) durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C, en condiciones de campo (izq.) y maceta (der.). Los tratamientos foliares fueron: control (-♦-), selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (-■-), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (-■-), selenito 50 g ha<sup>-1</sup> (-●-), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (-●-). ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. El asterisco representa diferencias significativas entre tratamientos a un nivel de significancia de P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

Los valores de L aumentaron de manera similar en todos los tratamientos durante el almacenamiento, en ambos cultivares, en condiciones de crecimiento en campo. Por otro lado, se observó un aumento en general en los valores de L, en el experimento de macetas, pero en los tratamientos con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenito, 50 y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato presentaron valores significativamente menores que el control en el cultivar 'Belstar', mientras que el tratamiento con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato a los 6 dpc en 'Legend'. Excepcionalmente, en el cultivar 'Legend', el tratamiento con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito mostró un valor mayor que el control a los 4 dpc (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de la aplicación foliar de selenio en los valores de luminosity (L) de las cabezas de brócoli cv. 'Belstar' (a, b) y cv. 'Legend' (c, d) durante el almacenamiento poscosecha a 20°C, en condiciones de campo (izq.) y maceta (der.). Los tratamientos foliares fueron: control (-♦-), selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (-■-), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (-■-), selenito 50 g ha<sup>-1</sup> (-●-), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (-●-). ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. El asterisco representa diferencias significativas entre tratamientos a un nivel de significancia de P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).



Como se ha mencionado, el desverdizado, producido por el catabolismo de la clorofila, es considerado como el rasgo más significativo durante la pérdida de calidad poscosecha en brócoli. Este amarillamiento es consecuencia del desensamblaje de los cloroplastos (Fukasawa et al., 2010). Previamente ha sido mencionado que el enriquecimiento en Se, mediante una disminución en la biosíntesis de etileno, reduce la maduración del tomate y la senescencia de la lechuga en poscosecha (Malorgio et al., 2009; Pezzarossa et al., 2014). Además, las cabezas de brócoli cubiertas con agua que contenía  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de selenito durante 20 min mostraron un efecto positivo en los parámetros sensoriales y de calidad poscosecha, debido a la disminución de la producción de etileno y la intensidad respiratoria (Lv et al., 2017).

En general, se observó en ambas formas de cultivo, se pudo observar que el efecto positivo en el aspecto visual y color en el momento de la cosecha debido al tratamiento foliar con Se, también se mantuvo al menos a 6 dpc en comparación con el control, en ambos cultivares ensayados, y un aspecto no menor es que ninguno de los tratamientos presentó en general un efecto fitotóxico en las pellas.

### **3.3.2. El tratamiento precosecha con selenio presenta mejoras en cuanto a la firmeza poscosecha de las cabezas de brócoli.**

Además del aspecto visual externo, también se analizó el efecto del selenio sobre otro parámetro fundamental de la calidad comercial del brócoli: la firmeza. Como era de esperar, la firmeza disminuyó durante el tiempo de poscosecha en el control, pero los tratamientos con Se mostraron, en general, disminuciones significativamente menores (Tabla 7).

En el cv. 'Belstar', en condiciones de crecimiento en campo, las cabezas presentaron mayor firmeza que el control, en los tratamientos  $50 \text{ g ha}^{-1}$  de selenato a 4-6 dpc,  $50$  y  $100 \text{ g ha}^{-1}$  de selenito a 4 y 4-6 dpc respectivamente. Excepcionalmente, la aplicación de  $100 \text{ g ha}^{-1}$  de selenato disminuyó la firmeza de las cabezas de brócoli a los 6 dpc, mientras que no se observaron diferencias en las condiciones de crecimiento en maceta (Tabla 7). Por otro lado, en el cv. 'Legend', en condiciones de campo, se observó una mejora en la firmeza en el tratamiento con  $50 \text{ g ha}^{-1}$  de selenito a los 2 dpc, en el tratamiento con  $100 \text{ g ha}^{-1}$  de selenito a los 2-4-6 dpc y en el tratamiento  $100 \text{ g ha}^{-1}$  de selenato a los 4-6 dpc. En este cultivar, el comportamiento en condiciones de crecimiento en macetas el patrón fue más aleatorio, pero se pudo notar que la aplicación de  $100 \text{ g ha}^{-1}$  de selenato mejoró la firmeza a los 4 dpc, mientras que  $100 \text{ g ha}^{-1}$  de selenito a los 6 dpc.

Notablemente, en los tratamientos 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito en el cultivar 'Belstar' y en ambos tratamientos a 100 g ha<sup>-1</sup> en el cultivar 'Legend' se observó un aumento de la firmeza a 4-6 dpc, lo cual no es esperable dado que la misma va decreciendo. Este efecto solo se observó en los ensayos realizados a campo y deberían ser analizados en detalle para encontrar posibles motivos, uno de los cuales podría ser una particularidad de este sistema de cultivo.

En el capítulo 2, se observó que los diferentes tratamientos con selenio no afectaron la firmeza de las cabezas al momento de la cosecha. Sin embargo, la adición foliar de selenato a los perales resultó en valores más altos de firmeza de la pulpa de la fruta y redujo la pérdida de firmeza durante la poscosecha (Pezzarossa et al., 2012). De igual forma, se observó un incremento en la firmeza en frutos de durazno por la aplicación de selenio (Wu & Tian, 2009). En consecuencia, la aplicación de selenio ayuda a mantener la firmeza de frutas y hortalizas en cosecha y poscosecha. En este trabajo se ha establecido un retraso en la reducción de la firmeza de las cabezas de brócoli, durante la vida poscosecha mediante la aplicación foliar de sales de Se en precosecha.

**Tabla 7.** Efecto de la aplicación foliar de selenio en la firmeza (shore) de las pellas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.

			Firmeza ( <i>shore</i> )			
			Tiempo de almacenamiento poscosecha (d)			
Tratamiento			0	2	4	6
cv. 'Belstar'						
Campo		Control	28,74 ± 1,84cdef	22,34 ± 3,27abcd	22,79 ± 5,62abcd	19,27 ± 3,60ab
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	27,99 ± 0,76cde	18,94 ± 2,80a	43,00 ± 0,65g	39,90 ± 0,60fg
		100 g ha <sup>-1</sup>	24,53 ± 1,95abcd	25,99 ± 4,00abcd	27,41 ± 1,20bcde	24,65 ± 1,99abcd
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	22,28 ± 0,35abcd	20,77 ± 2,20abc	25,40 ± 2,80abcd	29,52 ± 3,12cdef
		100 g ha <sup>-1</sup>	30,72 ± 5,05def	27,7 ± 1,73bcde	35,65 ± 4,25efg	49,73 ± 2,70h
Maceta		Control	45,81 ± 3,73fg	40,63 ± 2,36cdefg	40,78 ± 2,47cdefg	31,64 ± 0,88b
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	39,81 ± 2,87bcdef	45,44 ± 1,51fg	36,10 ± 2,73bcd	32,77 ± 1,23bc
		100 g ha <sup>-1</sup>	40,04 ± 3,66cdefg	35,96 ± 0,96bcd	35,35 ± 4,49bcd	22,81 ± 2,46a
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	38,61 ± 2,19bcdef	41,31 ± 2,68defg	36,76 ± 3,42bcde	32,14 ± 2,73bc
		100 g ha <sup>-1</sup>	44,50 ± 3,16efg	39,23 ± 1,27bcdefg	42,25 ± 3,07g	33,71 ± 3,36bcd
cv. 'Legend'						
Campo		Control	25,00 ± 3,32abc	17,62 ± 4,45a	21,90 ± 2,37abc	28,17 ± 4,30bcd
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	22,98 ± 2,77abcd	20,28 ± 4,05ab	24,42 ± 2,95abcd	29,29 ± 5,09bcd
		100 g ha <sup>-1</sup>	30,02 ± 2,19abc	20,65 ± 1,81abc	40,82 ± 4,9ef	43,30 ± 3,60f
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	20,81 ± 0,95abc	28,84 ± 1,57bcd	27,74 ± 1,16bcd	32,52 ± 3,32de
		100 g ha <sup>-1</sup>	20,52 ± 0,82bcd	30,37 ± 4,57cd	41,17 ± 4,64ef	56,54 ± 6,17g
Maceta		Control	21,14 ± 0,67fghi	22,46 ± 2,38ghi	14,91 ± 1,12bcd	13,45 ± 0,90abc
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	27,23 ± 1,28jk	18,31 ± 2,44defg	13,75 ± 1,65abc	15,63 ± 0,85cde
		100 g ha <sup>-1</sup>	29,98 ± 0,44k	21,18 ± 1,73fghi	19,56 ± 0,90efghi	22,58 ± 1,47hi
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	22,89 ± 0,66hi	17,50 ± 2,40cdef	10,27 ± 1,38abc	10,92 ± 1,52ab
		100 g ha <sup>-1</sup>	23,64 ± 1,05ij	14,97 ± 1,01bcd	18,18 ± 1,70def	18,84 ± 1,72defgh

ANOVA a dos factores: tratamiento con Se y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. Los valores que poseen al menos una letra en común, no son estadísticamente diferentes entre tratamientos, a un nivel de significación de P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

### 3.3.3. La aplicación foliar de selenio contribuye a mantener el diámetro de las cabezas de brócoli en poscosecha.

En cuanto al diámetro de la cabeza, otro parámetro fundamental de la calidad comercial y estrechamente asociado a la firmeza, las mediciones realizadas en las pellas provenientes de las plantas control fue posible observar, mayoritariamente, un aumento en el diámetro de la cabeza durante la poscosecha, mientras que este efecto nocivo se redujo en las pellas provenientes de varios de los tratamientos con selenio (Tabla 8).

El cultivar 'Belstar', en condiciones de campo, presentó valores de diámetro de la pella más bajos en todos los tratamientos respecto a el control al momento de la cosecha, permitiendo los tratamientos mantener esta diferencia en la poscosecha durante 2-4-6 dpc en las pellas de las plantas tratadas con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato, 4 dpc en las pellas tratadas con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato y 2-4 dpc en las tratadas con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito (Tabla 8). En condiciones de crecimiento en maceta, estas diferencias se observaron en todo el período de almacenamiento poscosecha estudiado para el tratamiento con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenito, a los 4 dpc para 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato y a los 2 dpc en 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato (Tabla 8).

En contraste, el cv. 'Legend', en condiciones de crecimiento en campo, solo hubo diferencias significativas en la cosecha, mientras que el diámetro de cabeza de las plantas tratadas con Se fue similar al control en todos los tiempos. Además, en este cultivar, el comportamiento de las plantas tratadas, crecidas en maceta, fue similar al control, con excepción del tratamiento con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenito en el que todos los valores de diámetro, desde la cosecha hasta los 6 dpc, fueron mayores (Tabla 8).

Se sabe que la cosecha de brócoli también afecta el diámetro de las cabezas con un aumento debido a la apertura de los floretes, como parte de la descomposición y desorganización del tejido (Dixon, 2007). Sin embargo, el diámetro de las cabezas de brócoli no se vio afectado significativamente por la aplicación foliar de Se en el momento de la cosecha; mientras que el rango de diámetros obtenido fue similar a reportes previos (Ghasemi et al., 2016). La aplicación foliar de sales de Se, en consistencia con estos resultados anteriores, mejoró el mantenimiento del diámetro de la cabeza durante la poscosecha, un resultado que no ha sido reportado en ningún trabajo publicado.

**Tabla 8.** Efecto de la aplicación foliar de selenio en diámetro de las pellas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha.

			Diámetro de la pella (cm)			
			Tiempo de almacenamiento poscosecha (d)			
Tratamiento			0	2	4	6
cv. 'Belstar'						
Campo	Control		16,50 ± 0,50abcd	18,00 ± 1,00cd	18,07 ± 1,20d	18,00 ± 1,50bcd
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	12,13 ± 1,05a	14,06 ± 1,62abcd	14,26 ± 1,76abcd	13,83 ± 1,27abcd
		100 g ha <sup>-1</sup>	13,72 ± 0,51abcd	15,22 ± 0,81abcd	14,91 ± 0,66abcd	14,64 ± 0,50abcd
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	13,17 ± 1,32abcd	16.34 ± 1,16abcd	16,42 ± 1,08abcd	16,21 ± 0,79abcd
		100 g ha <sup>-1</sup>	12.48 ± 0,22abcd	14,13 ± 0,81ab	14,00 ± 0,91abc	14,47 ± 0,97abcd
Maceta	Control		10,79 ± 1,65bc	15,81 ± 0,10ghi	16,29 ± 0,35i	16,19 ± 0,47hi
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	9,99 ± 1,06ab	14,53 ± 0,23fghi	14,23 ± 0,04efgh	14,55 ± 0,07fghi
		100 g ha <sup>-1</sup>	12,39 ± 0,70cde	13,43 ± 0,49def	14,88 ± 0,06fghi	14,71 ± 0,45fghi
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	8,53 ± 0,32a	9,69 ± 1,15ab	11,07 ± 0,98bc	11,58 ± 0,32bcd
		100 g ha <sup>-1</sup>	12,26 ± 0,56cde	14,07 ± 0,65efg	15,66 ± 0,75ghi	15,24 ± 1,07fghi
cv. 'Legend'						
Campo	Control		15,76 ± 1.24bcd	16,72 ± 1.28cd	17,25 ± 1,25d	15,97 ± 0,53bcd
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	13,20 ± 0.43ab	14,88 ± 0.85abcd	15,32 ± 0,84abcd	15,39 ± 0,37abcd
		100 g ha <sup>-1</sup>	12,43 ± 0.41a	13,95 ± 0.37abc	15,09 ± 1,22abcd	13,93 ± 0,46abc
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	13,17 ± 0.89ab	14,37 ± 1.42abcd	14,36 ± 1,66abcd	14,05 ± 1,07abc
		100 g ha <sup>-1</sup>	12,93 ± 0.84ab	15,32 ± 1.18abcd	15,51 ± 1,49abcd	15,33 ± 1,17abcd
Maceta	Control		10,45 ± 0.79ab	13,21 ± 0.12bcde	13,29 ± 0,46bcdef	13,46 ± 0,76cdefg
	Selenato	50 g ha <sup>-1</sup>	11,22 ± 1.88abc	14,59 ± 0,29defg	14,94 ± 0,05efg	15,03 ± 0,45efg
		100 g ha <sup>-1</sup>	9,95 ± 1,90a	12,18 ± 1,05abcde	12,91 ± 1,17bcdef	13,02 ± 1,32bcdef
	Selenito	50 g ha <sup>-1</sup>	14,28 ± 1,07defg	15,71 ± 0,98fg	16,26 ± 0,65g	16,32 ± 1,33g
		100 g ha <sup>-1</sup>	11,95 ± 1,87abcd	14,60 ± 0,22defg	15,22 ± 0,11fg	15,5 ± 0,53fg

ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. Los valores que poseen al menos una letra en común, no son estadísticamente diferentes entre tratamientos, a un nivel de significación de P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

### 3.3.4. La aplicación precosecha de selenio presentó mejoras en la conservación refrigerada de las cabezas de brócoli.

Una de las prácticas más comunes en la conservación poscosecha es la refrigeración a 4 °C (Ilahy et al., 2020). En este contexto, con el objetivo de proponer la aplicación foliar de Se como mejorador poscosecha de las cabezas de brócoli también a 4 °C, fue necesario estudiar su efecto en refrigeración. En general, los resultados observados en todos los tratamientos con sales de selenio indicaron un aspecto de calidad mejorado o similar en

comparación con el control, y en algunos casos particulares permitiendo contrarrestar el deterioro causado por la falta de refrigeración.

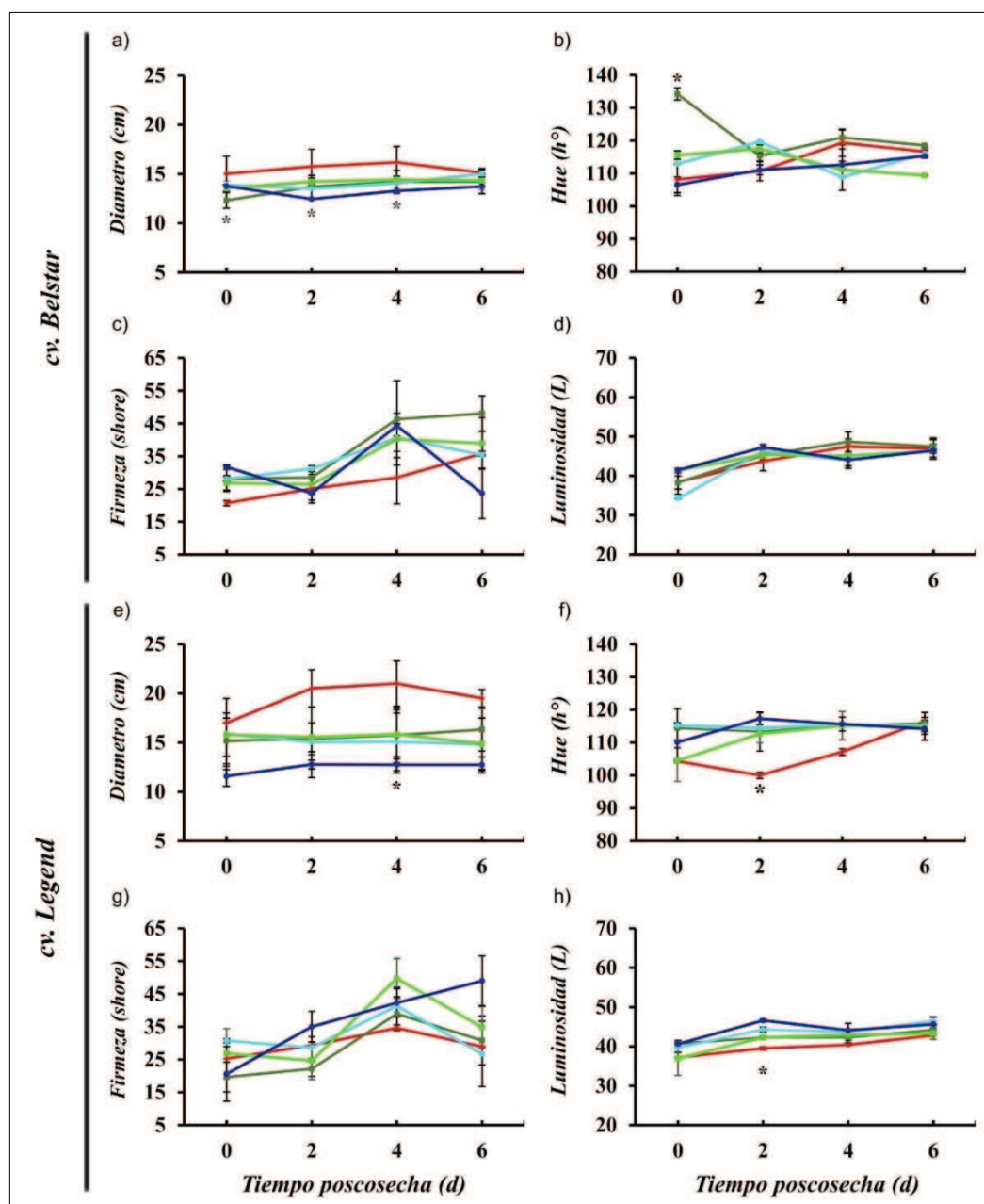
Primero, el análisis del color externo mostró varias mejoras en diferentes tratamientos durante la poscosecha de brócoli a 4 °C. El valor de Hue, en el cv. 'Belstar', fue significativamente mayor al momento de cosecha en el tratamiento con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato en comparación con el control (Figura 13b), mientras que en el cultivar 'Legend' todos los tratamientos mostraron mantener significativamente mejor los valores en comparación con las plantas control (Figura 13f). Por otro lado, los valores de L no presentaron diferencias entre tratamientos en el cv. 'Belstar' (Figura 13d), mientras que se observó un aumento significativo con la aplicación de los tratamientos a ambas dosis estudiadas de selenito en comparación con el control en el cv. 'Legend' (Figura 13h).

