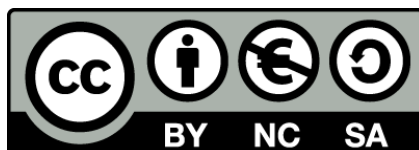




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulació hormonal i redox de processos de senescència d'òrgans

Javier Alberto Miret Barrio



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License**.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Barcelona, Abril de 2017

Regulació hormonal i redox de processos de senescència d'òrgans

Memòria presentada per Javier Alberto Miret Barrio per optar al grau de Doctor
per la Universitat de Barcelona.

Aquest treball s'emmarca dins el programa de doctorat de BIOLOGIA VEGETAL
del Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals (BEECA)
de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

El present treball ha estat realitzat al Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia
i Ciències Ambientals (BEECA) de la Facultat de Biologia de la Universitat de
Barcelona sota la direcció del Dr. Sergi Munné Bosch.

Doctorand

Director i Tutor de la Tesi:

Javier A Miret Barrio

Dr. Sergi Munné Bosch

AGRAÏMENTS



AGRAÏMENTS

Welcome to the most read thing I gonna ever write. Sorry to disappoint you, just randomly written random thoughts, written here and there between spins in lab and life. Trataré de ser formally informal en estilo i (*sic*) forma; mezclando es ca & en; y pt & it básicos (ISO 639-1). Como en mi cabeza. Hola! You're welcome! 🙌

Llarg és el camí... ja fa molts anys un petit vailet innocent i molt curiós encetà un tortuós viarany que el portà fins a aquest dia en que per fi pot dir **ed**!

Moltes gràcies al Dr. Sergi Munné Bosch per donar-me l'oportunitat d'endinsar-me en el món de la recerca, la docència i l'acadèmia. I especialment per confiar en mi, donant-me moltes llibertats però també responsabilitats. Amb tu em quedo sempre amb la sensació que no he espremut prou l'oportunitat d'aprendre de tu! Però és una sensació que tinc amb tota la gent interessant amb la que he interaccionat en aquest mundillo.

Gràcies a les super-seces del departament! Esther Carbó (oh! gran Esther plena d'empatia, comprensió, i saviesa administrativa i logística), Marga, Mònica, Maria del Mar. Y Carmen Cañueto! Super Carmen que todo lo tiene, todo lo encuentra y todo lo sabe, aunque a veces le cueste recordar...

Gràcies al personal de Camps Experimentals: Ricardo, Josep, Xavi, Claudia i Helena. Per mantenir les plantes felices, però també ben cabrejades quan toca. Només el Josep i la Claudia saben ho divertit que és podar i abraçar *Rubus* per portar-los al *spa*.

Moltes gràcies als tècnics del Servei de Cromatografia dels SCT: Esther Miralles, Eva, Pili, Isidre. Especialment pel recurs de primera instància a... "Esther!!! No va". En els pocs casos en què aquest poderós conjur no aconseguís atemorir els HPLC i detectors a comportar-se sempre he pogut apel·lar al gran mestre de l'art de la paciència, l'Isidre Casals. *Learning by doing* en diuen... Ja!

Gràcies als diversos Ministerios del Gobierno de España que han finançat la meva beca doctoral FPU, el trasllat temporal FPU a Cardiff i l'acció integrada a Nova Zelanda. Aquests recursos han fet que tota aquesta història investigadora, docent i personal fos possible.

Moltes gràcies a la Fundació Pizarroso i Pizarroso que finançà generosament els anys de llicenciatura... permetent que em pogués dedicar als estudis i la ciència, i encetar aquesta aventura amb un mínim matalàs per si les beques doctorals no arribaven mai.

Let me have a little *cri de coeur*... A totes les unitats i entitats amb les què he hagut d'interaccionar directament per la meva feina i formació doctoral (i moltes moltes moltes més només a través de les meravelloses meravelloses meravelloses secretàries del departament). Programa de Doctorat de Biologia Vegetal, Comissió Acadèmica, Comissió de Seguiment, Unitat de Fisiologia Vegetal, Secció de Fisiologia Vegetal, Departament de Biologia Vegetal, Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals (BEECA), Secretaria d'Estudiants i Docència, Oficina de gestió departamental, Guasos, Comissió de Doctorat, Oficina d'Afers Generals, Punt d'Informació i Unitat Tècnica, Oficina d'Afers Generals de l'Administració de Centre de Biologia i de Geologia, Facultat de Biologia, Personal Acadèmic, Nòmines, Unitat de Beques i Ajuts a l'Estudiant, Beques de Tercer Cicle, Escola de Doctorat, Vicerector de Recerca, Innovació i Transferència, Institut de Ciències de l'Educació (ICE), Àrea de Tecnologies de la Informació i la Comunicació, Oficina de Seguretat, Salut i Medi Ambient (OSSMA), Centres Científics i Tecnològics (CCiTUB), Camps Experimentals, CRAI - Centre de Recursos per a l'Aprenentatge i la Investigació, Fundació Bosch i Gimpera, Universitat de Barcelona, AGAUR, Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Secretaria de Estado de Educación, Formación Profesional y Universidades, Secretaria de Estado de Educación, Formación Profesional y Universidades, Dirección General de Política Universitaria, Subdirección de Formación y Movilidad del Profesorado Universitario e Innovación Docente, Registro de la Administración General del Estado, Correos, FedEx, DHL i múltiples proveïdors, comercials (visitadors, per email i per telèfon) i transportistes assidus i ocasionals. Tots ells junts m'han ensenyat molt sobre com treballar i interpretar sistemes complexos i heterogenis. I encara que no n'hi hagi cap formació formal t'obliguen a desenvolupar ràpidament l'excel·lència en moltes *soft skills*, que són essencials per sobreviure (i viure) al món professional i acadèmic. I paciència, molta paciència. Cal dir que per estar formant-me i pagant-me per guanyar-me la vida qüestionant les coses i formant-me—a mi i a d'altres—m'han donat molts incentius per generar una gran capacitat d'atonar el sentit comú i l'esperit crític a demanda; per llegir i escriure *legalese* bàsic; i copy-pastejar a destajo. Cinisme però també creure en les persones que et trobes. Com mola quedar a vegades atrapat entre els engranatges d'aquesta bèstia: no saps si seràs un *bug* o lubricant.