Los valores de firmeza no presentaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos con selenio con respecto al control en ambos cultivares, si bien pudo observarse una tendencia a valores mayores en varios de los mismos (Figura 13c y g). Por otro lado, se observó un aumento de la firmeza en algunos tratamientos en determinados momentos de poscosecha en el cultivar 'Legend' que debería analizarse como se ha mencionado anteriormente (Figura 13g).

Finalmente, la aplicación foliar de Se ayuda a mantener el diámetro de las cabezas de brócoli a 4 °C en ambos cultivares (Figura 13a, e). En el cv. 'Belstar', los diámetros de las cabezas de brócoli presentaron un aumento significativo con el tiempo, pero fueron menores en todos los tratamientos con Se que en el control (Figura 13a). En el cv. 'Legend', hubo un efecto de interacción entre la temperatura y los factores de tratamiento, en el que los diámetros de las cabezas fueron menores con la combinación de 4 °C-100 g ha<sup>-1</sup> selenito que a 4 °C-Control, mostrando una mejora adicional al descenso de la temperatura con la aplicación de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito (Figura 13e). Es importante destacar que las diferencias observadas en el diámetro entre los tratamientos y el control en este caso, en comparación con lo observado en el capítulo anterior, puede ser a diferencias en el experimento y en la temperatura de conservación de las pellas.

Las condiciones de almacenamiento implican factores fundamentales que retrasan la descomposición del producto fresco y preservan su valor comercial (Gao et al., 2018; Ilahy et al., 2020). Como se ha demostrado, la conservación durante la cadena de producción y el envasado a bajas temperaturas pueden prolongar de manera eficiente la vida útil de algunos productos (Jacobsson et al., 2004; Serrano et al., 2006; Starzyńska et al., 2003). Varios estudios han demostrado que la temperatura de almacenamiento es un

factor importante que afecta la calidad poscosecha de las cabezas de brócoli (Jones et al., 2006; Winkler et al., 2007). En este sentido, se consideró relevante estudiar el efecto de la aplicación foliar de diferentes sales y concentraciones de Se, en combinación con el almacenamiento en frío en poscosecha.



**Figura 13.** Efectos de la aplicación foliar de selenio sobre los parámetros de calidad comercial de las cabezas de brócoli durante el almacenamiento poscosecha a 4°C. Se muestran los valores del diámetro, Hue (°h), firmeza y luminosidad del cv. 'Belstar' (a, b, c, d) y del cv. 'Legend' (e, f, g, h). Tratamientos foliares: control (-♦-), selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (-■-), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (-■-), selenito 50 g ha<sup>-1</sup> (-●-), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (-●-). ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos a un nivel de significancia de p < 0,05 según la prueba LSD.

Los resultados obtenidos con y sin refrigeración fueron similares, con mejoras en diferentes variables asociadas a la calidad comercial en comparación con los controles, lo cual fundamenta que las aplicaciones realizadas, si bien no llegan a reemplazar el efecto de la temperatura, no afectan e incluso mejoran ciertos parámetros indicando que se pueden utilizar independientemente de cómo se conservarán las pellas.

### **3.3.5. El análisis multivariado permite observar las mejoras debido a los tratamientos con selenio, en comparación con el grupo control, en todas las condiciones analizadas.**

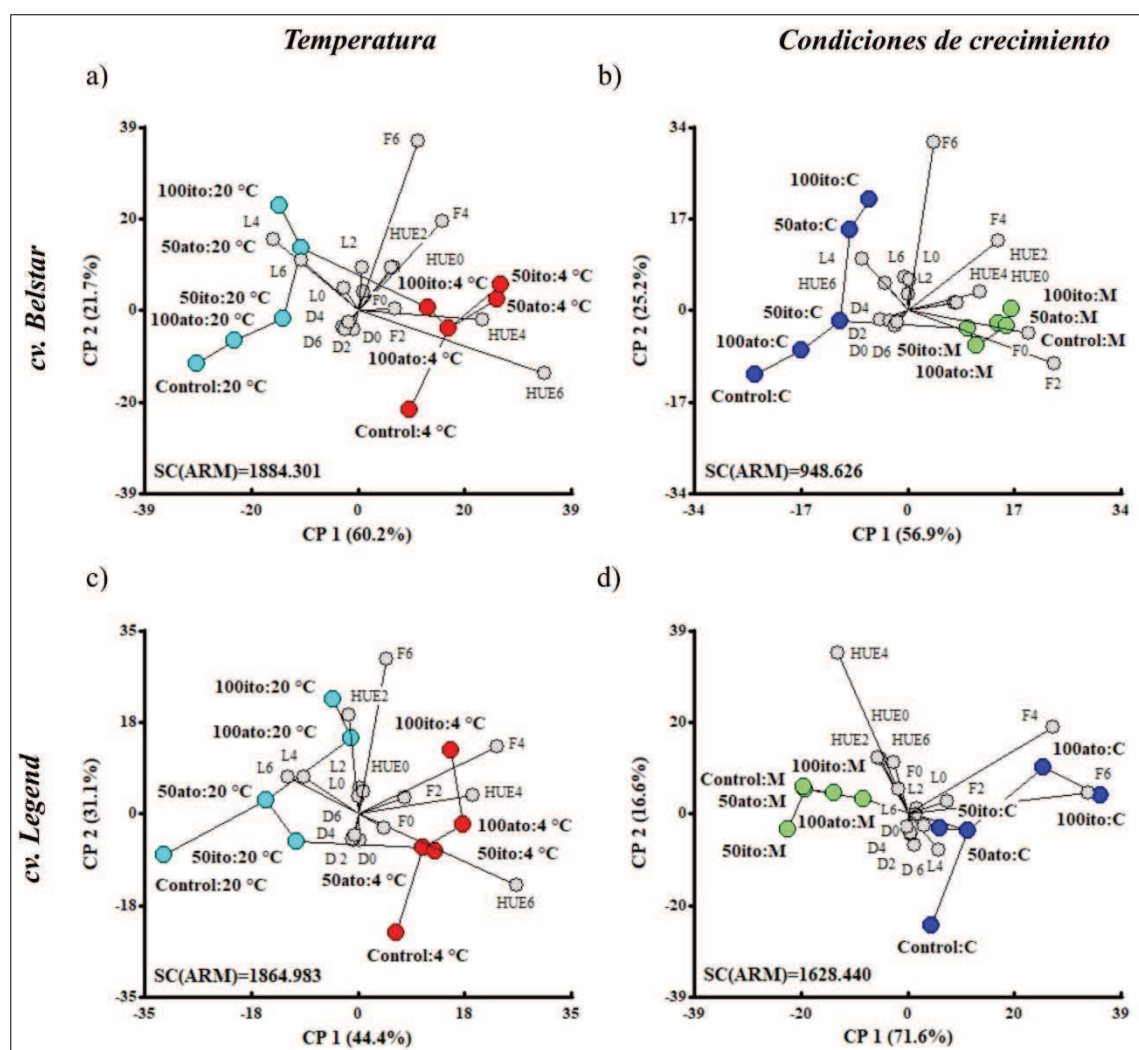
Con el fin de observar desde un punto de vista global el efecto del tratamiento foliar con Se en las cabezas de brócoli durante la poscosecha, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para cada cultivar de brócoli (Figura 14).

En primer lugar, los ACP incluían ambas temperaturas de conservación (Figura 14 a, c). El 82 y el 76 % de la variación original fue colectada por el CP1 y el CP2, con valores de 0,975 y 0,965 de CCC, en el cv. 'Belstar' y en el cv. 'Legend', respectivamente (Figura 14 a, c).

Las diferentes temperaturas de conservación se separaron claramente en dos grupos, pero notablemente, en ambos casos, los tratamientos con sales de selenio mostraron un patrón claramente diferente a las plantas control. En ambos cultivares, los CP1 separan las temperaturas de conservación, con 20 °C en dirección a valores negativos, asociados a luminosidad a 4-6 dpc, mientras que 4 °C a valores positivos en alta asociación a Hue a 4-6 dpc y bajar a firmeza a 4-6 dpc. Por otro lado, CP2 separó el control (con valores negativos) de los tratamientos (con valores positivos) de la misma manera a la firmeza a los 4-6 dpc. El tratamiento más disímil con respecto al control, para ambos cultivares a 20 °C y 'Legend' a 4 °C fue de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito, mientras que el tratamiento más alejado al control en 'Belstar' a 4 °C fue de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenito. Finalmente, los tratamientos de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato a 20 °C y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito a 4 °C fueron los más similares en 'Belstar', y 50 g ha<sup>-1</sup> de selenito en ambas temperaturas en el cultivar 'Legend'. Un comportamiento similar se observó en el ACP realizado combinando los métodos de cultivo, en campo y maceta (Figura 14 b, d). El 82 y 88 % de la variación original fue conservada por el CP1 y el CP2, con valores de 0,983 y 0,989 de CCC, en 'Belstar' y 'Legend', respectivamente. Nuevamente, el análisis separó claramente las condiciones de crecimiento en macetas y los experimentos de campo, y también, en



ambos casos, los tratamientos mostraron un patrón diferente al control, aunque más marcado para el ensayo de campo.



**Figura 14.** Análisis de componentes principales en dos cultivares de brócoli cultivados con aplicación foliar de selenio. Parámetros de calidad comercial medidos sobre las cabezas de brócoli (círculos grises): F, firmeza; D, diámetro; HUE, ángulo Hue; L, luminosidad. Tiempo de almacenamiento poscosecha: 0, 2, 4, 6 días. Tratamientos: Control, 0 g ha<sup>-1</sup> de selenio; 50ito, 50 g ha<sup>-1</sup> selenito; 100ito, 100 g ha<sup>-1</sup> selenito; 50ato, 50 g ha<sup>-1</sup> selenato; y 100ato, 100 g ha<sup>-1</sup> selenato. Temperaturas de almacenamiento poscosecha: 20 °C (círculos azul claro) y 4 °C (círculos rojos). Condiciones de crecimiento: M, maceta (círculos verdes); C, campo (círculos azules). CP1: componente principal 1. CP 2: componente principal 2. SC: suma de cuadrados. MST: árbol de recorrido mínimo.

En ambos cultivares, el CP1 separa los métodos de cultivo. En el cultivar 'Belstar' las macetas estaban en la dirección de valores negativos, principalmente en contraposición a la firmeza a 0-2 dpc, mientras que las macetas se agruparon en valores positivos en alta asociación a Hue 4-6 dpc y la menor firmeza a 4-6 dpc. En 'Legend', aun cuando la distribución fue opuesta, la asociación con las variables fue similar, y los ensayos de campo se dirigieron a la firmeza 6-4 dpc principalmente.

Por otro lado, CP2 separó el testigo (con valores negativos) de los tratamientos (con valores positivos) en condiciones de campo (no para macetas), principalmente porque los tratamientos presentaron correlación positiva con de Hue 2-4 y 6 dpc.

Finalmente, el tratamiento más lejano en comparación con el control fue 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito para ambos cultivares en condiciones de campo, asociado a mejores valores de las variables.

Como fue mencionado, las cabezas de brócoli presentan una alta tasa de respiración, lo que contribuye a su condición perecedera, con las consiguientes pérdidas económicas, presentando un desafío para el almacenamiento poscosecha, la logística y la gestión de suministros (Gao et al., 2018; Ilahy et al., 2020). El hallazgo de nuevas estrategias que mejoren la vida del mercado es valioso para la aplicación en condiciones de campo. El análisis global de los resultados, en el sistema multivariado, permite observar que independientemente de la condición de crecimiento (campo o maceta), el cultivar ('Legend' y 'Belstar') y la temperatura de conservación (4 o 20 °C), los tratamientos se diferencian respecto al control, en correlación con mejores valores de las variables medidas desde el punto de vista del análisis. Todos los tratamientos mostraron una mejora en al menos algunas condiciones, siendo la aplicación de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito el más prometedor. Si bien el efecto de la temperatura o las condiciones de crecimiento influyeron en los resultados, estos no afectaron el patrón, y los tratamientos presentaron un efecto de mejora relativamente similar en ambos cultivares.

### **3.4. CONCLUSIONES**

En el capítulo 2 fue demostrado que la aplicación foliar con sales de selenio, con el uso del coadyuvante, la dosis y el tiempo de desarrollo de la planta adecuados, en hojas de brócoli, produce una promisoriosa acumulación de selenio en cabeza desde el punto de vista nutracéutico, y mejora en los parámetros de cosecha. Esta ventaja podría no ser útil en condiciones de producción si ejerce efectos negativos en las características poscosecha de las cabezas de brócoli. En el presente capítulo, se analizó durante el período de almacenamiento poscosecha, el efecto de estas aplicaciones, en dos condiciones de crecimiento y a dos temperaturas de conservación diferentes. Los parámetros de relevancia analizados no se vieron afectados, o en varios casos presentan mejoras. Cuando se analizan en su conjunto las diferentes variables y condiciones analizadas, se puede sugerir que la aplicación de  $100 \text{ g ha}^{-1}$  de selenito presenta los resultados más prometedores, si bien será necesario realizar diferentes ensayos para optimizar estos resultados en escala de producción. Considerando todos los resultados expuestos, este nuevo protocolo de aplicación de selenio es una tecnología prometedora que podría beneficiar la producción de cultivares de brócoli y permitirá tener un producto enriquecido, apto para el consumo humano y con mejor vida útil en el mercado.

## **CAPÍTULO 4**

---

### **EVALUACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE SELENIO EN LA POSCOSECHA DE BRÓCOLI**

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las cabezas florales del brócoli están compuestas por cientos de floretes organizados en verticilos en la parte superior de un tallo. Para su consumo, este vegetal es cosechado mientras sus inflorescencias se encuentran inmaduras, previo a la apertura de los sépalos, lo cual implica una pérdida de agua y variaciones en el contenido de nutrientes y hormonas. Estos eventos, además de la cosecha y posterior manipulación, causan condiciones de estrés severo que inducen una senescencia temprana y un incremento significativo de la degradación de clorofila. Consecuencia de ello, se observa la pérdida del color verde superficial que ocasiona la reducción del interés comercial de los floretes de brócoli, otorgando un tiempo máximo de almacenamiento de tres días a 20 °C (King & Morris, 1994; Büchert et al., 2011a). Del mismo modo, la senescencia acelera la degradación de azúcares, de proteínas y la peroxidación de lípidos que conlleva a una pérdida de calidad nutricional (King & Morris, 1994; Page et al., 2001; Büchert et al., 2011a). Por eso, la reducción del amarilleo que resulta de la degradación de clorofila es uno de los principales objetivos de la tecnología poscosecha para reducir la pérdida de calidad comercial (Page et al., 2001).

Se ha demostrado que uno de los factores que contribuye a la rápida degradación de la clorofila; y que otorga la apariencia amarillenta, es el aumento de la síntesis de etileno en las cabezas de los brócolis cosechados (Tian et al., 1994). Durante la síntesis de etileno dos enzimas clave, la ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), catalizan la conversión de S-adenosilmetionina a ACC (ácido carboxílico 1-aminociclopropano) y de ACC a etileno, respectivamente (Iqbal et al., 2013). En floretes senescentes de brócoli, tres genes ACO han sido identificados (*BoACO1*, *BoACO2* y *BoACO3*) y su expresión ha sido caracterizada durante el almacenamiento poscosecha (Pogson et al., 1995; Yang et al., 2003). Pogson et al. (1995) reportaron que los transcritos del gen *BoACO1* incrementaron marcadamente su acumulación luego de la cosecha. Sin embargo, los transcritos de *BoACO2* fueron detectados 2 h poscosecha, mientras que *BoACO3* fue expresado solamente cuando los floretes estaban totalmente amarillos (Pogson et al., 1995; Yang et al., 2003; Gapper et al., 2005). Así, los autores sugieren que *BoACO1* podría estar involucrado en la producción basal de etileno responsable de la senescencia del tejido vegetal, *BoACO2* podría tener un rol durante el inicio del amarilleo; mientras que *BoACO3* sería un gen asociado a la senescencia tardía y podría ser responsable del comienzo de la fase irreversible de senescencia de los floretes.

A su vez, tres genes ACS (*BoACSI*, *BoACS2* y *BoACS3*) también han sido caracterizados a partir de floretes cosechados (Pogson et al., 1995; Yang et al., 2003). El nivel de transcriptos del gen *BoACSI* solamente aumentó inmediatamente después de la cosecha; mientras que *BoACS2* mostró una expresión basal incrementando su nivel de expresión durante los estadios finales de la senescencia. Por su parte, *BoACS3* fue casi indetectable hasta la etapa final de senescencia, por lo que se piensa que podría estar relacionado con la removilización de recursos celulares (Chen et al., 2008).

Por otra parte, el catabolismo de la clorofila está catalizado por varias enzimas entre las que se encuentran las clorofilasas (CLHs), feoforbida a oxigenasa (PaO) y feofitinas (PPH) (Martínez et al., 2001; Funamoto et al., 2002). Büchert et al. (2011a) analizaron la expresión de genes que codifican para dos CLHs durante la senescencia poscosecha de brócoli y sugirió que *BoCLH1* podría no estar involucrado directamente con la degradación de clorofila mientras que *BoCLH2* podría estar relacionado a este proceso mediante una vía independiente de etileno. Del mismo modo, estos autores reportaron que el tratamiento exógeno con etileno incrementó significativamente los niveles de expresión de *BoPPH*, correlacionándose con un decrecimiento importante en el contenido de clorofila durante el tiempo de senescencia poscosecha. A su vez, Gomez-Lobato et al. (2012a) caracterizaron la expresión de un gen que codifica para una monooxigenasa en inflorescencias de brócoli (*BoPaO*) cuya expresión aumentó durante la senescencia poscosecha y fue incrementada aún más por etileno. Asimismo, las moléculas de clorofila se encuentran ensambladas dentro de las tilacoides de los cloroplastos; desde donde deben ser liberadas para ser catalizadas. Además, en las tilacoides se encuentra una proteína denominada *Stay-Green* (SGR) que es capaz de desestabilizar las subunidades del complejo de captación de luz favoreciendo la liberación de las clorofilas; y se ha observado que la expresión de un gen que codifica para una SGR en brócoli (*BoSGR*) incrementa considerablemente durante la senescencia poscosecha; simultáneamente con la degradación de clorofila (Gomez-Lobato et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, la degradación de lípidos es otro rasgo común en muchos tejidos que están sometidos a la senescencia. La degradación lipídica puede ser llevada a cabo mediante oxidación enzimática por lipoxigenasas (LOXs) o por medio de especies reactivas del oxígeno. En brócoli, se ha reportado un descenso en el contenido de ácidos grasos insaturados (PUFA), mientras que la actividad de LOXs y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), las cuales representan productos finales de la peroxidación de lípidos, aumentan durante la senescencia (Zhuang et al., 1994; Zhuang

et al., 1995; Zhuang et al., 1997). A su vez, Gomez-Lobato et al. (2012a) reportaron que la expresión de una lipoxigenasa presente en inflorescencias de brócoli (*BoLOX1*) incrementó durante la senescencia poscosecha y además que los niveles de transcripto aumentaron significativamente por acción de etileno.

Varios trabajos han reportado los efectos benéficos de los micronutrientes esenciales sobre la calidad de los cultivos (Fageria et al., 2002; Esringüa et al., 2011). Sin embargo, existen pocos reportes sobre elementos no esenciales como es el caso del selenio (Alcaraz-Lopez et al., 2003; Hu et al., 2003; Malorgio et al., 2009; Pezzarossa et al., 2012; Pezzarossa et al., 2014). Se ha reportado que en plantas de tomate, el selenio es capaz de retrasar la maduración de los frutos a través de la disminución de la biosíntesis de etileno (Pezzarossa et al., 2014). Del mismo modo, en lechuga y achicoria el selenio es capaz de disminuir la producción de etileno y consecuentemente mejorar la calidad nutricional y aumentar la vida poscosecha de ambas especies (Malorgio et al., 2009).

De esta manera y sobre la base de los antecedentes descriptos anteriormente, es que en este capítulo se analizó a nivel molecular el efecto de la aplicación foliar de selenio, durante el cultivo de brócoli, sobre el tiempo de duración poscosecha de las inflorescencias; para su comercialización en el mercado fresco como alimentos con mayores propiedades nutricionales.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Obtención de plantas biofortificadas con selenio**

#### ***4.2.1.1. Material vegetal***

En el presente trabajo se cultivaron plantas de brócoli (*B. oleracea* var. *itálica*) correspondientes a un híbrido comercial cultivar 'Legend' F1 (Nongwoo Bio, Gyunggi-do, Republic of Korea).

#### ***4.2.1.2. Condiciones de crecimiento vegetal***

El ensayo se realizó en invernadero, bajo condiciones de cultivo semicontroladas en el Campo Experimental de Cultivos Intensivos y Forestales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Inicialmente, las semillas de brócoli se seleccionaron de acuerdo con la uniformidad de tamaño y las características externas, y se descartaron aquellas con alteraciones y malformaciones. La siembra se realizó el 10/05/2019 en bandejas multiceldas de poliestireno® expandido de 228 celdas con sustrato compuesto por GROW MIX

Terrafertil para obtener un correcto desarrollo del sistema radical. Posteriormente, el 17/06/2019 las plántulas se trasplantaron para su crecimiento a macetas de 15 litros llenas de un sustrato compuesto por GROW MIX® Terrafertil. Las plántulas se colocaron con el mismo espaciamiento utilizado en condiciones de campo, obteniendo una densidad de plantación de 2 plantas m<sup>-2</sup>. Las plantas de los diferentes cultivares se colocaron en tres subparcelas (49 plantas por subparcela) donde se aplicó un diseño de parcelas completamente al azar. En cada subparcela se consideró el efecto de borde de las plantas. Se mantuvieron las prácticas agronómicas normales para el cultivo de las plantas y las malezas se eliminaron manualmente después de la emergencia.

#### **4.2.2. Aplicación de tratamientos foliares precosecha**

La aplicación foliar de selenio se realizó al inicio de la formación de la cabeza (29/07/2019) utilizando soluciones de selenato o selenito (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich) a dosis de 25 y 50 g de selenio ha<sup>-1</sup>, conteniendo 0,1 % de Rizospray Extremo (RIZOBACTER) como un coadyuvante para pulverización foliar. Se utilizó agua destilada en presencia del coadyuvante para los tratamientos sin aporte de selenio (control). Las plantas de control se cultivaron en las mismas condiciones que las plantas tratadas con selenio, pero se separaron físicamente con una lámina de plástico para evitar la contaminación cruzada durante la pulverización. La aspersion, de unos 10 ml por cada planta, se realizó por la tarde (entre las 17:00 y las 19:00 h) con un aspersor a presión de 0,5 L de capacidad en un día seco, soleado y sin viento y se repitió después de 1 semana hasta llegar a la dosis final de 0, 50 y 100 g de selenio ha<sup>-1</sup>.

#### **4.2.3. Período de conservación poscosecha**

Las cabezas de brócoli fueron cosechadas en madurez comercial (25/08/2019, cuando las cabezas alcanzaron su tamaño máximo y presentaron botones florales verdes compactos) y transportadas inmediatamente al laboratorio en cámara frigorífica para preservar su frescura. Un set de plantas se separó para realizar la determinación de pérdida de peso. Otro set de plantas se colocó en posición vertical en recipientes de plástico, con una pequeña cantidad de agua destilada con los tallos tocando el agua para evitar la deshidratación, y se almacenaron en una cámara ventilada y aislada de la luz externa, con una humedad relativa del 85 % durante 6 días. Este almacenamiento poscosecha se realizó a 20 °C para acelerar la senescencia y a 4 °C porque el brócoli se comercializa en los supermercados y se mantiene en los hogares de los consumidores a esa temperatura. Las



cabezas fueron muestreadas periódicamente a 0, 2, 4 y 6 días poscosecha (dpc), los floretes de las cabezas se separaron de los tallos, se agruparon al azar y se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis posterior.

#### **4.2.4. Determinación de la pérdida de peso**

Para la determinación de la pérdida de peso, se utilizó un conjunto diferente de plantas. Las cabezas de brócoli se pesaron inmediatamente después de la cosecha. Luego, estas cabezas se colocaron en posición vertical en recipientes de plástico y se almacenaron en una cámara bien ventilada, aislada de luz exterior, con una humedad relativa del 85 % a 20 °C de temperatura y se pesaron a 2, 4 y 6 dpc.

La pérdida de peso (PP) se calculó a partir de los pesos inicial (PI) y final (PF) como:

$$PP (\%) = (PI - PF/PI) * 100$$

#### **4.2.5. Determinación del contenido de clorofila y carotenoides**

El contenido de clorofila y carotenoides se determinó a partir del polvo de tejido congelado; 0.5 g del polvo obtenido se homogenizaron en 5 mL de acetona (80 %) fría y se centrifugaron a 10000 xg durante 10 min a 4 °C. Finalmente, el contenido de clorofila se midió en el sobrenadante por espectrofotometría (663 nm máximo de absorción de la Chl<sub>a</sub>, 646 nm máximo de absorción de Chl<sub>b</sub> y 470 nm máximo de absorción de carotenoides) y los resultados se expresaron como mg de clorofila / carotenoides g<sup>-1</sup> de peso fresco de tejido (PF) (Inskeep & Bloom, 1985). El total de las mediciones se realizaron por triplicado. Los cálculos realizados para determinar las concentraciones de clorofila a (Chl<sub>a</sub>), clorofila b (Chl<sub>b</sub>), clorofila total (Chl<sub>a+b</sub>) y carotenoides totales (carotenos y xantófilas) fueron los siguientes:

$$Chl_a (ug/ml) = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{646}$$

$$Chl_b (ug/ml) = 21,50 \times A_{646} - 5,10 \times A_{663}$$

$$Chl_{a+b} (ug/ml) = 7,15 \times A_{663} + 18,71 \times A_{646}$$

$$Carotenoides\ totales (ug/ml) = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times Chl_a - 85,02 \times Chl_b) / 198$$

#### **4.2.6. Determinación de la peroxidación de lípidos**

El nivel de peroxidación lipídica se evaluó en los distintos tiempos poscosecha según el método de Heath y Packer reportado por Hasanuzzaman et al. (2011). Este método se basa en la reacción del malondialdehído (MDA), producto de la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) peroxidados del lípido de membrana, utilizando

el ácido tiobarbitúrico (TBA) como material reactivo; y cuyo producto de reacción se puede determinar espectrofotométricamente a 532 nm. Brevemente, los floretes de brócoli congelados se molieron en nitrógeno líquido y aproximadamente 0,5 g de tejido se homogeneizó en 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 11500 xg durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante (1 ml) se mezcló con 4 ml de reactivo TBA (0,5 % de TBA en 20 % TCA). La mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante 30 min en un baño de agua y luego se enfrió rápidamente en un baño de hielo y se centrifugó a 11500 xg durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante coloreado se midió a 532 nm y se corrigió por la absorbancia no específica a 600 nm. La concentración de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y expresó como nmoles de MDA  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco de tejido (PF).

#### **4.2.7. Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

El nivel de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se evaluó en las cabezas de brócoli a distintos tiempos poscosecha según lo descrito por Jambunathan (2010). Una cantidad de 0,5 g de tejido vegetal se homogenizó con 3 mL de buffer fosfato de potasio 50 mM pH 6,5 a 4 °C y centrifugó a 8000 xg durante 20 min. Posteriormente, a los 3 mL de sobrenadante obtenido se le adicionó 1 mL de cloruro de titanio 0,1 % (v/v) en ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 20 % (v/v) y la mezcla de reacción se centrifugó a 9500 xg durante 30 min a temperatura ambiente. El contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó espectrofotométricamente a 410 nm en el sobrenadante obtenido, utilizando un coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 0,28 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y expresó como  $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco de tejido (PF).

#### **4.2.8. Determinación de daño de membranas: *Electrolyte Leakage***

La fuga de electrolitos se midió incubando los floretes de brócoli (aproximadamente 1 g de tejido) en tubos "falcon" de 50 ml con 45 ml de agua (para una mayor precisión en la realización de la técnica se tuvo en cuenta la conductividad del agua) y agitados durante una hora a 25 °C. Pasado ese tiempo se midió la conductividad inicial (CI) con un conductímetro (HANNA Instruments. Modelo Dist 4). Las muestras fueron congeladas en freezer a -80 °C para producir la destrucción total de las membranas. Luego las muestras se dejaron descongelar y una vez alcanzada una temperatura de 25 °C se volvió a realizar la medición final de conductividad eléctrica (CF). Finalmente, el daño de membrana se cuantificó mediante la siguiente ecuación:

**Daño membrana (% respecto a daño total) =  $[(CF - CI) / (CF)] * 100$**

Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

#### **4.2.9. Determinación de la producción de etileno, el ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como precursor del etileno y la producción de dióxido de carbono**

La producción de etileno de las cabezas de brócoli se midió con un analizador de etileno portátil (analizador de tres gases F-950, instrumentos Felix, Camas, WA98607, EE. UU.). Utilizando el modo de volumen fijo que toma muestras de 15 ml del espacio de la cabeza. Las cabezas de brócoli, una por frasco, se colocaron en frascos de 400 ml, los frascos se sellaron y almacenaron a 20 °C durante 1 h. Se utilizaron al menos tres frascos para cada combinación de tiempo / tratamiento. Se midió la producción de etileno cada 1 día desde el momento de la cosecha al día 6 poscosecha. La concentración de etileno en el espacio de cabeza (ppm) se midió y se convirtió a la tasa de producción de etileno ( $\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), según se indica en Tesfay et al. (2017).

El ACC endógeno se extrajo y purificó siguiendo el método de Martos et al. (2016) con algunas modificaciones. Brevemente, se molieron 250 mg de material fresco en un mortero helado con 750  $\mu\text{L}$  de solución de extracción constituida por MeOH: 2-Propanol: HOAc (20:79:1 en vol.). Luego, el sobrenadante se recogió después de centrifugar a 1000 g durante 5 min a 4 °C. Estos pasos se repitieron dos veces más y los sobrenadantes combinados se liofilizaron. Finalmente, las muestras se disolvieron en 250  $\mu\text{L}$  de MeOH puro y se filtraron con un filtro de tubo de centrifuga Spin-X de acetato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  (Costar, Corning Incorporated, Nueva York, EE. UU.). La cuantificación de la hormona se realizó utilizando una curva de calibración de adición estándar agregando muestras de plantas de control con las soluciones estándar de ACC (Sigma-Aldrich, España) en un rango de 5 a 250 ppb y extrayendo como se describió anteriormente. El ACC fue analizado por el sistema LC-ESI-MS/MS en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) según Segarra et al. (2006). Se separaron usando HPLC Acquity (Waters) en un Luna Omega 1,6  $\mu\text{m}$  C18 100<sup>a</sup> 50 x 2.1 mm (Phenomenex) a 50 °C a una velocidad de flujo constante de 0.8  $\text{ml min}^{-1}$  y 10  $\mu\text{L}$  de volumen inyectado. El gradiente de elución se realizó con un sistema binario de disolventes formado por 0,1 % de ácido fórmico en metanol (disolvente A) y 0,1 % de ácido fórmico en milliQ H<sub>2</sub>O (disolvente B) con las siguientes proporciones (v/v) de disolvente A (t (min), %A): (0, 2) (0,2, 2), (1,6, 100), (2, 100), (2,1, 2) y (3, 2). Los experimentos MS/MS se realizaron en un

espectrómetro de masas ABI 4000 Qtrap (Sciex). Todos los análisis se realizaron utilizando la fuente Turbo Ionspray.

Para determinar la tasa de respiración, la producción de CO<sub>2</sub> se midió utilizando el mismo analizador de gases portátil (analizador de tres gases F-950, instrumentos Felix, Camas, WA98607, EE. UU.) de manera similar a como se indica para la medición de etileno. La concentración de CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza (% CO<sub>2</sub>) se midió y se convirtió a la tasa de respiración (ml kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) tomando en cuenta la masa de fruta, el volumen de fruta, según se indica en Tesfay et al. (2017).

#### **4.2.10. Extracción de ARN para análisis de la expresión de genes**

La extracción de ARN total se realizó a partir de un polvo de nitrógeno de los floretes de brócoli a distintos tiempos de senescencia almacenados a - 80 °C mediante el reactivo TRIzol® (Invitrogen, USA) siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

Para constatar la integridad de los ARN obtenidos, las muestras de ARN total fueron visualizadas directamente en geles de electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v), con el fin de observar bandas discretas y definidas, correspondientes a las subunidades mayor y menor de los ARN ribosomales.

Las soluciones de ARN obtenidas se cuantificaron utilizando un lector de microplacas (CLARIOstar, BMG LABTECH) midiendo la absorbancia a 260, 280 y 230 nm y las concentraciones de los ARN se determinaron utilizando el siguiente cálculo:

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

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

Las interferencias de contaminantes pueden estimarse calculando un cociente de absorbancias. Dado que las proteínas absorben a 280 nm, y los polisacáridos a 230 nm, se emplea el cociente A<sub>260</sub>/280 y A<sub>260</sub>/230, para estimar la pureza del ARN total.

Un ARN total puro presenta una relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> aproximada entre 1,8 y 2, y una relación A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> cercana a 2,3.

#### **4.2.11. Búsqueda y diseño de oligonucleótidos**

En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica para detectar publicaciones en las cuales se reporten el uso de PCR en Tiempo Real, de manera de utilizar las secuencias de oligonucleótidos publicadas en los mismos.

En aquellos casos donde no pudo encontrarse información sobre oligos para utilizar, se procedió a la búsqueda de publicaciones para detectar las secuencias de los genes a analizar. En los casos donde pudo detectarse las mismas, se procedió al diseño de los cebadores como se indica a continuación.

En primer lugar, se realizó la descarga de la secuencia de los genes mencionados en NCBI, la cual se ingresó en el programa Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>) especificando el tamaño de amplicón deseado. Luego de analizar los primers provistos por el programa, se seleccionaron aquellos pares de primers que mejor se adecuaban a los siguientes parámetros: % GC, autocomplementariedad 3', autocomplementariedad 5', T<sub>m</sub> y especificidad. Una vez seleccionados los pares de primers, se realizó un megablast de cada primer con el fragmento para confirmar la especificidad de los mismos.

#### **4.2.12. Análisis de los datos de secuenciación masiva de ARN**

En primer lugar se realizaron búsquedas bibliográficas de publicaciones científicas en Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) que incluyeran datos de secuenciación masiva (NGS) correspondientes a brócoli y la aplicación de selenio. Los datos crudos del experimento seleccionado fueron obtenidos bajo el número de acceso CRA002942, del sitio “Genome Sequence Archive in National Genomics Data Center, Beijing Institute of Genomics (China National Center for Bioinformation)”, de la Academia China de Ciencias (<https://bigd.big.ac.cn/gsa>).

Los datos correspondientes a las 6 muestras, 3 tratadas con selenio, 3 control, fueron descargados en los archivos formato fastq. Estos datos fueron procesados en primer lugar con la herramienta FASTP (<https://github.com/OpenGene/fastp> versión 0.20.0), la cual permite limpiar las secuencias que resultan espurias, y obtener un resumen de la calidad de las mismas. Posteriormente, como no se dispone del genoma de brócoli, se optó por realizar el ensamblado de las lecturas, utilizando la herramienta Trinity (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq> versión v2.13.2), utilizando parámetros por default, y sin especificar especificidad de cadena (“no strand specific”). Posteriormente se realizó un pseudo alineamiento de los datos con Kallisto (<https://pachterlab.github.io/kallisto/> versión 0.46.1), se procedió al conteo mediante htseq count (<https://rnh.github.io/bioinfo-notebook/docs/htseq-count.html>) y luego se realizó el análisis de expresión diferencial mediante el paquete DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>).

Por otro lado, utilizando la herramienta de blast local (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52637/>) se procedió a asignar a cada uno de los genes de interés, utilizando la secuencia de *A. thaliana*, los transcritos del ensamblado para analizar su expresión diferencial.

#### **4.2.13. Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial considerando como factores de clasificación: tratamiento con selenio (a 5 niveles: control sin selenio y las 2 sales a 2 concentraciones) y el tiempo si corresponde, considerando en el análisis la interacción entre los factores. Por otro lado, por la disponibilidad de material se realizó el estudio de este capítulo con el cultivar 'Legend' únicamente. Los factores analizados fueron incluidos en las leyendas de las figuras y tablas.

La significación de la diferencia entre los valores medios se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD). La correcta aplicación de ANOVA se comprobó mediante distribución normal residual (prueba de Shapiro-Wilks, gráficos QQ) y homocedasticidad (prueba de Levene, gráficos de dispersión de residuos). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ . Los datos de los experimentos se expresaron como media  $\pm$  ee (error estándar) y se analizaron estadísticamente utilizando el software estadístico InfoStat (Di Renzo et al., 2017).

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. La aplicación foliar de selenato o selenito aminoran la pérdida de peso de las cabezas de brócoli durante la poscosecha.**

Uno de los factores que determinan la calidad poscosecha de vegetales es la turgencia de los tejidos, que está determinada principalmente por el grado de deshidratación durante el almacenamiento (Serrano et al., 2006). Debido a esto se realizó el respectivo análisis utilizando el cultivar 'Legend' a 20 °C.

En general las cabezas de brócoli cv. 'Legend' presentaron un aumento en la pérdida de su peso durante el almacenamiento poscosecha como era de esperarse, dentro de las cuales las plantas controles alcanzaron en promedio una pérdida de peso de cerca del 8 % luego de 6 días de almacenamiento poscosecha (Tabla 9). Por otro lado, la aplicación de 50 g ha<sup>-1</sup> y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato, disminuyó significativamente la pérdida de peso de las cabezas respecto al control; obteniéndose a los 6 dpc una pérdida de peso del 6 % (Tabla

9). El tratamiento con 50 g ha<sup>-1</sup> de selenito, a los 4 dpc presentó un 5 % de pérdida en el peso de sus cabezas y este valor se mantuvo hasta los 6 dpc. Sin embargo, la aplicación de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito hizo que las cabezas de brócoli mantengan su peso hasta los 4 dpc, alcanzando a los 6 dpc una pérdida de peso del 5 %, significativamente menor que la alcanzada por las plantas controles (Tabla 9).

**Tabla 9.** Efecto de la aplicación foliar de selenio en la pérdida de peso (%) de las pellas de brócoli cv. 'Legend' durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.