To test the wit of potential employers and colleagues... let me recall some great memories of two Commonwealth research stays and two great countries.

In 2012 I went down-under to Aotearoa, straight to Massey University in Palmerston North (New Zealand). To learn to generate protoplasts that some days exploded like popcorn, and deal with RNA-seq data. Thanks a lot to Dr. Paul P Dijkwel for showing me another point of view about senescence, and for the so great work we've done writing together across time zones. I've learned a lot. Jay Jayaraman (oh Jay!), up and down the Tongariro, striping and digesting and growing and harvesting... round the clock next to the laminar flow hood. And laughing and experimenting in and out the lab. Thanks! Afsana, Matt, Rubina, Alvina, Jibrán, Dutch girls, Susanna, Dr McManus and people whose name I've forgotten. Thanks!

Way later, in 2016, I spent a half year in Cardiff (Wales, never GB always UK) learning to deal with unbehaving lilies and their RNA. Thanks a lot to Dr. Hilary J Rogers for insightful discussions about flowers, and advice on the path from ugly sample to quantifiable cDNA. Enriching my flower's knowledge with flower people from Cardiff Uni and Royal Holloway. But also learning what's really civilization. The train network and National Cycle Network helped to maintain my sanity exploring the country and specially the really amazing countryside up the Valleys, to the world class Welsh coast and the British countryside. And with awesome cheese, cider and ale! Wales and Great Britain have great community-based ideas spreading from grassroots to actual changes to the landscape, sustained on volunteers like the National Trust, the NCN, the canals system, free volunteer guides in many towns... That's amazing and precious! But it should be said that, other than a great gothic cathedral per county, the culmination of the United Kingdom culture might be the arts and crafts movement or the few remaining Norman constructions (Just testing the wit of potential employers!). Carmen, Richard, Swapna, Simone, Basma, Spanish Carmen, Julie, Barend, Carsten, Julia and Lyndon. Dr. Tony Stead and the flower people working at Royal Holloway

near London. Thanks a lot to all of you for the chance of learning together and from each other. And make me realize it is never stupid to keep complaining about the weather.

I sincerely apologize to the authors of so many relevant studies that I have enjoyed reading but could not be cited here or in all published ms due to space limitations and deforestation concerns.

Moltes gràcies a tots els que han format part del grup Munné's. Han sentat les bases per poder fer tant, amb els que he pogut aprendre tant i tant, i he rigut tantíssim dins i fora del lab: Iker, Jana, Maren, Marta Oñate, Marta Pintó, Laia, Tana, Amparo, Mel, Marteta, Laura, Cubri, Bárbara, Eva, Alba, Erola, Paula, Dani, Elisa, Leilane...aquesta història existeix només amb tots vosaltres. Gràcies!

Gràcies al departa *at large* amb la seva població flotant de gent que ve i va, ja sigui per compartir uns pocs mesos o uns molts anys. Per riure i aprendre de tots vosaltres. Sento no dedicar-vos un comentari especial a cadascú, perquè tots el mereixeu.

A Laura. Qui diria que acabaria aquesta aventura compartint la vida amb tantes bitxes peludes que em treuen el lloc al sofà i al llit. Seguim vivint i compartint la vida junts.

A Blanca, mi madre. No conozco una palabra mejor que gracias. Por todo. Por criarme, educarme, aguantarme, y enseñarme a pensar.

A mi madre por todo y por siempre

A Laura

Y a mis bichejas peludas

ÍNDIX

Introducció	1
1. Senescència d'òrgans	1
Senescència foliar	3
Senescència floral	4
Maduració de fruits	5
2. Regulació hormonal	6
Àcid abscísic (ABA)	8
Melatonina (MT).....	12
3. Regulació redox	15
4. Regulació dels nivells de vitamines antioxidants	18
Vitamina C – ascorbat.....	20
Vitamina E – tocoferols, tocotrienols i compostos afins	26
5. Models d'estudi.....	32
<i>Brassica oleracea</i> L. cv capitata	32
<i>Iris</i> × <i>hollandica</i> i <i>Lilium</i>	33
<i>Rubus idaeus</i> L. cv. Heritage	36
Objectius.....	39
Informe del director de la tesi sobre l'impacte dels articles publicats i la participació del doctorand.....	43
Resultats	49
Capítol 1: L'aplicació d'un mètode ràpid i sensible per l'anàlisi de perfils hormonals i de vitamina E revela mecanismes crucials de regulació de senescència floral i maduració de fruits.....	51
Capítol 2: L'àcid abscísic i la pirabactina milloren el contingut de vitamina C en gerds.....	73
Capítol 3: La manipulació de la senyalització d'ABA suprimeix la senescència d'una hortalissa verda emmagatzemada a temperatura ambient.....	95
Discussió general.....	141
1. Senescència post-collita de fulla i flor	144

2. Maduració de fruits	150
3. Metodologia: avantatges i dificultats de plantes no model i diferents aproximacions analítiques.....	156
Conclusions	165
Bibliografia.....	169
Apèndix 1. Regulació de la senescència floral de <i>Lilium</i> per melatonina	199

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. *Senescència d'òrgans*

La senescència d'òrgans és la darrera fase del desenvolupament, un procés normalment associat a l'edat, complex i estrictament regulat que resulta en la degradació coordinada de macromolècules i la subseqüent mobilització de components a altres parts de la planta comportant el final de la seva vida. Mai és un senzill procés de degradació, sinó que representa una fase clau del desenvolupament tant en plantes com en animals i és tan important pel *fitness* de l'organisme sencer com ho són el creixement i la maduració dels òrgans. La combinació de senyals interns i externs regula la inducció i progressió de la senescència (Buchanan-Wollaston, 1997; Lim et al., 2007).

Tots aquests processos de senescència d'òrgans són vitals tant pel *fitness* de la planta sencera com per la producció en cultius (Nelson, 1988; Kikuzawa & Lechowicz, 2011). La senescència d'òrgans ha evolucionat com un procés de reciclatge en què els nutrients remobilitzats són destinats a la producció de nous teixits fotosintètics, òrgans reproductius o maduració de fruits (Thomas & Howarth, 2000; Lim et al., 2007; Kikuzawa & Lechowicz, 2011). La senescència d'òrgans també té un paper important en la resposta a estressos abiòtics i biòtics. La resposta de la planta a estressos pot incloure la inducció de senescència foliar, adoptant estratègies tant d'adaptació, per la remobilització de nutrients a parts joves de la planta; com d'evitació, per la limitació de la pèrdua d'aigua per transpiració amb l'abscisió de la fulla o per limitar l'exposició a patògens tot eliminant les fulles afectades (Munné-Bosch & Alegre, 2004; Wingler & Roitsch, 2008; Guo & Gan, 2012; Blum, 2016).

Al seu torn, els òrgans senescents són especialment susceptibles a estressos biòtics i abiòtics (Lim et al., 2007; van Doorn & Woltering, 2008; Seymour et al., 2013b). A partir del moment en què un producte fresc és separat de la planta—ja sigui un vegetal de fulla verda, una flor tallada o un fruit madur—, està exposat a

múltiples estressos durant tota la post-collita que són la causa d'importants pèrdues en quantitat i qualitat del producte, tant en el producte hortícola com en el mercat de la flor. Estressos abiòtics com la deshidratació o l'exposició a calor i fred causen pèrdua d'integritat de les membranes, canvis de textura, dany a les superfícies, pèrdua d'antioxidants, aromes i sabors (Lee & Kader, 2000; Thompson et al., 2002; Kader, 2005; van Doorn & Han, 2011; Ansari & Tuteja, 2015). A més, en ser sotmesos a aquests estressos els productes són més susceptibles als atacs dels patògens i conseqüents estressos biòtics (Lee & Kader, 2000; Kader, 2005). Sent els fruits i vegetals les principals fonts de vitamines i antioxidants a la dieta humana (Fitzpatrick et al., 2012), no només preocupa la longevitat i l'aspecte del producte fresc, sinó també el seu valor nutricional. La reducció de les pèrdues post-collita és una important eina per maximitzar el valor de la producció actual, sense augmentar els impactes negatius per la societat i l'ambient de l'augment de la producció en origen. La intensificació i/o extensió d'un cultiu té amples conseqüències: consum d'aigua i fertilitzants, pèrdua de biodiversitat, canvis en l'ús del sòl, però també l'energia invertida en tota la cadena logística i l'emmagatzematge (Tilman et al., 2002; Evenson & Gollin, 2003). Entendre la fisiologia que determina i regula la senescència post-collita és clau per minimitzar aquestes pèrdues i el seu impacte.

La senescència foliar, la senescència floral i la maduració de fruits carnosos i fruits dehiscentes comparteixen característiques comunes a nivell fisiològic i bioquímic. Tots aquests processos presenten: degradació i estovament de parets cel·lulars, desmantellament de l'aparell fotosintètic, degradació de midó i clorofil·les, estimulació de la respiració, i en moltes espècies pic d'etilè i respiratori. A més, comparteixen molts mecanismes de regulació redox i hormonal que regeixen la inducció i progressió de la senescència i dels diferents processos implicats (Zimmermann & Zentgraf, 2005; Lim et al., 2007; Rogers, 2013; Seymour et al., 2013b; Gómez et al., 2014). Després de tot, aquests òrgans reproductors (pètals i fruits/carpels) en origen no són més que fulles molt modificades (Thomas et al., 2003; Kikuzawa & Lechowicz, 2011). Alguns autors

van un pas més enllà, i associen l'ontogènia del pas de cloroplasts a cromoplasts a flors i fruits madurs amb el pas de cloroplasts a gerontoplasts de la senescència foliar (Thomas et al., 2003). I per tant el pètal madur o el fruit madur amb la fulla senescent, com un procés de neotènia, en el què l'evolució ha afavorit l'aparició de nous òrgans amb funcions especialitzades desplaçant en la història vital de l'òrgan aquesta transdiferenciació pròpia de la senescència foliar. D'aquesta manera s'identifica la senescència d'òrgans com un procés més de diferenciació cel·lular, separat de la mort cel·lular programada (van Doorn & Woltering, 2008; Woltering & van Doorn, 2009). Els temps, la plasticitat d'aquests diferents processos i la seva possible regulació per factors externs són condicionats per la diferent funció vital dels òrgans. Mentre les fulles són l'òrgan productor d'energia i assimilador de les plantes; la flor té com a única funció divulgar el seu potencial reproductor i, un cop la pol·linització té lloc, la majoria d'òrgans florals entren ràpidament en senescència mentre que el carpel esdevé fruit que té com a funció suportar el desenvolupament de la llavor i promoure la seva propagació.