		<i>Almacenamiento poscosecha (días)</i>		
		<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
<i>Pérdida de peso (%)</i>				
<b>Control</b>		2,74 ± 0,39 a	4,79 ± 0,36 c	7,50 ± 0,35 e
<b>Selenato</b>	50 g ha <sup>-1</sup>	2,18 ± 0,12 a	3,93 ± 0,43 b	5,71 ± 0,55 d
	100 g ha <sup>-1</sup>	2,56 ± 0,22 a	4,35 ± 0,07 c	6,20 ± 0,18 d
<b>Selenito</b>	50 g ha <sup>-1</sup>	2,59 ± 0,06 a	5,06 ± 0,04 c	5,20 ± 0,12 c
	100 g ha <sup>-1</sup>	2,89 ± 0,32 a	2,33 ± 0,06 a	4,65 ± 0,07 c

ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n=6) ± ee. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia  $P < 0,05$  según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

La aplicación de sales de selenio a nivel foliar en precosecha, en busca de mejoras en la conservación poscosecha, no sería de utilidad económica y comercial si genera pérdidas en el peso de las cabezas de brócoli. Notablemente, el efecto observado fue una disminución en la pérdida de peso, en todos los tratamientos, agregando más evidencia de que el selenio podría proponerse como fertilizante para el brócoli. Por otro lado, se ha propuesto que, a nivel fisiológico, durante la senescencia, las membranas sufren disrupción (Lim et al., 2007) lo que puede potenciar la pérdida de agua con la consiguiente pérdida de peso. Aquí, los tratamientos con selenio retrasan la senescencia con una reducción en la pérdida de peso durante el almacenamiento, el cual podría ser consecuencia de un retardo en la ruptura de la membrana, el cual se analiza en ensayos consiguientes.

#### **4.3.2. La aplicación foliar de selenato o selenito aminora la degradación de clorofila y carotenoides de las cabezas de brócoli.**

Como se ha mencionado, durante el almacenamiento poscosecha de brócoli las cabezas muestran un intenso desverdizado y amarilleamiento causado por la degradación de clorofila (Yamauchi et al., 1997). Como parte de esta tesis se determinó el contenido de clorofila en cabezas de brócoli como parámetro de senescencia en el cultivar 'Legend'.

En general, se observó una disminución en las plantas tratadas, así como en las plantas control, lo que indica la típica senectud poscosecha.

En el análisis del contenido de clorofila total se observó que los tratamientos con selenato  $100 \text{ g ha}^{-1}$  y selenito  $50 \text{ g ha}^{-1}$  partían de valores significativamente mayores al momento de cosecha, en comparación a los demás tratamientos y el control (Figura 15A). Particularmente con el tratamiento con selenato  $100 \text{ g ha}^{-1}$  se mantuvo dicha diferencia a los 2 dpc (Figura 15A). Finalmente, en todos los tratamientos las concentraciones decaían a los 4 y 6 dpc a valores similares al control (Figura 15A).

Cuando fueron analizadas las cantidades de carotenoides, se pudo observar que los tratamientos con selenato  $100 \text{ g ha}^{-1}$  y selenito  $50 \text{ g ha}^{-1}$  mantenían ambas concentraciones hasta los 4 dpc, mientras que los demás tratamientos y el control caían a partir de los 2 dpc (Figura 15B).

Por otro lado, en general no se observaron diferencias a los diferentes tiempos poscosecha entre los tratamientos y el control en la  $\text{Chl}_a$ , la cual se mantuvo hasta los 4 dpc y cae hacia el día 6 pc, donde el contenido de clorofila se redujo entre 61-84 % de la inicial (Tabla 10). Como una excepción, para el tratamiento de selenato  $100 \text{ g ha}^{-1}$ , la cantidad inicial de  $\text{Chl}_b$  es mayor que en el resto de los tratamientos (Tabla 10). En el caso de la  $\text{Chl}_b$ , se detectaron diferencias de los tratamientos particularmente para el de selenato  $100 \text{ g ha}^{-1}$ , donde la cantidad inicial de  $\text{Chl}_b$  es mayor y a su vez la caída de la misma se produce en forma más lenta en comparación con el control hasta los 4 dpc (Tabla 10).

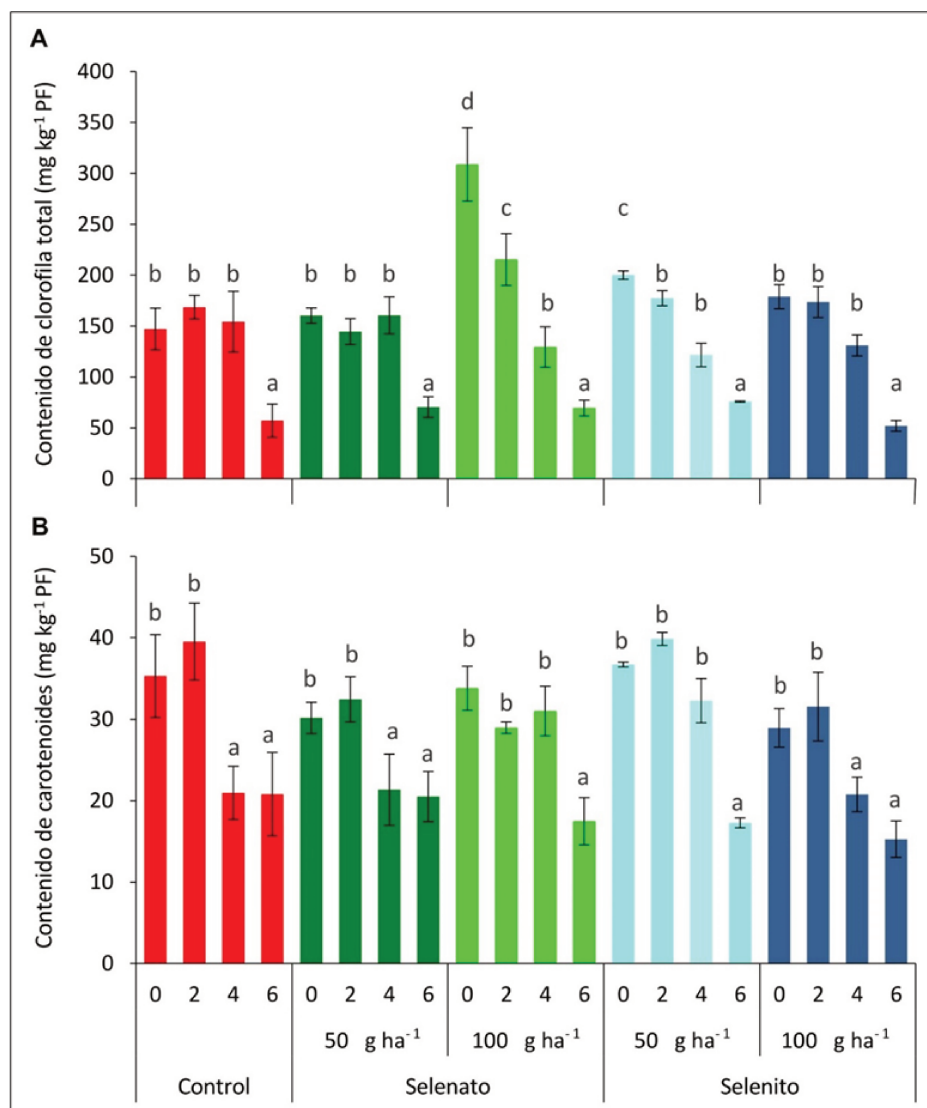


**Tabla 10.** Efecto de la aplicación foliar precosecha de selenio en el contenido de clorofila a y clorofilab de las cabezas de brócoli cv. 'Legend' durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C.

<i>Almacenamiento poscosecha (días)</i>				
	0	2	4	6
<i>Clorofila a (mg kg<sup>-1</sup> PF)</i>				
<b>Control</b>	97,18 ± 12,21b	123,73 ± 8,08b	101,56 ± 17,64b	37,75 ± 14,13a
<b>Selenato</b>	50 g ha <sup>-1</sup>	114,22 ± 5,13b	106,73 ± 7,78b	47,13 ± 9,10a
	100 g ha <sup>-1</sup>	184,33 ± 18,32 c	135,42 ± 14,87b	41,19 ± 4,39a
<b>Selenito</b>	50 g ha <sup>-1</sup>	140,85 ± 1,04b	126,64 ± 3,12b	44,89 ± 0,59a
	100 g ha <sup>-1</sup>	116,43 ± 4,03b	109,57 ± 3,57b	31,12 ± 3,70a
<i>Clorofila b (mg kg<sup>-1</sup> PF)</i>				
<b>Control</b>	49,91 ± 8,76a	44,78 ± 3,58a	52,71 ± 22,4a	19,26 ± 2,34a
<b>Selenato</b>	50 g ha <sup>-1</sup>	46,16 ± 3,08a	37,84 ± 5,60a	23,22 ± 0,99a
	100 g ha <sup>-1</sup>	124,49 ± 19,73c	80,03 ± 16,47b	28,21 ± 3,47a
<b>Selenito</b>	50 g ha <sup>-1</sup>	54,36 ± 3,76a	50,68 ± 4,82a	30,89 ± 0,12a
	100 g ha <sup>-1</sup>	62,49 ± 8,92a	54,10 ± 12,41a	20,80 ± 1,61a

ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

Además, el mismo análisis fue realizado en pellas del cultivar 'Belstar', en las cuales pudo observarse una importante pérdida de clorofila y carotenoides con el tiempo poscosecha. En este caso, particularmente la aplicación foliar de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenito mantiene el contenido de clorofila, desde los 2 a los 4 días poscosecha. Estos resultados no son presentados debido a que los parámetros analizados en el presente Capítulo solo se realizaron en el cv. 'Legend', a excepción de las mediciones de clorofila y carotenoides.



**Figura 15.** Efectos de la aplicación foliar de selenio en el contenido de clorofila total (A) y en el contenido de carotenoides (B) de las cabezas de brócoli cv. 'Legend', durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C. Tratamientos foliares: control (■), selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (■), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (■), selenito 50 g ha<sup>-1</sup> (■), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (■). Tiempo de almacenamiento poscosecha: 0, 2, 4, 6 días. ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

En la mayoría de los diversos métodos analizados en la búsqueda de mantener una mejor vida poscosecha de brócoli, se analiza el contenido de clorofila y carotenoides como un indicador de mantenimiento de la coloración. Por ejemplo, el tratamiento térmico puede retrasar este proceso y reducir la pérdida de color superficial (Funamo et al., 2002; Costa et al., 2005a). Por otro lado, si bien la aplicación de tratamientos físicos y químicos

directamente en la pella del brócoli produjo un retraso en la degradación de la clorofila mediante la disminución de su catabolismo, reduciendo el amarilleamiento del brócoli, este retraso no fue completo durante el almacenamiento (Funamo et al., 2002; Costa et al., 2005a, Costa et al., 2006). Además, en varios de estos tratamientos, en los cuales se analizó la expresión de genes relacionados al catabolismo de la clorofila, se pudo observar que provocaron cambios en la expresión de dichos genes.

En nuestro caso, utilizando un tratamiento precosecha, pudimos observar un efecto similar de retraso en la degradación de la clorofila en uno de los tratamientos hasta los 4 dpc, dando un indicio de la mejora en la vida poscosecha. Finalmente, resulta importante remarcar que, en algunos tratamientos el contenido de clorofila al momento de cosecha era significativamente mayor que en el control, demostrando que no solo hay una demora en la degradación si no que el contenido en el tejido en la planta debería ser más alto.

#### **4.3.3. La aplicación foliar de selenato o selenito produce cambios en la formación de peróxido de hidrógeno y en la peroxidación lipídica en las cabezas de brócoli.**

Como parte del proceso fisiológico de degradación del tejido, luego de la cosecha, se analizó la formación de  $H_2O_2$ , molécula la cual actúa como señal en situaciones de estrés, a como oxidante generando daño al nivel de la membrana plasmática. El efecto provocado en este segundo caso se puede analizar a través de la medición de la peroxidación lipídica midiendo el contenido de MDA.

Al momento de cosecha, las plantas tratadas con 50 y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato presentaron mayor contenido de  $H_2O_2$  que las plantas control y tratadas con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato (Figura 16A). Además, se pudo observar que la aplicación foliar de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato o selenito produce, al momento de cosecha, una concentración de MDA significativamente menor en relación al control (Figura 16B y C). En el caso de las aplicaciones de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato o selenito el contenido de MDA fue significativamente mayor, en el caso de selenito en correlación con el aumento de  $H_2O_2$  (Figura 16 A, B y C).

La evaluación del contenido de  $H_2O_2$  en el tiempo de almacenamiento poscosecha, muestra que la aplicación de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato si bien aumenta el contenido de  $H_2O_2$  a los 2 dpc, luego en el transcurso del período se mantiene e inclusive presenta tendencia a la baja (Figura 16A). Similar a este efecto, la aplicación de la misma dosis de selenito produce que el contenido de  $H_2O_2$  al momento de cosecha sea más alto al control y luego

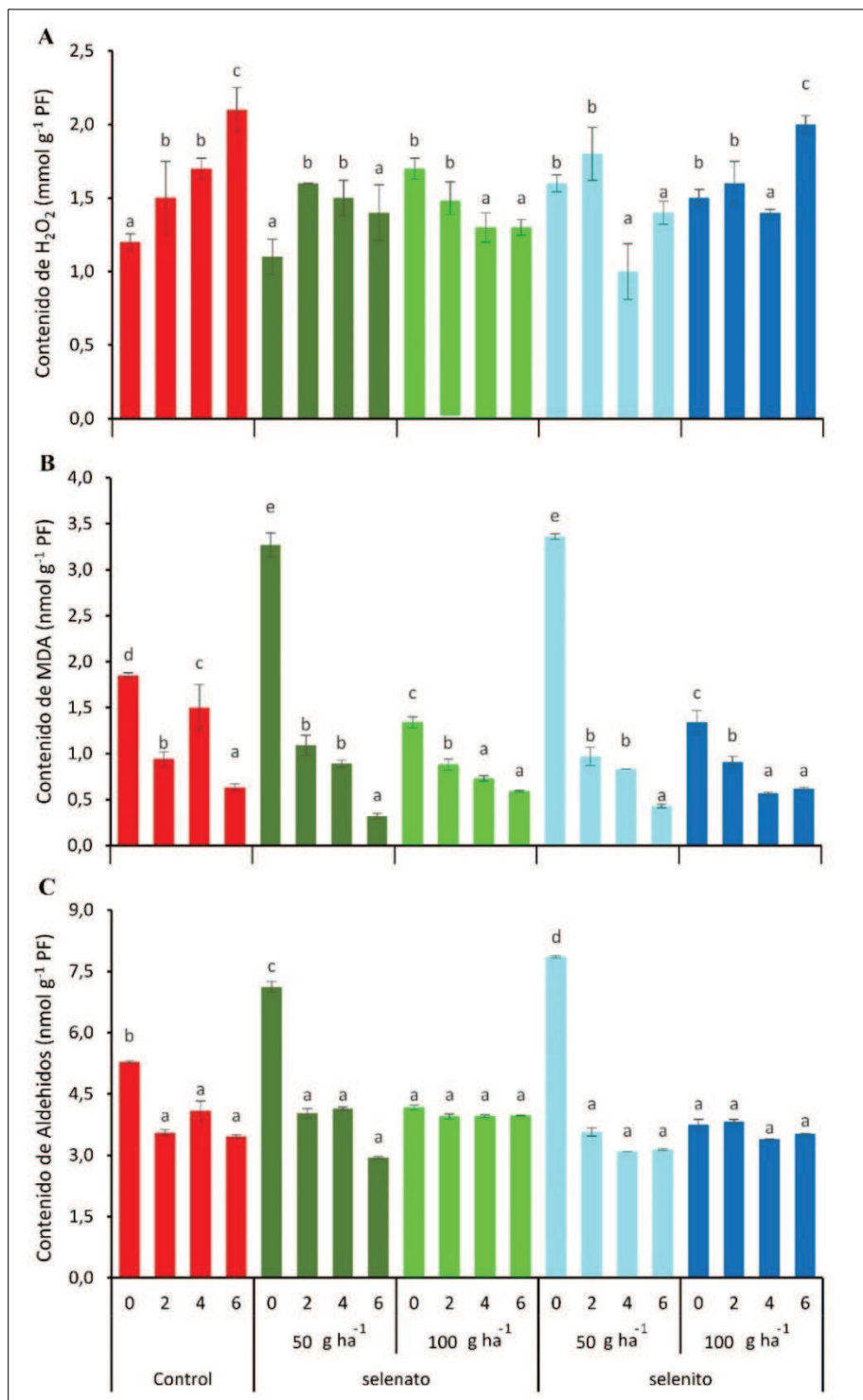
empieza a oscilar con tendencia a la baja (Figura 16A). La aplicación de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato logra bajar el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la aplicación de la misma dosis de selenito hace que el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las cabezas de brócoli comience con un valor elevado y se mantenga en niveles como el control. Estos resultados muestran que la aplicación de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato o selenito y 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato produce que el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las cabezas de brócoli se mantenga y que no se eleve al nivel del control, en cambio, la aplicación de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito logra mantener el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta los 4 dpc y a los 6 dpc el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se dispara superando al control (Figura 16A).

En relación a la evaluación del contenido de MDA en el tiempo de almacenamiento poscosecha se observó que los tratamientos ensayados tienden a bajar los valores de estos parámetros con el transcurso del tiempo, comportamiento más marcado que en el control (Figura 16B). La aplicación de 50 g ha<sup>-1</sup> de selenato o selenito produce un alto contenido de MDA a momento de cosecha y luego este contenido disminuye rápidamente (Figura 16B). En el caso de la aplicación de 100 g ha<sup>-1</sup> de selenato o selenito presentan valores menores al momento de la cosecha y luego disminuyen a valores seimilares al control (Figura 16B). Por otro lado, solo habría efecto tratamiento sobre el contenido de MDA en la poscosecha en el caso particular de 4 dpc donde los tratamientos con selenio logran bajar el contenido de MDA a valores menores que el control (Figura 16B). El contenido de aldehídos, el cual se cuantifica y se relaciona con el de MDA, presentó patrones similares a los observados en el caso de MDA (Figura 16C).

Jiang et al. (2019) mostraron que la peroxidación de lípidos, utilizada como un indicador del daño de membrana, es menor en el brócoli tratado con irradiación LED. Un menor deterioro de los tejidos en las muestras almacenadas bajo luz (Büchert et al., 2011a, 2011b) puede resultar en una menor pérdida de la compartimentalización y un mayor contenido de glucosinatos. Además, Guo et al. (2013) demostraron que la peroxidación lipídica, un indicador del daño de la membrana, es menor en el brócoli almacenado en atmósferas controladas.

Es importante destacar que el tiempo considerado como momento de cosecha no es exactamente el momento cero, sino que con la manipulación del producto se pierden algunos minutos y eso produce que en ese momento el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya esté actuando como señal al estrés generado por el corte. En aquellos casos donde el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta, pero no el daño celular, es posible que se esté logrando que se degrade el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y esto puede apoyarse con la medida de la enzima catalasa realizada en Buttarelli et al. (Tesis Doctoral, manuscrito en preparación, comunicación personal). Considerando el consunto de estos

resultados, se puede concluir que los tratamientos producen que en la pella se regule mejor la producción de  $H_2O_2$  y de la peroxidación lipídica, durante la poscosecha, con casos particulares para cada tratamiento, y este efecto debería ser analizado mas en detalle para explicar las diferencias observadas, teniendo en cuenta mediciones del sistema antioxidante realizadas en la Tesis Doctoral de la Ing. Melina Buttarelli.