Senescència foliar

La fulla—com el centre energètic i assimilador d'un organisme autòtrof—és l'òrgan vegetal més estudiat, també en el cas de la senescència. Usualment es defineixen 3 fases durant la vida de la fulla. (i) Una primera fase de desenvolupament i creixement en què la fulla jove importa carboni i altres nutrients, amb una ràpida síntesi de proteïnes i altres macromolècules fins a assolir la màxima capacitat fotosintètica. (ii) Quan la fulla esdevé madura, es converteix en una font de carboni per la planta, durant la qual la taxa de renovació de proteïnes i altres compostos es manté majoritàriament a nivells baixos, i la senescència pot ser promoguda per factors ambientals. (iii) Aquest estat es manté fins que condicions internes promouen la inducció de la senescència independentment de l'ambient. En qualsevol cas, la senescència promourà la remobilització de nutrients cap a noves fulles, òrgans de reserva o reproductors (Buchanan-Wollaston, 1997; Lim et al., 2007).

Els canvis característics de la senescència foliar també es donen en altres òrgans: canvi en la relació font–embornal (*source–sink*) amb remobilització de nutrients i pèrdua d'organització sota estricta regulació hormonal, redox, i control genètic que condueix a la mort cel·lular programada. Tot i les diferències puntuals per la funció, *life history traits* i microambients propis de cada òrgan, el procés de senescència i la seva regulació presenta moltes similituds entre els diferents òrgans vegetals. Aquestes fases, i en gran part la seva regulació hormonal, redox i genètica, pot ser compartida per òrgans florals com pètals i tèpals (Thomas et al., 2003; Rogers, 2013; Rogers & Munné-Bosch, 2016). L'extensió d'aquesta homologia a la maduració de fruits dehiscent i carnosos és discutida activament per la literatura recent (Seymour et al., 2013b; Gómez et al., 2014).

Senescència floral

Encara que la senescència floral comparteixi el seu origen evolutiu amb el model de senescència d'òrgans més estudiat—la senescència foliar—la seva diferent funció comporta importants diferències. Cada òrgan floral (sèpals, pètals/tèpals, anteres, carpels) té una funció biològica diferent i evoluciona i respon de forma diferent als esdeveniments que determinen la vida de la flor. Els pètals o tèpals són l'òrgan més estudiat com a factor limitant del valor comercial de la flor, i en moltes publicacions la senescència floral és reduïda a la senescència dels pètals (Arron, 2012). Les fulles són autòtrofes i, en conseqüència, presenten els cloroplasts com a un dels principals generadors de ROS durant tota la seva vida incloent la senescència. En canvi, els pètals (o tèpals) són majoritàriament fotosintètics durant el seu desenvolupament, però normalment perden aquesta capacitat amb la maduresa. Mentre que a partir de la maduresa les fulles són sempre una font de nutrients per remobilitzar, els pètals canvien d'embornal a font de remobilització de nutrients amb la senescència (Rogers, 2012), un factor clau en la longevitat i senescència dels pètals (Thomas et al., 2003). A més, el patró de senescència floral i la longevitat floral són específics de cada espècie i estan estrictament lligats a la seva funció biològica. A causa del fet que cada òrgan floral

té diferent funció, aquests presenten diferents patrons de senescència i estan sotmesos a diferent regulació (van Doorn & Woltering, 2008; Arrom & Munné-Bosch, 2010; Arrom & Munné-Bosch, 2012a) En el cas dels pètals el seu desenvolupament, maduresa, senescència i abscisió estan estrictament lligats al desenvolupament dels altres òrgans florals i en la majoria d'espècies a la pol·linització (Stead & van Doorn, 1994; van Doorn & Woltering, 2008; Rogers & Munné-Bosch, 2016).

Maduració de fruits

Els trets associats a la maduració de fruits carnosos són: (i) canvi del color a causa de canvis dels nivells de clorofil·la, carotenoides i/o polifenols; (ii) canvis en la textura del fruit deguts a canvis de turgència i l'estructura de la paret; (iii) importació, acumulació i modificació de sucres, àcids orgànics i compostos volàtils; però tots aquests canvis també comporten (iv) major sensibilitat a patògens oportunistes i herbívors (Adams-Phillips et al., 2004; Symons et al., 2012; Seymour et al., 2013a; Seymour et al., 2013b). Tots ells han estat seleccionats evolutivament per atreure dispersors dels fruits. I també han estat seleccionats pels programes de millora perquè són característiques que donen valor al fruit per al consumidor. Com característiques organolèptiques (aspecte, aroma, sabor, textura) i nutricionals, que comporten demanda i valor econòmic. Així, la maduració de fruits no és un procés de senescència d'òrgans *sensu stricto*, però comparteix moltes característiques a nivell fisiològic i bioquímic, inclosa la regulació hormonal i redox. L'acumulació de sucres i productes d'emmagatzematge és una diferència important respecte les formes de senescència d'òrgans presentades abans. Considerant l'important paper regulador dels sucres i la seva interacció amb hormones i senyals redox durant la senescència de fulles i pètals, la no exportació dels sucres degradats i altres compostos ha de comportar diferències en la sensibilitat a aquests i el seu paper regulador (Seymour et al., 2013b; Gómez et al., 2014).