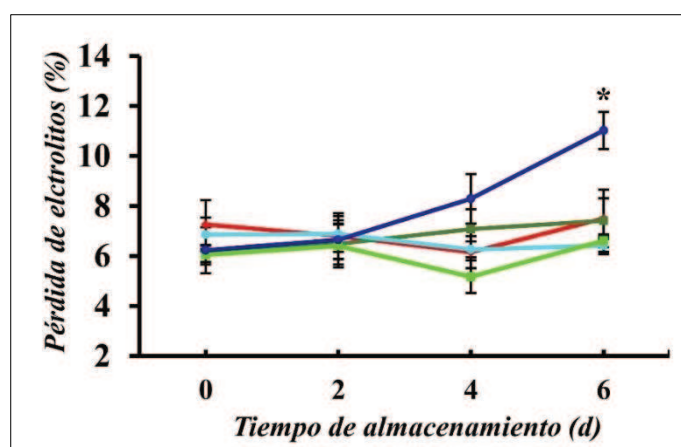


**Figura 16.** Efectos de la aplicación foliar de selenio en el contenido de  $H_2O_2$  (A), contenido de MDA (B) y contenido de aldehídos (C) de las cabezas de brócoli cv. 'Legend', durante el almacenamiento poscosecha a 20°C. Tratamientos foliares: control (■), selenato 50  $g\ ha^{-1}$  (■), selenato 100  $g\ ha^{-1}$  (■), selenito 50  $g\ ha^{-1}$  (■), y selenito 100  $g\ ha^{-1}$  (■). Tiempo de almacenamiento poscosecha: 0, 2, 4, 6 días. ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media ( $n=6$ )  $\pm$  ee. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia  $P < 0,05$  según la prueba de (LSD).

#### 4.3.4. La aplicación foliar de selenato o selenito no induce mayores cambios en el mantenimiento de la membrana celular.

La pérdida de electrolitos es un parámetro que se utiliza como una medida del daño que sufren los tejidos. Cuanto mayor es el daño, mayor será el valor de este parámetro. La senescencia está acompañada por el deterioro en los tejidos y a medida que este proceso progresa la membrana plasmática pierde su integridad y los solutos son liberados del citosol.

En este trabajo, hasta los 6 dpc no se detectó aumento significativo en la fuga de electrolitos para las plantas control y aquellas tratadas con ambas dosis de selenato y la menor dosis de selenito (Figura 17), lo que indicaría que los tratamientos con selenio no producirían daño en los tejidos. En los 6 dpc se produjo un incremento significativo en la pérdida de electrolitos de las muestras tratadas con 100 g ha<sup>-1</sup> de selenito (Figura 17). Si bien esta diferencia indicaría que la aplicación de la mayor dosis de selenito produciría algún daño en los tejidos en las muestras tratadas, la mayoritaria ausencia de aumento en la pérdida de electrolitos en el almacenamiento en las muestras, inclusive en el transcurso del tiempo, estaría indicando que mediante esta metodología no se pueden hacer inferencias sobre las aplicaciones de selenio y el daño que pueden generar las mismas.



**Figura 17.** Pérdida de electrolitos (%) de las cabezas de brócoli cv. 'Legend' tratadas con selenio, durante el almacenamiento poscosecha a 20°C. Tratamientos foliares: control (-), selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (-), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (-), selenito 50 g ha<sup>-1</sup> (-), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (-). Tiempo de almacenamiento poscosecha: 0, 2, 4, 6 días. ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos a un nivel de significancia de p < 0,05 según la prueba LSD.

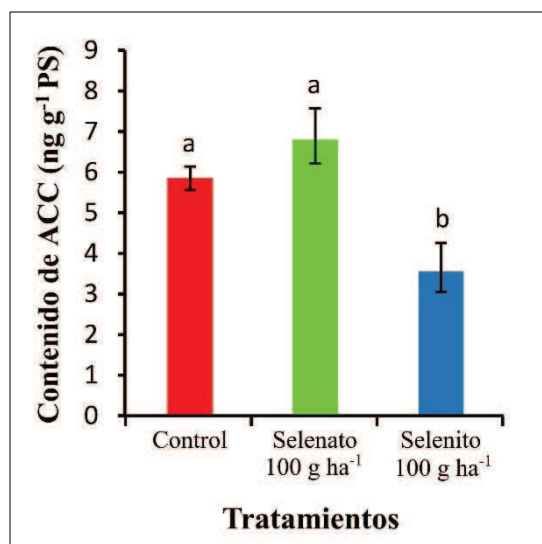
#### **4.3.5. La aplicación foliar de selenio reduce la formación del precursor del etileno en brócoli, la emisión del mismo y la respiración.**

En diferentes trabajos se ha reportado que las hormonas vegetales tienen un rol central en la regulación de la senescencia de las especies hortícolas, de las cuales el etileno generalmente acelera este proceso. Como se ha mencionado anteriormente, al momento de la cosecha y durante la poscosecha de brócoli, el etileno juega un rol central, como mediador del proceso de senescencia del tejido posterior, generando un impacto negativo en la calidad del producto (Casajús et al., 2021). Como se observa en frutos climatéricos, presenta un aumento en su tasa respiratoria seguida de un aumento en la liberación de etileno durante esta etapa (Ma et al., 2009). Particularmente en el caso de brócoli el daño producido al momento de la cosecha aumenta la producción etileno, hasta niveles 10 veces mayor que sus valores basales (King & Morris, 1994).

Debido a que en los análisis realizados pudo observarse una ralentización en el proceso de amarillamiento, producto de la aplicación de sales de selenio en precosecha y disminuciones en la degradación de la clorofila previo a los 4 dpc, se definió estudiar si este efecto era mediado por un impacto sobre la producción de etileno. Para esto se planteron tres enfoques, cuantificar en forma directa, cuantificar en forma indirecta analizando su precursor, y estimar sus niveles analizando la expresión de los genes de la vía de síntesis y de degradación de dicha hormona.

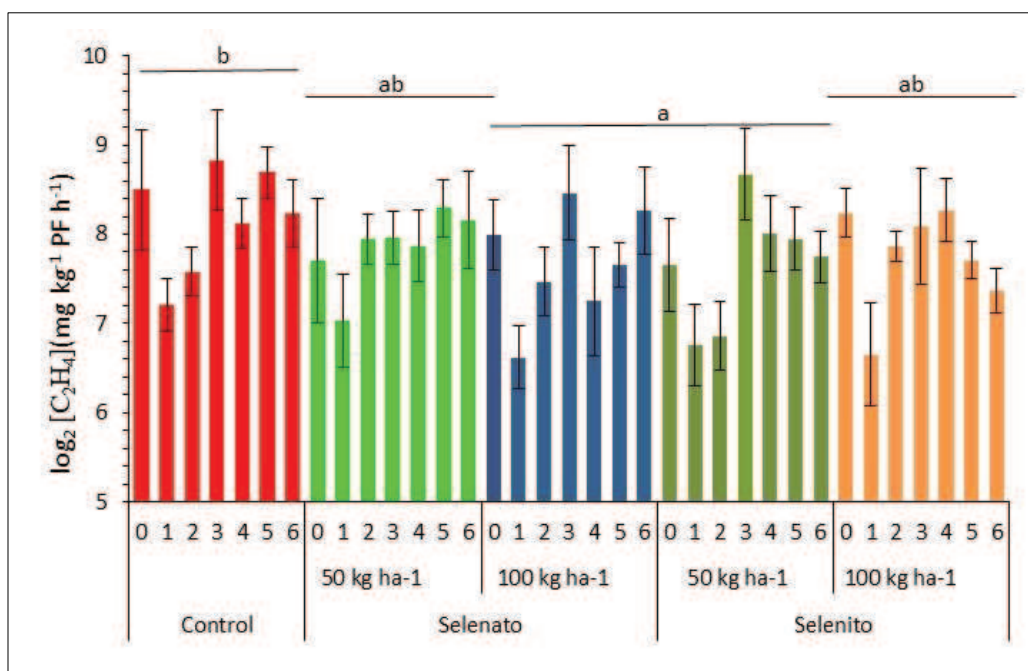
En primer lugar se realizó la medición del ACC, molécula precursora del etileno, la cual se ha reportado como medida extrapolable en múltiples trabajos. En este caso fueron incluidos los tratamientos de 100 g ha<sup>-1</sup> de ambas sales al momento de la cosecha. Notablemente pudo observarse un valor menor de ACC en el caso de la sal de selenito, lo cual condice con lo observado previamente en las mediciones de clorofila (Figura 18).





**Figura 18.** Contenido de ACC (ng g<sup>-1</sup> PS) en las cabezas de brócoli cv. 'Legend' tratadas con selenio. Los tratamientos foliares fueron: control (■), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (■), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (■). ANOVA a un factor: tratamiento con selenio. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia  $P < 0,05$  según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

Luego, dado este primer indicio de que la aplicación de las sales podría afectar la producción de etileno, se procedió a cuantificar la hormona en estado gaseoso emitida en los 4 tratamientos hasta una semana poscosecha. En primer lugar, pudo observarse que en todos los tratamientos el nivel de etileno disminuye a 1 dpc, para luego aumentar a un máximo a los 3 dpc y luego estabilizarse en valores similares al día de cosecha (Figura 19). En lo respectivo a la comparación entre los tratamientos, se observa nuevamente una disminución de la emisión de etileno, la cual resulta significativa en las aplicaciones con selenato 100 g ha<sup>-1</sup> y selenito 50 g ha<sup>-1</sup>, con respecto al control en todos los tiempos poscosecha debido que en el análisis estadístico no se observó interacción entre el tiempo poscosecha y los diferentes tratamientos (Figura 19).



**Figura 19.** Efectos de la aplicación foliar de selenio en la emisión de etileno de las cabezas de brócoli cv. 'Legend', durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C. Tratamientos foliares: control (■), selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (■), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (■), selenito 50 g ha<sup>-1</sup> (■), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (■). Tiempo de almacenamiento poscosecha: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días. ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

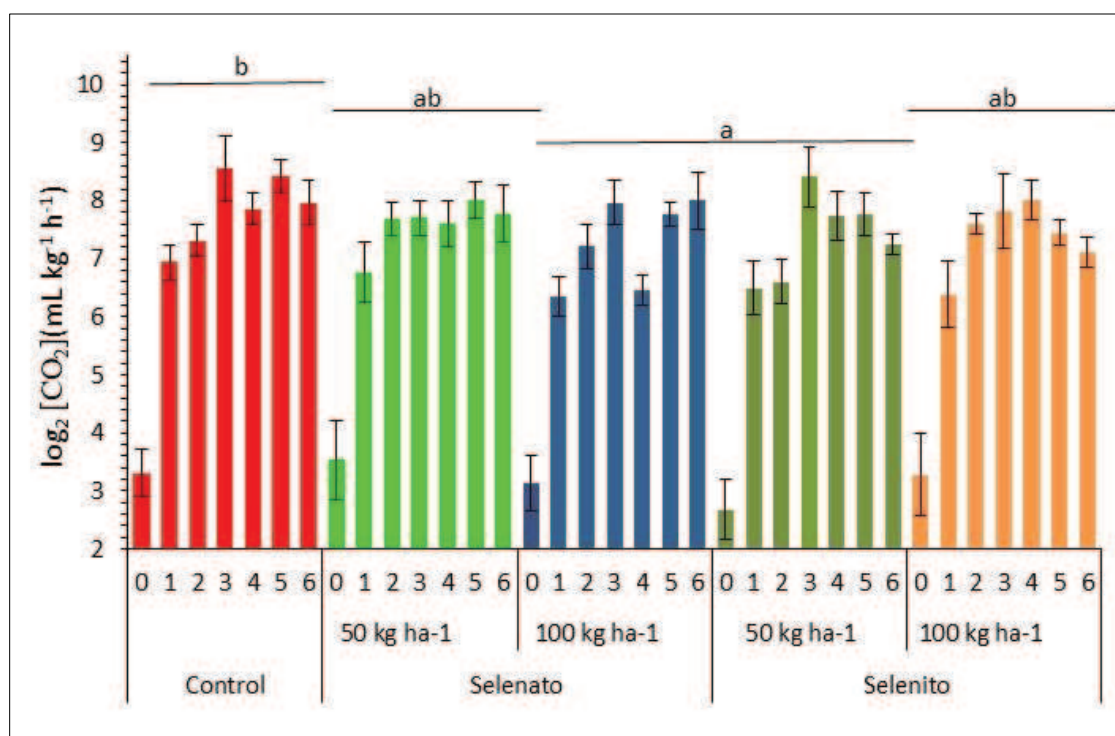
Es importante destacar que el menor valor observado de etileno, producto de que la aplicación de las sales de selenio, puede deberse a una menor tasa de producción durante la maduración de la pella, a que frena la producción producto del daño por la cosecha en los momentos entre la misma y la conservación o bien ambos.

Es conocida la sensibilidad del brócoli al etileno y su efecto más notable que es el rápido amarillamiento de las pellas, las cuales reducen un 50 % su vida poscosecha en contacto con etileno 2 ppm a 10 °C (Kader, 1985). Previamente se ha observado que el aumento de etileno en brócoli se puede aminorar con el almacenamiento en frío, y que este proceso se regula a nivel molecular por una disminución de la expresión de la ACC oxidasa (Ahlawat et al., 2022). Por otro lado, la degradación de clorofila en los floretes de brócoli puede ser retrasada con la aplicación de inhibidores de la síntesis de etileno (Aharoni, 1985). En este sentido, un método utilizado en frutas y hortalizas para inhibir la síntesis y acción del etileno es el uso del 1-metilciclopropeno (1-MCP) (Paliyath, 2009), un compuesto gaseoso que se asocia a los receptores de etileno en forma irreversible

impidiendo que se desencadene la señal (Watkins, 2006), y cuya aplicación ha permitido retrasar la senescencia en kiwi (Koukounaras & Sfakiotakis, 2007), manzana (Elfving et al., 2007), ciruela (Luo et al., 2009), higo (Freiman et al., 2012), entre otras. En brócoli, su aplicación mejoró la vida poscosecha tanto a temperatura ambiente como de refrigeración (Fan et al., 2000), manteniendo los niveles de clorofilas totales durante la poscosecha (Yuan et al., 2010) y actuando sobre la regulación transcripcional de las enzimas del metabolismo de etileno (Ma et al., 2008). Por otro lado, las diferencias observadas entre las mediciones de ACC y las de etileno puede deberse a las diferentes metodologías utilizadas.

Las mediciones de respiración, o producción de CO<sub>2</sub>, cuando se analizaron en el tiempo poscosecha, presentaron un patrón similar a la tasa de etileno. Aumentaron significativamente hasta llegar a un máximo a los 3 dpc, para estabilizarse en valores similares a los 5 y 6 dpc (Figura 20). En lo respectivo a los tratamientos, se observó una disminución significativa en la respiración en las aplicaciones con selenato 100 g ha<sup>-1</sup> y selenito 50 g ha<sup>-1</sup> con respecto al control en todos los tiempos poscosecha debido que en el análisis estadístico no se observó interacción entre el tiempo poscosecha y los diferentes tratamientos (Figura 20).

Previamente ha sido reportado que la aplicación de estrés puede afectar la respiración en las hortalizas (Martínez-Sánchez, 2008), lo cual genera la pérdida de material orgánico, con la consecuente pérdida en el peso y la calidad organoléptica de los productos (Kader, 2002). Como consecuencia de un aumento de la respiración se va a observar, entre otros, una aceleración de la senescencia. De esta manera, la reducción observada en la respiración debido a la aplicación de las sales de selenio de manera foliar, estaría contribuyendo es este aspecto a la demora observada para la afectación de las inflorescencias de brócoli en su poscosecha.



**Figura 20.** Efectos de la aplicación foliar de selenio en la respiración de las cabezas de brócoli cv. 'Legend', durante el almacenamiento poscosecha a 20 °C. Tratamientos foliares: control (■), selenato 50 g ha<sup>-1</sup> (■), selenato 100 g ha<sup>-1</sup> (■), selenito 50 g ha<sup>-1</sup> (■), y selenito 100 g ha<sup>-1</sup> (■). Tiempo de almacenamiento poscosecha: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días. ANOVA a dos factores: tratamiento con selenio y tiempo poscosecha, considerando la interacción entre ellos. Los resultados se expresan como la media (n = 6) ± ee. Los valores que poseen al menos una letra en común no son estadísticamente diferentes, con un nivel de significancia P < 0,05 según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

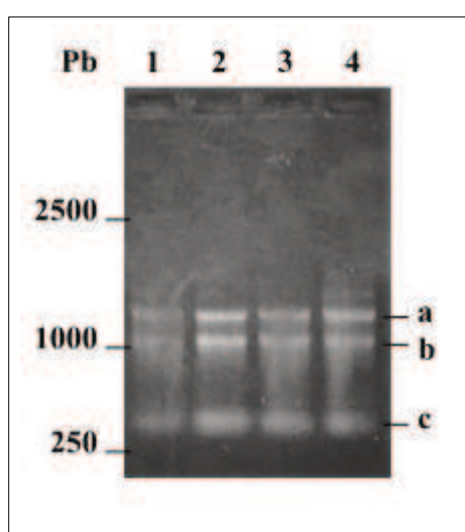
#### 4.3.6. Análisis preliminares de la expresión de genes para determinar el efecto de la aplicación de sales de selenio en diferentes vías

En diversos estudios se ha demostrado que el efecto de las prácticas destinadas a mejorar la vida poscosecha de hortalizas y, en particular, del brócoli, tienen un efecto a nivel fisiológico, bioquímico y molecular.

En forma paralela a los análisis fisiológicos y bioquímicos desarrollados en los puntos anteriores, se avanzó en el análisis molecular, para interpretar desde este punto de vista el efecto de la aplicación de las sales de selenio precosecha en brócoli. Este análisis incluiría la determinación de la expresión de genes inculcados en vías determinantes mediante PCR en tiempo real.

En principio, en el laboratorio no se disponía de un protocolo puesto a punto para extracción de ARN total. Los diversos trabajos que utilizan ARN total de pella de brócoli, realizan la extracción del mismo mediante el método del borato caliente (Wan & Wilkins,

1994). Debido a la complejidad de dicho protocolo, se propuso realizar la extracción usando el reactivo Trizol®. Luego de una serie de pruebas fue posible obtener resultados muy prominentes, con valores de rendimiento que variaron entre 2 y 5 ug para 100 mg de polvo de la pella. Por otro lado, los índices de pureza resultaron oscilantes y por debajo de 1,6 lo cual da un indicio de posibles contaminaciones, mientras que el patrón observado en geles de agarosa según lo esperado para la concentración medida y para un buen resultado de integridad (Figura 21). Como se puede observar las extracciones se realizaron sobre muestras de diferentes tiempos poscosecha, con valores similares, lo que indica que el procediendo no afectó la integridad de los ARN totales.



**Figura 21.** Electroforesis en gel de agarosa de ARN total aislado de las cabezas de brócoli cv. 'Legend'. Visualización de tres bandas de ARN intactas para 28 S ARN (a), 18 S ARN (b) y 5 S ARN (c). Los carriles del 1 y 2 contienen ARN total de las pellas control a los 4 dpc y al momento de cosecha y los carriles del 3 y 4 contienen ARN total de las pellas tratadas con 100 kg ha<sup>-1</sup> de selenato a los 4 dpc y al momento de cosecha, respectivamente.

Finalmente, dado que 1 µg es lo utilizado para la síntesis del ADN copia utilizando la transcriptasa reversa MML-V (Promega) y oligodT22, según las recomendaciones del fabricante, las cantidades obtenidas son altamente suficientes, y la calidad debería ser objeto de prueba.

Por otro lado, se procedió a determinar los oligonucleótidos que serían utilizados en el análisis. Para esto, en primer lugar se realizó una búsqueda bibliográfica de análisis similares en brócoli. De esta manera se pudo determinar que para analizar el efecto del

tratamiento con selenio sobre la degradación de clorofila durante la senescencia de brócoli, se habían utilizado oligos específicos reportados por Büchert et al. (2011a) y Gomez-Lobato et al. (2012a), para evaluar los niveles de expresión de los genes de clorofilasas (BoCLH1, N° acc. AF337544 y BoCLH2, N° acc. AF337545), feofitinas (BoPPH, N° acc. OL386R) y feoforbida a oxigenasa (BoPaO, N° acc. AM388844.1). Además, se determinaron los primers previamente diseñados para analizar la expresión del gen BoSGR que codifica para la proteína Stay-Green, utilizando por Gomez-Lobato et al. (2014).