2. Regulació hormonal

Les fitohormones són un conjunt estructuralment divers de metabòlits naturals amb activitat reguladora i/o senyalitzadora a nivell autocrí, paracrí i/o endocrí usualment presents a nivells micro- o nanomolars (Schippers et al., 2007). Els nivells de cada hormona i la sensibilitat a la seva percepció determinen la seva acció i poden ser regulats per síntesi, conjugació, degradació, transport inter- i intracel·lular de les mateixes hormones i els elements amb els quals interaccionen (Schippers et al., 2007; Piotrowska & Bajguz, 2011; Ben-Ari, 2012; Boursiac et al., 2013; Sun et al., 2016). Les hormones desencadenen cascades senyalitzadores complexes, amb intensa i extensiva interacció (*cross-talk*) amb senyals del desenvolupament, el metabolisme (e.g., disponibilitat de sucres i microelements) i senyals redox (i.e., estrès i dany redox), tot regulant el desenvolupament i les respostes a estressos (Lim et al., 2007; Schippers et al., 2007; Wingler & Roitsch, 2008; Guo & Gan, 2012; Jibrán et al., 2013; Kohli et al., 2013). Així, canvis en el perfil hormonal poden ser una de les primeres respostes davant un estrès o pertorbació, actuant com a senyal que condueixi a respostes d'evitació o tolerància integrades, incloent-hi parts de la planta allunyades d'aquests. La resposta de la planta dependrà del context de l'òrgan, teixit o cèl·lula; i del seu estat fisiològic (Mittler & Blumwald, 2015; Sun et al., 2016). Les hormones regulen la inducció i progressió de la senescència. El desenvolupament i les respostes a senyals ambientals són processos que modulen la senescència, i també són regulats per les mateixes hormones. Per tant, és difícil identificar si una hormona actua específicament sobre la senescència, o l'afecten indirectament alterant el programa de desenvolupament o la resposta a senyals ambientals (Jibrán et al., 2013; Kohli et al., 2013).

Respecte a la senescència foliar, els grups d'hormones s'han classificat tradicionalment a grans trets com a “inhibidores” (citocinines, auxines, gibberel·lines, poliamines); o “promotores” de la inducció i/o progressió de la senescència (etilè, ABA, jasmonats, àcid salicílic, brassinoesteroïdes) (Schippers et

al., 2007). Si apliquem aquesta classificació tant a la senescència floral com a la maduració de fruits carnosos, trobem que tots els grups d'hormones mantenen l'etiqueta d'inhibidors o promotors (van Doorn & Woltering, 2008; van Doorn & Han, 2011; McAtee et al., 2013; Kumar et al., 2014). Generalment, aquesta classificació clàssica té un gran valor didàctic, però la realitat és més complexa i diversa (Schippers et al., 2007; Jibrán et al., 2013).

Alguns autors també observen una altra característica comuna de la regulació—especialment hormonal però també per altres elements reguladors—en tant que la senescència d'òrgans requereix primer canvis en el desenvolupament (*age-related changes*) —causa necessària però no suficient—, i només després pot ser induïda per estímuls hormonals i ambientals (Jing et al., 2005; Wagstaff et al., 2005; Jibrán et al., 2013; Kumar et al., 2014). Així, generalment la fulla ha d'assolir un cert punt del desenvolupament abans de ser sensible a estímuls externs o interns que indueixin la senescència, l'ovari ha de ser pol·linitzat perquè el pètal entri en senescència, i el fruit ha de créixer i desenvolupar-se abans de poder iniciar la maduració. En fruits climatèrics i flors sensibles a l'etilè—i en senescència foliar—la senescència s'inicia per un pic de producció i percepció d'etilè que comporta un augment de la taxa respiratòria. D'aquesta manera, l'aplicació d'etilè promou la senescència de fulles, flors i fruits de moltes espècies; i el bloqueig de la seva síntesi o percepció inhibeix la promoció de la senescència (Aharoni, 1989; John et al., 1995; Srivastava & Handa, 2005; Wagstaff et al., 2005; Schippers et al., 2007). Però moltes espècies o varietats presenten flors insensibles a l'etilè i fruits no climatèrics, en els que l'etilè no té aquest rol com a regulador clau. Encara que pot participar en alguns processos com l'abscisió en flors insensibles a l'etilè, o en el cas dels fruits no climatèrics però sensibles a l'etilè, on pot participar en la formació de característiques del fruit madur com l'acumulació de pigments o l'estovament del fruit (Aharoni, 1989; Chervin et al., 2004; Symons et al., 2012). Sense l'etilè com a inductor necessari de la senescència o maduració, altres hormones, com l'ABA, poden prendre aquest rol.

Àcid abscísic (ABA)

L'ABA va ser inicialment i simultàniament descrit als anys 1960 com a substància promotora de l'abscisió en gemmes de cotó ("*abscissin II*") (Ohkuma et al., 1963), i en flors i fruits de tramús groc ("*yellow lupin inhibitor*") (Rothwell & Wain, 1964); i com a promotora de la dormició induïda per fotoperíode en sicòmors ("*dormin*") (Cornforth et al., 1965). La recerca en l'ABA s'estengué ràpidament a mesura que es descobrí com no només regulava uns pocs processos de desenvolupament sinó que també era clau en la senyalització i resposta a molts estressos abiòtics i biòtics (Dörffling, 2015). Una idea de la magnitud dels recursos i esforços invertits avui en dia: 5000 publicacions fan referència a ABA i *Arabidopsis* en el període 2003-2013, representant un 8% de totes les publicacions en *Arabidopsis*. Un volum només comparable a la recerca en auxines (Finkelstein, 2013). Finkelstein (2013) recentment recopilà una llista extensiva i força exhaustiva de processos del creixement, desenvolupament i estressos ambientals en què intervé l'ABA en plantes: "maduració d'embrions, dormició de llavors, germinació, divisió cel·lular i elongació, inducció floral, (...) senescència foliar, senescència floral, maduració de fruits, rizogènesis, (...) i resposta a estressos ambientals com sequera, salinitat, fred, atac per patògens i radiació ultraviolada, (...) estrès tèrmic, estrès fotooxidatiu, hipòxia i metalls pesants". Així, l'ABA i el seu paper regulador és ubic en el desenvolupament i respostes a l'ambient de les plantes, però també té un paper regulador en alguns fongs fitopatògens, bacteris i animals—des d'esponges a humans (Nambara & Marion-Poll, 2005; Tossi et al., 2012). En particular, en mamífers està involucrat en la regulació de respostes inflamatòries i en la resposta a alguns estressos abiòtics, com l'exposició a UV (Nambara & Marion-Poll, 2005; Tossi et al., 2012).