Finalmente, con el objetivo de analizar a nivel molecular si el tratamiento precosecha con selenio afecta la degradación lipídica durante la senescencia poscosecha de brócoli, se detectaron los oligos previamente diseñados por Gomez-Lobato et al. (2012a) para analizar los niveles de expresión de un gen que codifica para una lipoxigenasa (BoLOX1). Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento con selenio sobre la vía biosintética de etileno, no fue posible detectar publicaciones con oligonucleótido y por lo tanto se diseñaron los mismos para establecer cambios en los niveles de expresión a partir de las secuencias publicadas (Pogson et al., 1995; Yang et al., 2003), de los genes ACC sintasa (*BoACS1*, N° acc. X82273 y *BoACS2*, N° acc. AF338651) y ACC oxidasa (*BoACO3*, N° acc. AF252853) indicados en la Tabla 11. Los mismos fueron chequeados utilizando la herramienta megablast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y los resultados arrojados permitieron inferir que eran específicos para estos genes. En la Tabla 11 se observan los oligos diseñados.

**Tabla 11.** Diseño de los oligonucleótidos para detectar las secuencias de los genes involucrados en la vía de síntesis de etileno. Se indica el nombre del gen, identificación de las secuencias (ID), longitud de los fragmentos amplificados (pb) y secuencias de oligos Left (L) y Right (R).

<i>Gen</i>	<i>ID</i>	<i>Tamaño (pb)</i>		<i>Secuencia del primer 5' - 3'</i>
<i>BoACS1</i>	X82273	123	<i>L</i>	GACACGCAGAGTTAACCACC
			<i>R</i>	TCTCCGAGTCGAATGTAGCC
<i>BoACS2</i>	AF338651	100	<i>L</i>	AGATCTCCTCGACTTCTGCG
			<i>R</i>	GGCTACGCTGGTGAATTCTG
<i>BoACO3</i>	AF252853	133	<i>L</i>	AATCTCGGTGACCAGCTTGA
			<i>R</i>	TAACAGAGTCGCTTCCAGGC

Para analizar el efecto del tratamiento con selenio sobre la degradación de clorofila durante la senescencia de brócoli, se detectaron oligonucleótidos específicos previamente reportados por Büchert et al. (2011a) y Gomez-Lobato et al. (2012a) para evaluar los niveles de expresión de los genes de clorofilasas, feofitinas y feoforbida a oxigenasa (Büchert et al., 2011a; Gomez-Lobato et al., 2012a). Además, para la evaluación de la expresión del gen *BoSGR* que codifica para la proteína *Stay-Green* utilizando los primers previamente diseñados por Gomez-Lobato et al. (2014). Los primers específicos para *BoSGR* fueron diseñados de la secuencia NYE de *Brasica oleracea* (GeneBank accession number: DK463677). En estos casos se efectuó la búsqueda de la secuencia de los genes mencionados en NCBI y se realizó un megablast de cada primer con el fragmento para confirmar la especificidad de los mismos. En la Tabla 12 se observan los oligos determinados.

**Tabla 12.** Diseño de los oligonucleótidos para detectar las secuencias de los genes involucrados en la vía del catabolismo de la clorofila. Se indica el nombre del gen, identificación de las secuencias (ID), longitud de los fragmentos amplificados (pb) y secuencias de oligos Left (L) y Right (R).

Gen	ID	Tamaño (pb)		Secuencia del primer 5' - 3'
<i>BoCLH1</i>	AF337544	90	L	AGACCCATCCATCAAGTTTTCAGC
			R	AGATTTTCGGGATCGGTTCTTATGC
<i>BoCLH2</i>	AF337545	130	L	AGATGCCTGTTCTAGTTATTGG
			R	CACGCTGGACCTTGACATTC
<i>BoPPH</i>	OL386R	91	L	AGAGGTTATCGGTGAGCCA
			R	GACGAGATGAGGATGGG
<i>BoPaO</i>	AM388844.1	90	L	GCGAAATTCCTCGTCCAGAGTCTC
			R	TTATCTCCGCCGTGCTCTTCTTC
<i>BoSGR</i>	<i>Stay-Green</i>		L	TTCCGACAACCGAAGTAA
			R	GTGAGCGTATAAGTTGG

Finalmente, se buscó en la base de datos NCBI la secuencia del gen que codifica para una lipoxigenasa (Gomez-Lobato et al., 2012a) y se le realizó un megablast con un juego de *primers* previamente diseñados por Gomez-Lobato et al. (2012a) para confirmar la especificidad de los mismos. Los primers se diseñaron en base a la secuencia de *A. thaliana* Atlg55020 publicada en data base. También de la bibliografía citada anteriormente se obtuvo la secuencia de los primers utilizados para amplificar el

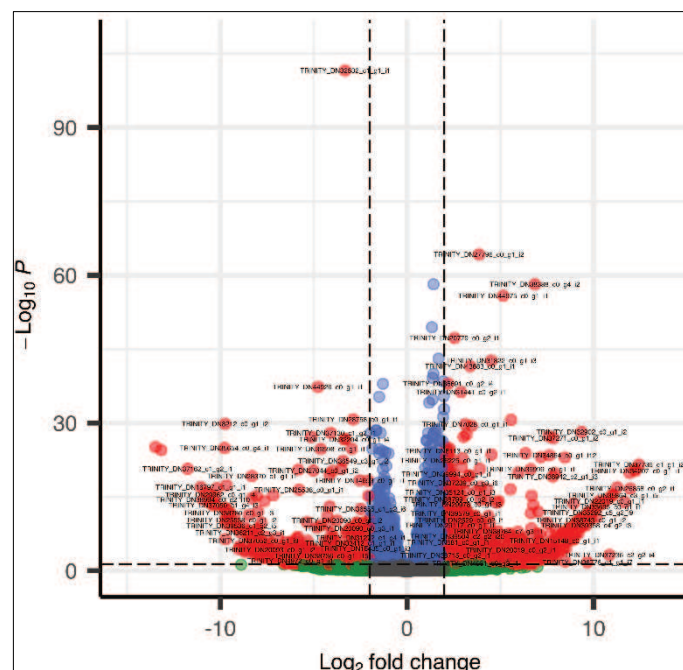
fragmento de actina utilizado como normalizador. En la Tabla 13 se observan los oligos diseñados.

**Tabla 13.** Diseño de los oligonucleótidos para detectar las secuencias de los genes involucrados en la vía de peroxidación de lípidos. Se indica el nombre del gen, identificación de las secuencias (ID), longitud de los fragmentos amplificados (pb) y secuencias de oligos Left (L) y Right (R).

<i>Gen</i>	<i>ID</i>	<i>Tamaño (pb)</i>	<i>Secuencia del primer 5' - 3'</i>	
<i>BoLOX1</i>	Atlg55020	111	<i>L</i>	TCTCCACGAATTTCTGGGAAACAAAG
			<i>R</i>	AGTCCTCTGAGTGTGTAGCCTTTC
	AF044573	137	<i>L</i>	CCAGAGGTCTTGTTCAGCCATC
			<i>R</i>	GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAC

Al momento de proceder a las mediciones de la expresión de los genes mediante las PCR en tiempo real, las actividades se vieron suspendidas por la pandemia producto del COVID19. Ante la imposibilidad de realizar los ensayos, nos abocamos a la búsqueda de información que nos permitiera inducir la modificación en la expresión de genes de estas vías. Como resultados fue posible detectar el trabajo de Rao et al. (2021) en el cual se realizó un análisis de RNA-Seq de pellas de brócoli, del cultivar Lvbeier, crecidos en macetas, a los cuales se trató mediante riego con 1,2 L de una solución 0,4 mmol L<sup>-1</sup> de selenato de sodio (un total de 90 mg por maceta). Salvando diferencias en la forma metodológica que se indican, el ensayo en principio resulta similar a lo realizado en la presente tesis. De esta manera se procedió a comenzar el análisis de los datos crudos, a falta de disponibilidad de los mismos en forma procesada en la publicación, de manera de obtener aquellos genes que presentaron expresión diferencial (Figura 22).





**Figura 22.** Gráfico de Volcano donde se pueden observar como puntos de diferentes colores los ensamblados de lecturas o transcritos de brócoli cv. 'Legend' según el análisis estadístico de las muestras tratadas con selenio y control. Se observa en color gris los que no fueron significativos para su p-value o su tasa de cambio (Fold change), en verde solo para FC, en azul solo para p-value y en rojo aquellos transcritos diferenciales para ambos parámetros.

En la búsqueda de los genes candidatos a ser analizados por PCR en tiempo real, por un lado, se pudo obtener varios transcritos producto del ensamblado mediante blast (E-value <-100), pero los resultados no fueron consistentes en cuanto a la expresión dado que había transcritos con expresión diferencial y otros que no.

Debido a esto se definió repetir el análisis de los datos posteriormente de la presentación de este trabajo de Tesis, utilizando nuevas estrategias. Con estos resultados, sumado a la validación por real time, será posible concluir sobre el efecto a nivel molecular de la aplicación de sales de selenio en precosecha.

#### 4.4. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos se puede concluir que la aplicación de selenio sobre el cultivo de brócoli afecta en parte la generación de ROS y peroxidación lipídica, produciendo en general una disminución mas marcada que el control según los tratamientos. Lo que se observa en peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos no

se ve reflejado en daño de membrana, lo que puede asociarse a la actividad de enzimas detoxificantes.

Además, la aplicación de sales de selenio reduce, en dos de los tratamientos, el nivel de emisión de etileno y la respiración, siendo los primeros indicios de como se regularía a nivel fisiológico la vida poscosecha. En perspectiva, será considerado analizar como se regulan estos efectos a nivel molecular, abarcando los diferentes aspectos.

Es importante mencionar que en este capítulo de la tesis el análisis se realizó en uno de los cultivares, 'Legend', y con triplicado biológico, lo cual se debe a una reducción de los ensayos a realizar. Esto implica que los resultados obtenidos deberían ser repetidos en otros cultivares dado que pueden obtenerse resultados diferentes, y no es posible extrapolar los mismos.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

---

El brócoli, *B. oleracea* L. var. *italica* Plenck, es una hortaliza que se originó por el cultivo y domesticación de la especie *B. oleracea* L. en la región del Mediterráneo. El término que le da nombre deriva de la palabra italiana “broccolo”, que hace referencia a la inflorescencia inmadura de cualquier miembro de la familia Brassicaceae. Este se ha convertido, desde hace varias décadas, en un vegetal popular en varias partes del mundo, debido a su gran valor nutricional, bajo poder calórico, alto contenido de fibra, importantes niveles de ácido ascórbico, vitaminas y minerales y por su amplio rango de compuestos anticancerígenos y antioxidantes.

La parte comestible del brócoli son las inflorescencias, que se cosechan mientras las cabezas florales están totalmente inmaduras. Este corte genera cambios metabólicos que aceleran el proceso de deterioro, produciendo decoloración y amarillamiento de los sépalos, acompañado de degradación de la clorofila, pérdida de la dureza y reducción en su valor nutricional, con un alto impacto en la calidad comercial. Además, este deterioro se hace progresivo durante este período de poscosecha hasta el consumo debido a las diversas etapas que atraviesan las inflorescencias (transportes, centralización en los mercados, transporte a los puntos de venta, exposición en las góndolas).

En ese sentido, con el fin de preservar la calidad comercial y nutricional durante la vida poscosecha del brócoli, varios trabajos de investigación han estudiado el efecto de diferentes tratamientos de tipo físico, químico y agronómicos al momento, o luego de la cosecha. En contraposición, la influencia de las condiciones previas a la cosecha, como el tipo de suelo, el efecto del clima, el del estrés o el tratamiento con agroquímicos, ha sido poco analizado hasta la fecha.

Por otro lado, el brócoli es uno de los grandes acumuladores de selenio, característica que le otorga una ventaja nutracéutica, dado que el selenio es un micronutriente crucial para la salud y el desarrollo humano. Si bien varios estudios han reportado la aplicación de selenio para llegar a una producción comercial de brócoli enriquecido que, si bien lograron buenos resultados en la incorporación, son factibles de mejoras utilizando nuevas metodologías. Además, resulta importante destacar que, en ninguno de los estudios realizados, se analizó el efecto de los tratamientos con selenio en poscosecha.

En ese sentido, en el presente trabajo tesis, se realizaron tratamientos de aplicación foliar en precosecha de selenio sobre la producción y senescencia poscosecha de brócoli, buscando generar un incremento del contenido de selenio, sin afectar o con un aumento en la producción y un retraso la senescencia poscosecha en las inflorescencias.

Las aplicaciones de selenio realizadas abarcando un amplio espectro de posibilidades, permitieron diferenciarse de otros trabajos publicados y obtener resultados de alto impacto. En este caso se utilizaron dos sales de selenio (selenito y selenato de sodio) en lugar de una de ellas, a dos concentraciones (50 y 100 g ha<sup>-1</sup>), mediante dos aplicaciones foliares (al inicio de la formación de la cabeza, en el momento de la aparición del botón floral), y utilizando un coadyuvante (Rizospray Extremo® al 0,1 %, RIZOBACTER, Argentina), siendo este último punto el único reportado con respecto a los trabajos previos. Además, se estudiaron dos variedades de brócoli utilizadas comercialmente ('Belstar' F1 y 'Legend' F1), y se realizaron los ensayos en condiciones similares a producción (a campo) o en ambiente controlado (maceta).

Los resultados obtenidos al momento de la cosecha mostraron que los parámetros de crecimiento de la planta (área foliar y altura) no fueron influenciados, el peso seco de la planta y el PF de la cabeza aumentó en 'Belstar', si bien no tuvieron efecto sobre el contenido de materia seca de la cabeza, y se observó un aumento de la eficiencia en el uso del agua en 'Belstar', debido a una reducción en la tasa de transpiración, lo cual puede explicar el aumento en el peso fresco de las pellas (Muñoz et al., 2021). Por otra parte, se obtuvieron incrementos significativos en el contenido de selenio en hojas y cabezas de ambos cultivares; independientemente de la sal de selenio utilizada (selenato o selenito) (Muñoz et al., 2021). Comparado con otros trabajos, fue posible obtener una mayor asimilación de selenio en hojas y pellas, durante la aspersion sobre las hojas (Muñoz et al., 2021). Este enriquecimiento en selenio de las cabezas de brócoli no afecta o, inclusive mejora, parte parámetros de producción (Muñoz et al., 2021).

Cuando se analizó el período de almacenamiento poscosecha, después de dos condiciones de crecimiento y dos temperaturas de conservación diferentes (4 y 20 °C), varios de los parámetros analizados presentaron mejoras. Tanto el examen de la apariencia externa de las cabezas, como la cuantificación de los parámetros Hue y L, mostró un retraso en el amarillamiento, en algunos tiempos poscosecha en parte de las muestras tratadas en comparación con los controles (Trod et al., 2023). Además, las cabezas tratadas mantuvieron la firmeza y el diámetro de manera más eficientemente. Notablemente, los resultados fueron similares tanto para las condiciones de crecimiento como para los cultivares (Trod et al., 2023). Finalmente, el mismo análisis se realizó en cabezas de brócoli almacenadas a baja temperatura, mostrando también diferentes parámetros de mejora en los grupos tratados con selenio en comparación con el control (Trod et al., 2023).

Considerando estos resultados, se procedió a intentar explicar a nivel fisiológico y molecular cuales serían los mecanismos que sufren modificaciones por la aplicación foliar de selenio, y dan como consecuencia una mejor vida poscosecha de las inflorescencias del brócoli. A nivel fisiológico pudo observarse los tratamientos con selenio aminoran la pérdida de peso (indicador de la capacidad de retener agua y evitar la pérdida de turgencia), la degradación de clorofila y carotenoides, la formación de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica (esta última sin que se detecten cambios a nivel de la membrana celular) y, como resultado más notorio, se observó una disminución en la emisión de etileno y en la respiración en dos de los tratamientos. Estos resultados en su conjunto permiten sugerir que las aplicaciones de sales de selenio producirían una disminución en dicha hormona vegetal, con el consecuente impacto sobre la degradación de la clorofila y como consecuencia en el amarillamiento, además de que se reducen el daño a nivel celular producido por la cosecha o el almacenamiento (Casajús et al., 2021). Finalmente, con el objetivo de determinar si la regulación se origina a nivel molecular, por un lado, se buscaron los oligonucleótidos para analizar la expresión de genes claves en los diferentes procesos, y se puso a punto la extracción de ARN. Las transcripciones reversas y posteriores PCR en tiempo real no fueron ensayadas debido a demoras relacionadas a la pandemia del COVID19. Debido a este impedimento se buscaron alternativas y se pudo detectar una publicación donde realizaban un experimento similar de aplicación de selenio en brócoli seguido del análisis de secuenciación de ARN mensajeros, lo cual permite estimar la expresión de los genes (Rao et al., 2021). Los datos crudos fueron procesados, mediante lo cual se obtuvo el conjunto de genes que cambiaron su expresión, dentro de los cuales se está analizando los genes de interés. Como perspectiva a futuro, se plantea analizar estos resultados y realizar las PCR en tiempo real de manera de complementar los estudios fisiológicos mediante un enfoque molecular. Considerando todos los resultados expuestos, este nuevo protocolo de aplicación de selenio es una tecnología prometedora que podría beneficiar la producción de cultivares de brócoli y permitirá tener un producto enriquecido, apto para el consumo humano y con mejor vida útil en el mercado. La realización de nuevos estudios utilizando un número mayor de variedades de brócoli y otras especies de vegetales de las Brasicáceas, como la combinación de los diferentes tratamientos analizados en esta tesis, permitirá establecer un nuevo fertilizante y su respectiva metodología de aplicación, para obtener hortalizas enriquecidas con selenio y con una mejor sobrevida poscosecha.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Able, A. J., Wong, L. S., Prasad, A., & O'Hare, T. J. (2002). 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *hinensis*). *Postharvest Biology and Technology*, 26, 147-155.
- AgMRC. (2021). Brócoli. Agricultural Market Resource Center. USDA. Agriculture and aquaculture: report of a WHO scientific group. World Health. <https://www.agmrc.org/commodities-products/vegetables/broccoli>.
- Aharoni, N. (1985). Modified atmospheres to delay senescence and decay of broccoli. In *Proceedings of the 4th National Controlled Atmosphere Conference*, Department of Horticultural Science, Raleigh, NC. Hort. Rep, 126, 169-177.
- Ahlawat, Y., Li, S., Timilsena, P. R., Pliakoni, E. D., Brecht, J. K., & Liu, T. (2022). Identification of senescence associated genes in broccoli (*Brassica oleracea*) following harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 183, 111-729.
- Aiamla-or, S., Yamauchi, N., Takino, S., & Shigyo, M. (2009). Effect of UVA and UV-B irradiation on broccoli (*Brassica oleracea* L. *Italica* Group) floret yellowing during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 54, 177-179.
- Alcaraz-Lopez, C., Botia, M., Alcaraz, C. F., & Riquelme, F. (2003). Effects of foliar sprays containing calcium, magnesium and titanium on plum (*Prunus domestica* L.) fruit quality. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1441-1446.
- Ayele, M., Haas, B. J., Kumar, N., Wu, H., Xiao, Y., Van Aken, S., Utterback, R., Wortman, J., White, O., & Town, C. D. (2005). Whole genome shotgun sequencing of *Brassica oleracea* and its application to gene discovery and annotation in *Arabidopsis*. *Genome research*, 15, 487-495.
- Ayoub, A., Mushtaq, M., Mir, Z. A., & Dar, A. A. (2020). Biofortification in Fruits. In: Sharma, T.R., Deshmukh, R., Sonah, H. (eds). *Advances in Agri-Food Biotechnology*. Springer, 131-151.
- Bañuelos, G. S., Lin, Z. Q., & Broadley, M. (2017). Selenium biofortification. *Selenium in plants: Molecular, physiological, ecological and evolutionary aspects*, 231-255.
- Barth, M. M., Kerbel, E. L., Perry, A. K., & Schmidt, S. J. (1993). Modified Atmosphere Packaging Affects Ascorbic Acid, Enzyme Activity and Market Quality of Broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 58, 140-143.
- Beers, E. P., Woffenden, B. J., & Zhao, C. (2000). Plant proteolytic enzymes: Possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, 44, 399-415.



- Boldrin, P. F., Faquin, V., Clemente, A. D. C. S., de Andrade, T., & Guilherme, L. R. G. (2018). Genotypic Variation and Biofortification with Selenium in Brazilian Wheat Cultivars. *J Environ Qual.*, 47, 1371-1379.
- Bolea, J. (2002). Cultivo de coles, coliflores y brócolis. Editorial Síntesis. Primera edición. Barcelona, España.
- Bouis, H. E., & Welch, R. M. (2010). Biofortification a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south. *Crop science*, 50, 1-20.
- Bouis, H. E., Hotz, C., McClafferty, B., Meenakshi, J. V., & Pfeiffer, W. H. (2011). Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food and nutrition bulletin*, 32, 31-40.
- Broekgaarden, C., Caarls, L., Vos, I. A., Pieterse, C., & Van Weesand, S. (2015). Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant Physiology*, 169, 2371-2379.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., & Pink, D. (2003). The molecular analysis of leaf senescence a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1, 3-22.
- Büchert, A. M., 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, 355-361.
- Büchert, A. M., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2011a). Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytilation during senescence of broccoli. *Journal of Plant Physiology*, 168, 337-343.
- Cantwell, M. I., & Kasmire, R. F. (2002). Handling systems: flower, leafy, and stem vegetables. *Postharvest technology of horticultural crops*, 423-432.
- Cantwell, M., & Suslow, T. (1999). Broccoli: Recommendation for maintaining postharvest quality. Department of Plant Sciences, University of California, Davis. Page: <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Broccoli>.
- Cartes, P., Gianfreda, L., & Mora, M. L. (2005). Uptake of Selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite Forms. *Plant Soil*, 276, 359-367.

- Casajús, V., Civello, P., Martínez, G., Howe, K., Fish, T., Yang, Y., & Lobato, M. G. (2021). Effect of continuous white light illumination on glucosinolate metabolism during postharvest storage of broccoli. *LWT*, 145, 111302.
- Céccoli, G., Senn, M. E., Bustos, D., Ortega, L. I., Córdoba, A., Vegetti, A., & Taleisnik, E. (2012). Genetic variability for responses to short and long term salt stress in vegetative sunflower plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175, 882-890.
- Celen, I. (2010). The effect of spray mix adjuvants on spray drift. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 16, 105-110.
- Chauhan, R., Awasthi, S., Tripathi, P., Mishra, S., Dwivedi, S., Niranjana, A., Mallick, S., Tripathi, P., Pande, V., & Tripathi, R. D. (2017). Selenite modulates the level of phenolics and nutrient element to alleviate the toxicity of arsenite in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138, 47-55.
- Chen, B., & Yang, H. (2013). 6-Benzylaminopurine alleviates chilling injury of postharvest cucumber fruit through modulating antioxidant system and energy status. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1915-1921.
- Chen, Y., Chen, L., & Shaw, J. (2008). Senescence associated genes in harvest broccoli florets. *Plant Science*, 175, 137-144.
- Clarkson, G. J., Rothwell, S. D., & Taylor, G. (2005). End of day harvest extends shelf life. *Hort Science*, 40, 1431-1435.
- Costa, M. L., Vicente, A. R., Civello, P. M., Chaves, A. R., & Martínez, G. A. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 204-210.
- Costa, M. L., Civello, P. M., Chaves, A. R., & Martínez, G. A. (2005b). Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20°C. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 91-199.
- Costa, M. L., Civello, P. M., Chaves, A. R., & Martínez, G. A. (2005a). Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*Brassica oleracea* L var *Italica*) heads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1154-1160.
- Coupe, S. A., Sinclair, B. K., Watson, L. M., Heyes, J. A., & Eason, J. R. (2003). Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1045-1056.

- Cuesta, G., & Fusari Gómez, C. M. (2022). New contributions in the production and processing of Broccoli (*Brassica oleracea* L var. *italic* Plenck): a review. *Horticultura Argentina*, 41, 223-245.
- Das, P., & Ghosh, D. (2021). Yours truly broccoli. *Science and Culture*, 8, 3-4.
- Di Benedetto, A. (2005). Manejo de cultivos hortícolas: bases ecofisiológicas y tecnológicas. Primera edición. Orientación gráfica editora. Buenos Aires. 373 p.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2017). InfoStat. Statistical Software. Grupo Infostat FCA UNC.
- Dixon, G. R. (2007). Vegetable brassicas and related crucifers. CABI.
- Djanaguiraman, M., Devi, D. D., Shanker, A. K., Sheeba, J. A., & Bangarusamy, U. (2005). Selenium: an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant and Soil*, 272, 77-86.
- Drutel, A., Archambeaud, F., & Caron, P. (2013). Selenium and the thyroid gland: more good news for clinicians. *Clinical Endocrinology*, 78, 155-164.
- Duarte-Sierra, A., Forney, C. F., Michaud, D., Angers, P., & Arul, J. (2017). Influence of hormetic heat treatment on quality and phytochemical compounds of broccoli florets during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 128, 44-53.
- EGVM. (2002). Revised review of selenium (EVM/99/17). United Kingdom Expert Group on Vitamins and Minerals.
- Elfving, D. C., Drake, S. R., Reed, A. N., & Visser, D. B. (2007). Preharvest applications of sprayable 1-methylcyclopropene in the orchard for management of apple harvest and postharvest condition. *Horticulture Science*, 42, 1192-1199.
- Ellis, D. R., & Salt, D. E. (2003). Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 273-279.
- El-Mogy, M. M., Mahmoud, A. W. M., El-Sawy, M. B. I., & Parmar, A. (2019). Pre-harvest foliar application of mineral nutrients to retard chlorophyll degradation and preserve bio-active compounds in broccoli. *Agronomy*, 9, 711.
- Estringüa, A., Turan, M., Gunes, A., Eşitken, A., & Sambo, P. (2011). Boron application improves on yield and chemical composition of strawberry. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil and Plant Science*, 61, 245-252.
- Fageria, N. K., Baligar, V. C., & Clark, R. B. (2002). Micronutrients in crop production. *Advances in agronomy*, 77, 185-268.

- Fan, X., Argenta, L., & Mattheis, J. P. (2000). Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 135-142.
- FAO. (2020). <https://www.fao.org/3/cb4477en/cb4477en.pdf>
- FAO/WHO. (1998). Preparation and use of food-based dietary guidelines. Report of a joint FAO/WHO consultation. World Health Organization.
- Filek, M., Sieprawska, A., Kościelniak, J., Oklestkova, J., Jurczyk, B., Telk, A., Biesaga-Kościelniak, J., & Janeczko, A. (2019). The role of chloroplasts in the oxidative stress that is induced by zearalenone in wheat plants: the functions of 24-epibrassinolide and selenium in the protective mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 137, 84-92.
- Finley, J. W., Ip, C., Lisk, D. J., Davis, C. D., Hintze, K. J., & Whanger, P. D. (2001). Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49, 2679-2683.
- Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. (2000). Institute of Medicine. National Academy Press. Washington. D.C. p 35-94.
- Foster, L. H., & Sumar, S. (1996). Hydride generation atomic absorption spectrometric (HGAAS) determination of selenium in term and preterm infant formulae available in the United Kingdom. *Food Chemistry*, 55, 293-298.
- Freiman, Z. E., Rodov, V., Yablovitz, Z., Horev, B., & Flaishman, M. A. (2012). Preharvest application of 1-methylcyclopropene inhibits ripening and improves keeping quality of 'Brown Turkey' figs (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae*, 138, 266-272.
- Fukasawa, A., Suzuki, Y., Terai, H., & Yamauchi, N. (2010). Effects of postharvest ethanol vapor treatment on activities and gene expression of chlorophyll catabolic enzymes in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 97-102.
- Funamoto, Y., Yamauchi, N., Shigenaga, T., & Shigyo, M. (2002). Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 24, 163-170.
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1997). Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant physiology*, 113, 313.

- Gao, J., Si, Y., Zhu, Y., Luo, F., & Yan, S. (2018). Temperature abuse timing affects the rate of quality deterioration of postharvest broccoli during different pre-storage stages. *Scientia Horticulturae*, 227, 207-212.
- Gapper, N. E., Coupe, S. A., McKenzie, M. J., Sinclair, B. K., Lill, R. E., & Jameson, P. E. (2005). Regulation of harvest-induced senescence in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) by cytokinin, ethylene, and sucrose. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24, 153-165.
- García-Márquez, V., Morelos-Moreno, Á., Benavides Mendoza, A., & Medrano-Macías, J. (2020). Ionic selenium and nanoselenium as biofortifiers and stimulators of plant metabolism. *Agronomy*, 10, 1399.
- Gaucin-Delgado, J. M., Hernandez-Montiel, L. G., Sanchez Chavez, E., Ortega-Ortiz, H., Fortis-Hernandez, M., Reyes-Pérez, J. J., & Preciado-Rangel, P. (2020). Agronomic biofortification with selenium improves the yield and nutraceutical quality in tomato under soilless conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoc*, 48, 1221-1232.
- GBIF Secretariat (2022). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2023-07-18.
- Germ, M., Stibilj, V., Osvald, J., & Kreft, I. (2007). Effect of selenium foliar application on chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 795-798.
- Ghasemi, Y., Ghasemi, K., Pirdashti, H., & Asgharzadeh, R. (2016). Effect of selenium enrichment on the growth, photosynthesis and mineral nutrition of broccoli. *Notulae Scientia Biologicae*, 8, 109-203.
- Gomez-Lobato, M., Mansilla, S., Civello, P., & Martínez, G. (2014). Expression of *Stay-Green* encoding gene (*BoSGR*) during postharvest senescence of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 95, 88-94.
- Gomez-Lobato, M. E., Hasperué, J. H., Civello, P., Chaves, A. R., & Martínez, G. (2012b). Effect of 1-MCP on the expression of chlorophyll degrading genes during senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Scientia Horticulturae*, 144, 208-211.
- Gomez-Lobato, M. E., Civello, P. M., & Martinez, G. A. (2012a). Effects of ethylene, cytokinin and physical treatments on *BoPaO* gene expression of harvested broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 151-158.

- Gong, Y., & Mattheis, J. P. (2003). Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on chlorophyll catabolism of broccoli florets. *Plant Growth Regulation*, 40, 33-38
- Gordon, J. (2010). Propuesta de mejoramiento de manejo de Post-cosecha en hortalizas producidas en un sistema campesino asociado. Tesis Ing. agroindustrial. Ecuador. Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química Agroindustria. 3-4 p. <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2063/1/CD-2867.pdf>.
- Graham, I. A., & Eastmond, P. J. (2002). Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Progress in Lipid Research*, 41, 156-181.
- Guo, Y., Gao, Z., Li, L., Wang, Y., Zhao, H., Hu, M., Li, M., & Zhang, Z. (2013). Effect of controlled atmospheres with varying O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> levels on the postharvest senescence and quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) florets. *European Food Research and Technology*, 237, 943-950.
- Guo, Y., Wang, L., Chen, Y., Yun, L., Liu, S., & Li, Y. (2018). Stalk length affects the mineral distribution and floret quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) heads during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 145, 166-171.
- Gupta, M., & Gupta, S. (2017). An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2074.
- Hartikainen, H., & Xue, T. (1999). The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. *Journal of Environmental Quality*, 28, 1372-1375.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Raza, A., Hawrylak-Nowak, B., Matraszek-Gawron, R., Nahar, K., & Fujita, M. (2020). Selenium toxicity in plants and environment: biogeochemistry and remediation possibilities. *Plants (Basel)*, 9, 1711.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2011). Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research*, 143, 1704-1721.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2010). Selenium in higher plants: Physiological role, antioxidant metabolism and abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Sciences*, 5, 354-375.
- Hasperué, J., Chaves, A., & Martínez, G. (2011). End of day harvest delays postharvest senescence of broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 64-70.
- Hatfield, J. L., & Dold, C. (2019). Water-use efficiency: Advances and challenges in a

- changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 10, 103.
- Hawrylak-Nowak, B., Sławomir, D., Rubinowska, K., Matraszek-Gawron, R., Woch, W., & Hasanuzzaman, M. (2018). Selenium biofortification enhances the growth and alters the physiological response of lamb's lettuce grown under high temperature stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127, 446-456.
- Hawrylak-Nowak, B., Matraszek, R., & Pogorzelec, M. (2015). The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 41.
- Hawrylak-Nowak, B. (2013). Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. *Plant Growth Regulation*, 70, 149-157.
- Hörtensteiner, S. (2006). Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 55-77.
- Hossain, A., Skalicky, M., Brestic, M., Maitra, S., Sarkar, S., Ahmad, Z., Vemuri, H., Garai, S., Mondal, M., Bhatt, R., Kumar, P., Banerjee, P., Saha, S., Islam, T., & Laing, A. M. (2021). Selenium biofortification: roles, mechanisms, responses and prospects. *Molecules*, 26, 881.
- Hsu, F. C., Wirtz, M., Heppel, S. C., Bogs, J., Krämer, U., Khan, M. S., Bub, A., Hell, R., & Rausch, T. (2011). Generation of Se-fortified broccoli as functional food: impact of Se fertilization on metabolism. *Plant, Cell and Environment*, 34, 192-207.
- Hu, Q., Xu, J., & Pang, G. (2003). Effect of selenium on the yield and quality of green tea leaves harvested in early spring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3379-3381.
- Hu, Q., Chen, L., Xu, J., Zhang, Y., & Pan, G. (2002). Determination of selenium concentration in rice and the effect of foliar application of Se-enriched fertilizer or sodium selenite on the selenium content of rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 869-872.
- Hu, Y., Jiang, Y., Han, X., Wang, H., Pan, J., & Yu, D. (2017). Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: crosstalk with other phytohormones. *Journal of Experimental Botany*, 68, 1361-1369.

- Ilahy, R., Tlili, I., Pék, Z., Montefusco, A., Siddiqui, M. W., Homa, F., Hdider, C., R'Him, T., Lajos, H., & Lenucci, M. S. (2020). Pre and post harvest factors affecting glucosinolate content in broccoli. *Frontiers in Nutrition*, 7, 147.
- Inskeep, W. P., & Bloom, P. R. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll a and B in n,n-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiology*, 77, 483-485.
- INTA. (1991). Carta de Suelos de la República Argentina. Hojas 3160-26. Esperanza-Pilar. INTA Rafaela.
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-19.
- Iqbal, N., Masood, A., Iqbal, M., Khan, R., Asgher, M., Fatma, M., & Khan, N. A. (2013). Cross-talk between sulfur assimilation and ethylene signaling in plants. *Plant Signal and Behavior*, 8, e22478.
- Jacobsson, A., Nielsen, T., Sjöholm, I., & Wendin, K. (2004). Influence of packaging material and storage condition on the sensory quality of broccoli. *Food Quality and Preference*, 15, 301-310.
- Jambunathan, N. (2010). Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Methods in Molecular Biology*, 639, 292-298.
- Jaramillo N. J. E.; Diaz, D. C. A (2005). El Cultivo de las Crucíferas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Manual Técnico 4, 176 p.
- Jia, C. G., Xu, C. J., Wei, J., Yuan, J., Yuan, G. F., Wang, B. L., & Wang, Q. M. (2009). Effect of modified atmosphere packaging on visual quality and glucosinolates of broccoli florets. *Food Chemistry*, 114, 28-37.
- Jiang, A., Zuo, J., Zheng, Q., Guo, L., Gao, L., Zhao, S., Wang, Q., & Hu, W. (2019). Red LED irradiation maintains the postharvest quality of broccoli by elevating antioxidant enzyme activity and reducing the expression of senescence-related genes. *Scientia Horticulturae*, 251, 73-79
- Jibrán, R., Hunter, D. A., & Dijkwel, P. P. (2013). Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology*, 82, 547-561.
- Jones, M. L. (2004). Changes in Gene Expression during Senescence. *Plant Cell Death Processes*. Nooden, L. (Ed.), Elsevier, 392 p.



- Jones, R. B., Faragher, J. D., & Winkler, S. (2006). A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 1-8.
- Kader, A. A. (2002). Postharvest technology of horticultural crops. Kader, A. A. (Ed.), University of California Agriculture and Natural Resources, 535 p.
- Kader, A. A. (1985). Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. *Horticulturae Science*, 20, 54-57.
- Kápolna, E., Hillestrom, P. R., Laursen, K. H., Husted, S., & Larsen, E. H. (2009). Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chemistry*, 115, 1357-1363.
- Kieliszek, M., & Błazejak, S. (2016). Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review. *Molecules*, 21, 609.
- Kieliszek, M., & Błazejak, S. (2013). Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 29, 713-718.
- King, G. A., & Morris, S. C. (1994). Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 1000-1005.
- Kleine-Kalmer, R., Profeta, A., Daum, D., & Enneking, U. (2021). Pre-launch exploration of consumer willingness to purchase selenium and iodine biofortified apples a discrete choice analysis of possible market settings. *Nutrients*, 13, 1625.
- Köhrle, J., Brigelius-Flohé, R., Böck, A., Gärtner, R., Meyer, O., & Flohé, L. (2000). Selenium in biology: facts and medical perspectives. 381, 849-864.
- Kotrebai, M., Birringer, M., Tyson, J. F., Block, E., & Uden, P. C. (2000). Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents. *Analyst*, 125, 71-8.
- Koukounaras, A., & Sfakiotakis, E. (2007). Effect of 1-MCP pre-storage treatment on ethylene and CO<sub>2</sub> production and quality of 'Hayward' kiwi fruit during shelf-life after short, medium and long term cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 174-180.
- Krarup, C. H. (1992). Seminario sobre la producción de brócoli. Quito (Ecuador), PROEXANT, 25 p.
- Kuai, B., Chen, J., & Hörtensteiner, S. (2018). The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *Journal of Experimental Botany*, 69, 751-767.