Els nivells locals d'ABA són el resultat del balanç entre biosíntesi i inactivació per oxidació o conjugació, modificats per compartimentació i transport (Boursiac et al., 2013). L'ABA és un sesquiterpenoid provinent de la via del metileritritol 4-fosfat (MEP), amb geranilgeranil difosfat, fitoè, beta-carotè i zeaxantina com a

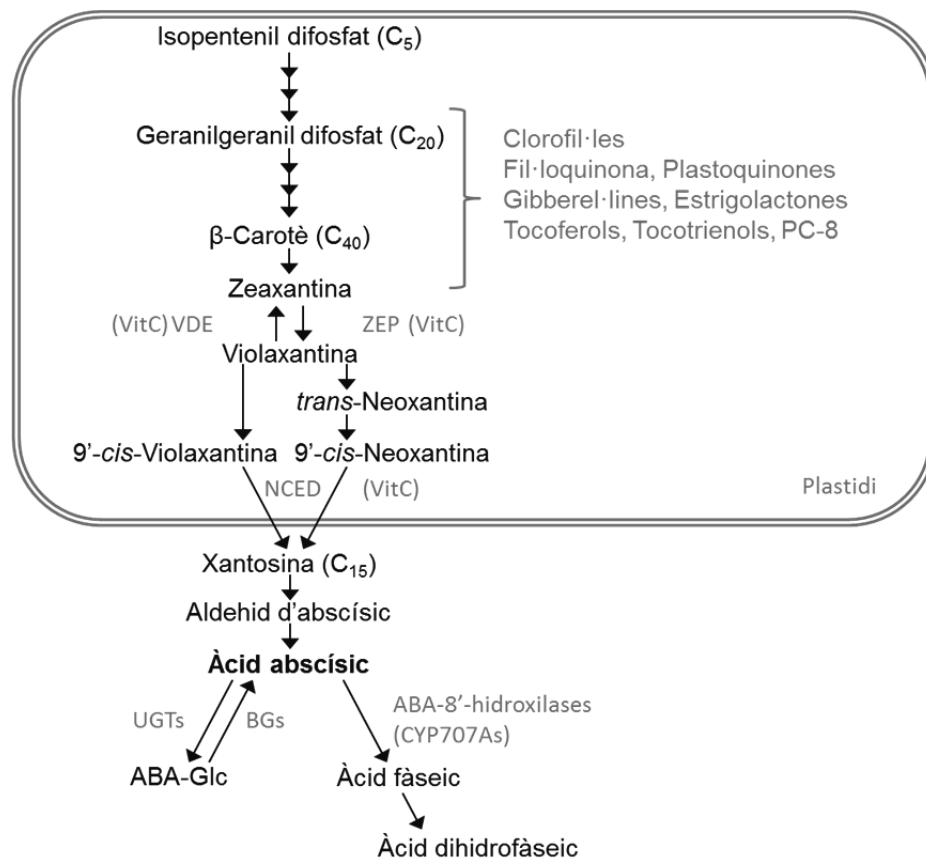


Fig. 1. Vies de biosíntesi, degradació i conjugació de l'ABA. Només els enzims que codifiquen els principals punts de regulació són representats, i s'indica si tenen l'ascorbat com a cofactor (VitC). A més VDE (violaxantina deepoxidasa) i ZEP (zeaxantina deepoxidasa) conformen el cicle de les xantofil·les, un dels principals mecanismes dissipadors d'excés d'energia als cloroplasts. L'ABA glucòsil ester (ABA-Glc) és sintetitzat per ABA-glucosil-transferases (UGTs), pot ser acumulat al vacúol i l'apoplast, i pot ser ràpidament hidrolitzat per acció de β-glucosidases (BG) a vacúols i reticle endoplasmàtic. En gris, alguns compostos amb precursors comuns, sent el β-carotè el principal provitàmer de la vitamina A. NCED, 9'-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa.

precursors claus (Fig. 1). Aquests diterpens i carotenoides, per si mateixos i com a precursors de molts altres compostos (Fig. 1), presenten funcions rellevants que també han de ser estrictament regulades i per tant el seu metabolisme està altament regulat. Per exemple, el *pool* de beta-carotè està estrictament regulat i només una petita porció és metabolitzada a zeaxantina (DellaPenna & Pogson, 2006; Giuliano et al., 2008). Així, per mitjà de la zeaxantina deepoxidasa (constituent del cicle de les xantofil·les), s'obté violaxantina. A partir d'aquesta, per una sèrie de reaccions ja exclusives, s'obté l'ABA. El principal punt de regulació de la seva biosíntesi es troba en la NCED (9'-cis-epoxicarotenoid dioxigenasa); transcripcionalment

sensible al desenvolupament, l'ambient i cicles diaris (Nambara & Marion-Poll, 2005; Ji et al., 2014).