- Lemoine, M. L., Civello, P. M., Martínez, G. A., & Chaves, A. R. (2007). Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Journal of the Science Food and Agriculture*, 87, 1132-1139.
- Lim, P. O., Kim HJ Fau – Nam, H. G., Nam, H. G. (2007). Leaf senescence. *Annual Review Plant Biology*, 58, 115-136.
- López, M. D., Revelo, M. C., & Pachón, H. (2008). El consumo y la producción familiar de frijol, maíz, yuca, batata y arroz en un municipio rural en Colombia: evaluación de la posibilidad de implementar la biofortificación de cultivos. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 10, 11-21. Recuperado de <https://hdl.handle.net/10568/65899>.
- Luo, Z., Xie, J., Xu, T., & Zhang, L. (2009). Delay ripening of ‘Qingnai’ plum (*Prunus salicina* Lindl.) with 1-methylcyclopropene. *Plant Science*, 177, 705-709.
- Lv, J., Wu, J., Zuo, J., Fan, L., Shi, J., Gao, L., Li, M., & Wang, Q. (2017). Effect of Se treatment on the volatile compounds in broccoli. *Food Chemistry*, 216, 225-233.
- Lyi, S. M., Heller, L. I., Rutzke, M., Welch, R. M., Kochian, L. V., & Li, L. (2005). Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli. *Plant Physiology*, 138, 409-420.
- Ma, G., Wang, R., Wang, C. R., Kato, M., Yamawaki, K., Qin, F. F., & Xu, H. L. (2009). Effect of 1-methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli. *Plant Growth Regulation*, 57, 223-232.
- Ma, N., Xue, J., Li, Y., Liu, X., Dai, F., Jia, W., & Gao, J. (2008). Rh-PIP2; 1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant physiology*, 148, 894-907.
- Mallari, S. (2019). ¿Cultivos biofortificados o biodiversidad? La lucha por verdaderas soluciones está en marcha. <https://grain.org/system/articles/pdfs/000/006/245/original/Biofortified%20Crop%20ES%2002.pdf?1559642333>.
- Malorgio, F., Diaz, K. E., Ferrante, A., Mensuali-Sodi, A., & Pezzarossa, B. (2009). Effects of selenium addition on minimally processed leafy vegetables grown in a floating system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 89, 2243-2251.
- Markwell, J., Osterman, J. C., & Mitchell, J. L. (1995). Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research*, 46, 467-472.

- Maroto, J. V. (1997). Etiología y descripción de las principales fisiopatías de la horticultura mediterránea. Ed. y Prom. Lav. Valencia.
- Martínez, G. A., Civello, P. M., Chaves, A. R., & Añón, M. C. (2001). Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry*, 58, 379-387.
- Martínez-Sánchez, A., Gil-Izquierdo, Á., Gil Muñoz, M. I., & Ferreres, F. A. (2008). Comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 2330-2340.
- Martos, S., Gallego, B., Cabot, C., Llugany, M., Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2016). Zinc triggers signaling mechanisms and defense responses promoting resistance to *Alternaria brassicicola* in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Science*, 249, 13-24.
- Matile, P., Hörtensteiner, S., & Thomas, H. (1999). Chlorophyll degradation. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, 50, 67-95.
- Mayer, J. E., Pfeiffer, W. H., & Beyer, P. (2008). Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current opinion in Plant Biology*, 11, 166-170.
- Mechora, Š., Placido Torres, D., Bruns, R. E., Škof, M., & Ugrinović, K. (2017). Effect of selenium treated broccoli on herbivory and oviposition preferences of *Delia radicum* and *Phyllotreta* spp. *Scientia Horticulturae*, 225, 445-453.
- Mechora, Š., Stibilj, V., Kreft, I., & Germ, M. (2014). The physiology and biochemical tolerance of cabbage to Se (VI) addition to the soil and by foliar spraying. *Journal of Plant Nutrition*, 37, 2157-2169.
- Meir, S., Salim, S., Chernov, Z., & Philosoph-Hadas, S. (2007). Quality improvement of cut flowers and potted plants with postharvest treatments based on various cytokinins and auxins. *Acta Horticulturae*, 755, 143-154.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54, 149-155.
- Mimmo, T., Tiziani, R., Valentinuzzi, F., Lucini, L., Nicoletto, C., Sambo, P., & Cesco, S. (2017). Selenium Biofortification in *Fragaria x ananassa*: implications on strawberry fruits quality, content of bioactive health beneficial compounds and metabolomic profile. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1887.
- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Plant Physiology*, 52, 89-118.

- Mozafariyan, M., Kamelmanesh, M. M. & Hawrylak-Nowak, B. (2016). Ameliorative effect of selenium on tomato plants grown under salinity stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62, 1368-1380.
- Mukherjee, S., Gangopadhyay, H., & Das, D. K. (2008). Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 609-17.
- Muñoz, F. F., Stoffel, M. M., Céccoli, G., Trod, B. S., Daurelio, L. D., Bouzo, C. A., & Guevara, M. G. (2021). Improving the foliar biofortification of broccoli with selenium without commercial quality losses. *Crop Science*, 1-11.
- NAS. (2000). Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. A report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. National Academy of Sciences.
- Nawaz, F., Naeem, M., Ashraf, M. Y., Tahir, M. N., Zulfiqar, B., Salahuddin, M., Shabbir, R. N. & Aslam, M. (2016). Selenium supplementation affects physiological and biochemical processes to improve fodder yield and quality of maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1438.
- Newman, R., Waterland, N., Moon, Y., & Tou, J. C. Selenium biofortification of agricultural crops and effects on plant nutrients and bioactive compounds important for human health and disease prevention: a review. (2019). *Plant Foods Human Nutrition*, 74, 449-460.
- Page, T., Griffiths, G., & Buchanan-Wollaston, V. (2001). Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiology*, 125, 718-727.
- Paliyath, G., Murr, D. P., Handa, A. K., & Lurie, S. (2009). Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers. John Wiley and Sons (Eds), 496 p.
- Perini, M. A., Sin, I. N., Jara, A. M. R., Gómez Lobato, M. E., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2017). Hot water treatments performed in the base of the broccoli stem reduce postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) heads stored at 20 °C. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 314-322.

- Pezzarossa, E., Rosellini, I., Borghesi, E., Tonutti, P., & Malorgio, F. (2014). Effects of Se-enrichment on yield, fruit composition and ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants grown in hydroponics. *Scientia Horticulturae*, 165, 106-110.
- Pezzarossa, B., Remorini, D., Gentile, M. L., & Massai, R. (2012). Effects of foliar and fruit addition of sodium selenate on selenium accumulation and fruit quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 781-786.
- Poggi, V., Arcioni, A., Filippini, P., & Pifferi, P. G. (2000). Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): effect of a ligand agent on selenium content of tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4749-4751.
- Pogson, B. J., & Morris, S. C. (1997). Consequences of cool storage of broccoli on physiological and biochemical changes and subsequent senescence at 20 °C. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 122, 553-558.
- Pogson, B. J., Downs, C. G., & Davies, K. M. (1995). Differential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes in broccoli after harvest. *Plant Physiology*, 108, 651-657.
- Pomares García, F., Bartual Pastor, R., Baixauli Soria, C., & Verdú Gallardo, M. J. (2007c). Producción integrada y ecológica de la coliflor y el brócoli. Fundación Ruralcaja Valencia. Mundi-Prensa (Eds.), p. 379.
- Puccinelli, M., Malorgio, F., & Pezzarossa, B. (2017). Selenium enrichment of horticultural crops. *Molecules*, 22, 933.
- Rao, S., Gou, Y., Yu, T., Cong, X., Gui, J., Zhu, Z., Zhang, W., Liao, Y., Ye, J., Cheng, S., & Xu, F. (2021). Effects of selenate on Se, flavonoid, and glucosinolate in broccoli florets by combined transcriptome and metabolome analyses. *Food Research International*, 14, 7:1371.
- Rayman, M. P. (2020). Selenium intake, status, and health: A complex relationship. *Hormones*, 19, 9-14.
- Rich, B. B., & Pokroy, B. (2018). A study on the wetting properties of broccoli leaf surfaces and their time dependent self-healing after mechanical damage. *Soft Matter*, 14, 7782-7792.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, 14, S185-S205.
- Rueda, D. (2001). *Botánica Sistemática*. Primera edición. Quito, Ecuador, 140 p.
- Rushing, J. W. (1990). Cytokinins affect respiration, ethylene production, and chlorophyll retention of packaged broccoli florets. *Horticulture Science*, 25, 88-90.

- SAGPyA (Secretaría de Agricultura G., Pesca y Alimentación de la Nación Argentina). (2004). Dirección de Producción Agrícola . Sistema de Apoyo Metodológico a los Laboratorios de Análisis de Suelos (SAMLA).
- Sakata (2011). Manejo de Brócoli. <http://www.sakata.com.mx/paginas/paquetes.htm>.
- Saltzman, A., Birol, E., Bouis, H. E., Boy, E., De Moura, F. F, Islam, Y., & Pfeiffer, W. H. (2013) Biofortification: progress toward a more nourishing future. *Global Food Security*, 2, 9-17.
- Sattar, T. (2021). Selenium role in reproduction, pregnant/postpartum women and neonates: A current study. *Current Nutrition and Food Science*, 17, 28-37.
- Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K., & Hortensteiner, S. (2009). Pheophytin Pheophorbide Hydrolase (Pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21, 767-785.
- Schiavon, M., Nardi, S., Dalla Vecchia, F., & Ertani, A. (2020). Selenium biofortification in the 21st century: status and challenges for healthy human nutrition. *Plant and Soil*, 453, 245-270.
- Schiavon, M., Berto, C., Malagoli, M., Trentin, A., Sambo, P., Dall'Acqua, S. & Pilon-Smits, E. A. H. (2016). Selenium biofortification in radish enhances nutritional quality via accumulation of Methyl-Selenocysteine and promotion of transcripts and metabolites related to glucosinolates, phenolics, and amino acids. *Frontiers in Plant Science*, 14, 7:1371.
- Segarra, G., Jáuregui, O., Casanova, E., & Trillas, I. (2006). Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry*, 67, 395-401.
- Serrano, M., Martinez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., & Valero, D. (2006). Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 61-68.
- Shahverdi, M. A., Omid, H., & Tabatabaei, S. J. (2017). Effect of nutripriming on germination indices and physiological characteristics of stevia seedling under salinity stress. *Journal of Seed Science*, 39, 353-362.
- Shahzad, Z., Rouached, H. & Rakha, A. (2014). Combating mineral malnutrition through iron and zinc biofortification of cereals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 329-346.

- Siddiqui, M. W., Singh, J. P., Nayyer, Md. Abu., Barman, K., Ahmad, M. S., & Kumar, V. (2015). 6-Benzylaminopurine affects lipid peroxidation and membrane permeability and thereby preserves curd quality and antioxidants during storage of cauliflower. *Acta Physiologiae Plantarum*. Springer Berlin Heidelberg, 37, 1-8.
- Sigrist, M., Brusa, L., Campagnoli, D., & Beldomenico, H. (2012). Determination of selenium in selected food samples from Argentina and estimation of their contribution to the Se dietary intake. *Food Chemistry*, 134, 1932-1937.
- Sindelarova, K., Szakova, J., Tremlova, J., Mestek, O., Praus, L., Kana, A., Najmanova, J., & Tlustos, P. (2015). The response of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation, and speciation. *Food Additives & Contaminants*, 32, 2027-2038.
- Singh, R., Upadhyay, A. K. & Singh, D. P. (2018). Regulation of oxidative stress and mineral nutrient status by selenium in arsenic treated crop plant *Oryza sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 105-113.
- Smolen, S., Skoczylas, L., Ledwozyw-Smolen, I., Rakoczy, R., Kopec, A., Piatkowska, E., Biezanowska-Kopec, R., Koronowicz, A. & Kapusta-Duch, J. (2016). Biofortification of carrot (*Daucus carota* L.) with iodine and selenium in a field experiment. *Frontiers in Plant Science*, 7, 730.
- Soil Survey Staff. (2010). Keys to soil taxonomy. 11th Edition, USDA-NRCS, Washington DC.
- Song, Y., Xiang, F., Zhang, G., Miao, Y., Miao, C., & Song, C. P. (2016). Absciscic acid as an internal integrator of multiple physiological processes modulates leaf senescence onset in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-16.
- Srivastava, M., Ma, L. Q., Rathinasabapathi, B. & Srivastava, P. (2009). Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresource Technology*, 100, 1115-1121.
- Stadlober, M., Sager, M., & Irgolic, K. J. (2001). Effects of selenate supplemented fertilisation on the selenium level of cereals identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry*, 73, 357-366.
- Stansell, Z., & Björkman, T. (2020). From landrace to modern hybrid broccoli: The genomic and morphological domestication syndrome within a diverse *B. oleracea* collection. *Horticulture research*, 7, 159-176.

- Starzyńska, A., Leja, M., & Mareczek, A. (2003). Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. *Plant Science*, 165, 1387-1395.
- Stoppani, M. I., Wolf, R., Francescangeli, N., & Marti, H. R. (2003). A non-destructive and rapid method for estimating leaf area of broccoli. *Advances in Horticultural Science*, 17, 173-175.
- Tan, D. K. Y. (1999). Effect of temperature and photoperiod on broccoli development, yield and quality in south-east Queensland. <http://ses.library.usyd.edu.au/handle/2123/639>.
- Teran, J. C., Gatti, M. A., Paez, C., Belavi, A., Amherd, H., Cardoso, G., Vigil, M., Bossio, M., & Scalise, P., (2013). Censo Hortícola 2012 del cinturón verde de Santa Fe. <https://inta.gob.ar/documentos/censo-horticola-2012-del-cinturon-verde-de-santa-fe>.
- Terry, N., Zayed, A., de Souza, M., & Tarun, A. (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 403-404.
- Tesfay, S. Z., Magwaza, L. S., Mbili, N., Mditshwa, A. (2017). Carboxyl methylcellulose (CMC) containing moringa plant extracts as new postharvest organic edible coating for Avocado (*Persea americana* Mill.) fruit, *Scientia Horticulturae*, 226, 201-207.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). [https://www.nsf.gov/news/news\\_summ.jsp?cntn\\_id=103071](https://www.nsf.gov/news/news_summ.jsp?cntn_id=103071).
- Thomas, H., & Donnison, I. (2000). Back from the brink: plant senescence and its reversibility. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 52, 149-62.
- Thompson, J. E., Froese, C. D., Madey, E., Smith, M. D., & Hong, Y. (1998). Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research*, 37, 119-141.
- Tian, M. S., Davies, L., Downs, C. G., Liu, X. F., & Lill, R. E. (1995). Effects of floret maturity, cytokinin and ethylene on broccoli yellowing after harvest. *Postharvest Biology & Technology*, 6, 29-40.
- Tian, M. S., Downs, C. G., Lill, R. E., & King, G. A. (1994). A role for ethylene in the yellowing of broccoli. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 119, 276-281.
- Trivellini, A., Cocetta, G., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., & Ferrante, A. (2015). Effect of cytokinins on delaying petunia flower senescence: a transcriptome study approach. *Plant Molecular Biology*, 87, 169-180.



- Trod, B. S., Buttarelli, M. S., Stoffel, M. M., Céccoli, G., Olivella, L., Barengo, P. B., Llugany, M., Guevara, M. G., Munoz, F. F., & Daurelio, L. D. (2023). Postharvest comercial quality improvement of broccoli (*Brassica oleracea* L.) after foliar biofortification with selenium. *Crop Science*, 1-17.
- Ul Hassan, Z., Gill, R. A., Huang, H., Ali, S., Mwamba, T. M., Ali, B., Huang, Q., Hamid, Y., Khan, A. R., Wang, J., & Zhou, W. (2019). Selenium mitigates the chromium toxicity in *Brassica napus* L. by ameliorating nutrients uptake, amino acids metabolism and antioxidant defense system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 145, 142-152.
- USDA (Departamento de Agricultura de EE. UU.). <https://fdc.nal.usda.gov/fdcapp.html#/food-details/170379/nutrients>.
- Watkins, C. B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, 24, 389-409.
- Wei, Y., Liu, Z., Su, Y., Liu, D., & Ye, X. (2011). Effect of salicylic acid treatment on postharvest quality, antioxidant activities, and free polyamines of asparagus. *Journal of Food Science*, 76, 126-132.
- Welbaum, G. E. (2015). Family Brassicaceae. In *Vegetable production and practices*. Ed. Gregory E. Welbaum, CAB International, Walling forth, Oxfordshire, UK, 486 pp.
- Welch R. M. (2002). Breeding strategies for biofortified staple plant food to reduce micronutrient malnutrition globally. *The Journal of Nutrition*, 132, 495-499.
- White, P. J. (2016). Selenium accumulation by plants. *Annals of Botany*, 117, 217-235.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Science*, 10, 586-593.
- Wiesner-Reinhold, M., Schreiner, M., Baldermann, S., Schwarz, D., Hanschen, F. S., Kipp, A. P., Rowan, D. D., Bentley-Hewitt, K. L., & McKenzie, M. J. (2017). Mechanisms of selenium enrichment and measurement in Brassicaceous vegetables, and their application to human health. *Front Plant Science*, 8, 1365.
- Willers, C., Jansen, P. J., Rensburg, V., & Claassens, S. (2015). Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities a review of interpretations and recent applications. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 1207-1218.
- Winkler, S., Faragher, J., Franz, P., Imsic, M., & Jones, R. (2007). Glucoraphanin and flavonoid levels remain stable during simulated transport and marketing of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 89-94.

- Wu, G. L., & Tian, J. B. (2009). Progress of fruit plants in selenium enriched research in China. *Acta Horticulturae*, 841, 599-602.
- Wu, Z., Bañuelos, G. S., Lin, Z.Q., Liu, Y., Yuan, L., Yin, X., Li, M. (2015). Biofortification and phytoremediation of selenium in China. *Frontiers in Plant Science*, 6, 136.
- Wu, Z., Yin, X., Gary, B. S., Lin, Z., Liu, Y., Li, M. & Yuan, L. (2016). Indications of selenium protection against cadmium and lead toxicity in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7, 1875.
- Ximénez-Embún, P., Alonso, I., Madrid-Albarrán, Y., & Cámara, C. (2004). Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, Indian mustard, and sunflower plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 832-838.
- Yamanoshita, O., Ichihara, S., Hama, H., Ichihara, G., Chiba, M., Kamijima, M., Takeda, I., & Nakajima, T. (2007). Chemopreventive effect of selenium-enriched Japanese radish sprout against breast cancer induced by 7,12-dimethylbenz[a] anthracene in rats. *Tohoku Journal Experimental Medicine*. 212, 191-198.
- Yamauchi, N., Harada, K., & Watada, A. E. (1997). In vitro chlorophyll degradation in stored broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plen.) florets. *Postharvest Biology and Technology*, 12, 239-245.
- Yang, H. Y., Chu, F. H., Wang, Y. T., Chen, Y. T., Yang, H. F., & Shaw, J. F. (2003). Novel broccoli 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene (Bo-AC03) associated with the late stage of postharvest floret senescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2569-2575.
- Yassen, A. A., Adam, S. M., & Zaghloul, S. M. (2011). Impact of nitrogen fertilizer and foliar spray of selenium on growth, yield and chemical constituents of potato plants. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 1296-1303.
- Yin, H., Qi, Z., Li, M., Ahammed, G. J., Chu, X., & Zhou, J. (2019). Selenium forms and methods of application differentially modulate plant growth, photosynthesis, stress tolerance, selenium content and speciation in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 911-917.
- Yuan, G., Sun, B., Yuan, J., & Wang, Q. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality, antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets. *Food Chemistry*, 118, 774-781

- Zaicovski, C. B., Zimmerman, T., Nora, L., Roos Nora, F., Silva, J. A., & Rombaldi, C. V. (2008). Water stress increases cytokinin biosynthesis and delays postharvest yellowing of broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 436-439.
- Zeiger, E. & Taiz, L. 2004. Growth and development. *Plant Physiology*. Segunda edición. Editorial Sinauer, 661 p.
- Zheng, X., Giuliano, G. & Al-Babili, S. (2020). Carotenoid biofortification in crop plants: citius, altius, fortius. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11):158664.
- Zhuang, H., Hildebrand, D. F., & Barth, M. M. (1997). Temperature influenced lipid peroxidation and deterioration in broccoli buds during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 49-58.
- Zhuang, H., Hildebrand, D., & Barth, M. (1995). Senescence of broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2585-2591.
- Zhuang, H., Berth, M. M., & Hildebrand, D. F. (1994). Packaging influenced total chlorophyll, soluble protein, fatty acid composition and lipoxygenase activity in Broccoli florets. *Journal Food Science*, 59, 1171-1174.