L'ABA és un àcid feble ($pK_a=4.8$), i per tant, es troba majorment sense càrrega a l'ambient lleugerament acídic de l'apoplast, podent travessar fàcilment les membranes per entrar a la cèl·lula. Així, la distribució de l'ABA en la cèl·lula vegetal segueix el concepte de trampa aniònica (*anion trap*, que també s'aplica al transport polar d'auxines), on és redistribuït entre compartiments en funció de les diferències de pH i l'activitat de transportadors d'ABA, que varien en diferents condicions fisiològiques i són estrictament regulats (Boursiac et al., 2013; Park et al., 2016). A més, l'ABA pot ser conjugat a sucres com a forma d'emmagatzematge de ràpid alliberament o transport (López-Carbonell et al., 2009; Piotrowska & Bajguz, 2011); o metabolitzat per oxidació per ABA 8'-hidroxilases de la família CYP707A (Saito et al., 2004; Ji et al., 2014). El catabolisme juga un paper tan important en la regulació dels nivells d'ABA que—almenys en *Arabidopsis*—els mutants deficients en CYP707As acumulen més ABA que les línies sobreexpressores d'enzims de biosíntesi d'ABA (Finkelstein, 2013). Tant en processos de desenvolupament com en resposta a estressos els dos principals punts de regulació dels nivells d'ABA són el punt limitant de la seva síntesi (NCEDs) i les CYP707As responsables de la seva degradació; i el principal mecanisme de regulació d'aquestes és el transcripcional (Saito et al., 2004; Finkelstein, 2013). Al seu torn, canvis en els nivells d'ABA estan associats a grans canvis en els patrons d'expressió gènica, resultant en importants respostes d'adaptació fisiològiques i metabòliques. Més de 200 *loci* regulen les respostes per ABA i milers de gens són regulats per ABA en diversos contextos (Finkelstein, 2013).

Aquests efectes depenen de la concentració d'ABA i la sensibilitat a aquest. En la darrera dècada s'han produït importants descobriments que estan canviant el paradigma del rol de l'ABA, incloent-hi la descripció funcional de múltiples classes de receptors, transportadors, enzims de metabolització i moduladors i

efectors de la resposta a ABA (Ben-Ari, 2012; Boursiac et al., 2013; Park et al., 2015; Sun et al., 2016). És sabut que diversos estressos promouen l'acumulació d'ABA, en aquests casos s'ha identificat 1-10% del transcriptoma d'*Arabidopsis* com a responsiu a ABA (Finkelstein, 2013), però només uns pocs d'aquests són comuns a tots aquests estressos (Guo & Gan, 2012; Gläßer et al., 2014). A més la senyalització i les respostes per ABA presenten una elevada regulació post-transcripcional i post-traduccionals (Boursiac et al., 2013; Yu et al., 2016; Yang et al., 2017).

Tres classes de receptors d'ABA a plantes han estat proposats. GTPases amb homologia amb receptors acoblats a proteïnes G a la membrana plasmàtica, la subunitat H de la Mg^{2+} quelatasa (CHLH) als plastidis, i el conjunt de receptors solubles PYR/PYL/RCAR al citoplasma i nucli (Cutler et al., 2010; Wang & Zhang, 2014). Aquesta darrera família de receptors PYR/PYL/RCAR (resistent a pirabactina/PYR-like/component regulador del receptor d'ABA, per les seves sigles en anglès) i la senyalització que regulen va ser descrita només a partir del 2009 (Park et al., 2009). 14 membres (en *Arabidopsis*) s'uneixen a l'ABA amb diferents afinitats i interaccionen amb diferent PP2Cs i SnRK2s (fosfatasa de proteïnes 2C i quinases de proteïnes relacionades amb SNF1), que al seu torn actuen sobre nombrosos reguladors i efectors involucrats en la resposta a l'ABA (Cutler et al., 2010). Els dos primers possibles receptors acumulen resultats que són encara controvertits, encara que en cas de la CHLH hi ha evidència de com la seva interacció directa amb ABA promou la translocació de factors de transcripció citosòlics WRKY que transdueixen el senyal (Tsuzuki et al., 2011; Du et al., 2012). Molts mutants amb la resposta a ABA alterada presenten nivells d'ABA alterats, suggerint que el metabolisme d'ABA està sotmès a regulació per retroalimentació. Així, alguns gens que regulen el metabolisme de l'ABA estan regulats per ABA, a més de ser regulats per senyals ambientals, altres hormones, programes del desenvolupament i ritmes circadians (Seung et al., 2012).

Aquest sistema redundat i complex ha dificultat la identificació dels elements que intervenen en la seva senyalització per mètodes genètics clàssics. Aproximacions farmacològiques van servir per identificar el primer dels receptors PYR/PYL/RCAR i començar a desentrellar la xarxa principal de senyalització que desencadenen (Cutler et al., 2010). Així s'identificà simultàniament la família del receptor PYR i la pirabactina (*pyr*, *pyrabactin*), un agonista i antagonista parcial de l'ABA que per no ser fotosensible presenta un gran potencial agronòmic (Park et al., 2009; Park et al., 2015).

L'àcid abscísic està involucrat en diversos processos del desenvolupament i és clau en la resposta a estressos i la seva interacció. L'efecte de l'ABA en la senescència d'òrgans i la maduració de fruits va canviant durant la inducció i progressió de la senescència (Setha, 2012; Jibrán et al., 2013; Kumar et al., 2014). A més l'ABA és essencial per integrar senyals biòtics i abiòtics de l'ambient per regular la inducció i progressió de la senescència (Jibrán et al., 2013; Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2013).

Melatonina (MT)

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) és una molècula amb funcions de regulació fisiològica i cel·lular en diferents regnes de la vida. Primer va ser descrita la seva acció com a neurohormona en vertebrats als anys 50 (Lerner et al., 1958), i la literatura ha recollit la successiva descripció de nombroses funcions reguladores en animals: regulació del comportament, cicles circadians, fisiologia reproductora estacional, regulació immunològica (Reiter et al., 2010; Hardeland et al., 2012; Carrillo-Vico et al., 2013; Mauriz et al., 2013). Només l'any 1995 va ser descrita la seva presència en plantes (Dubbels et al., 1995; Hattori et al., 1995), sent les seves funcions a nivell fisiològic, cel·lular, metabòlic i molecular activament explorades als darrers anys (Arnao & Hernández-Ruiz, 2014; Arnao & Hernández-Ruiz, 2015; Reiter et al., 2015).

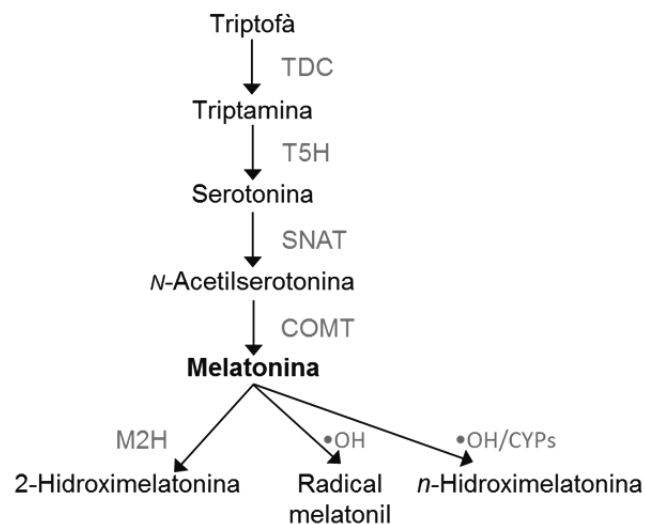


Fig. 2. Vies de síntesi i degradació de melatonina. La melatonina també pot reaccionar directament amb radicals hidroxil ($\bullet\text{OH}$) o amb citocroms P450 monooxigenases (CYPs, que inclou les M2H), presentant formes hidroxilades en diferents posicions, sent 2-hidroximelatonina la més rellevant en plantes, tot i que la rellevància d'aquestes vies de degradació en plantes ha estat poc estudiada. El radical melatonil oxidat per $\bullet\text{OH}$, pot ser oxidat al seu torn per radicals superòxid per generar AFMK. Un producte d'oxidació generat per diferents vies enzimàtiques i no enzimàtiques especialment rellevant en animals que també presenta funcions reguladores. TDC, triptofà decarboxilasa; T5H, triptofà 5-hidroxilasa; SNAT serotonina N-acetiltransferasa; COMT àcid cafèic O-metiltransferasa; M2H, melatonina 2-hidroxilasa.

La melatonina prové del metabolisme dels aminoàcids aromàtics amb el triptòfan com a precursor (Korasick et al., 2013). En plantes, la seva ruta biosintètica (Fig. 2) només ha estat recentment caracteritzada i confirmada bioquímicament—mitjançant expressió heteròloga de gens putatius i assajos enzimàtics—a *Oryza sativa* i parcialment a *Arabidopsis* (Kang et al., 2007; Fujiwara et al., 2010; Kang et al., 2011; Kang et al., 2013; Byeon & Back, 2015; Byeon et al., 2015). El primer pas, la transformació de triptòfan a triptamina, és catalitzat per una triptòfan decarboxilasa (TDC) (Kang et al., 2007), compartit per les rutes de síntesi d'àcid indolacètic, alcaloides indòlics, serotonina i melatonina. El següent pas és catalitzat per un citocrom P450 que transforma la triptamina a serotonina (T5H, triptòfan 5-hidroxilasa), per una nova ruta per la síntesi de serotonina i melatonina, independent de les descrites en animals i procariotes (Fujiwara et al., 2010). El pas de serotonina a N-acetilserotonina, catalitzat per una arilalquilamina N-transferasa, és el primer pas exclusiu de la síntesi de melatonina. Aquest és catalitzat per la SNAT (serotonina N-acetiltransferasa) (Kang et al.,

2011; Kang et al., 2013), i hi ha evidències de que representa el pas limitant en la transformació de serotonina en melatonina (Hardeland, 2015). La literatura tradicionalment recull la ASMT (*N*-acetilserotonina metiltransferasa) com el darrer enzim de la ruta de síntesi de melatonina, però recentment una ruta alternativa ha estat proposada (Byeon & Back, 2015; Hardeland, 2015). Les ASMT descrites en plantes presenten molt baixa activitat catalítica, les diferents isoformes identificades només s'expressen en uns pocs teixits (mentre la melatonina és força ubic, encara que a concentracions molt diverses) i la seva sobreexpressió només representa guanys marginals en el contingut de melatonina, inclús amb l'aplicació exògena d'elevades concentracions del precursor immediat (Byeon et al., 2015). Així, recentment es proposà un altre candidat. La COMT (àcid cafèic *O*-metiltransferasa), un gen multifuncional amb diferents fenilpropanoïdes com a substrat, capaç de catalitzar el pas de *N*-acetilserotonina a melatonina. La seva sobreexpressió causa l'acumulació de melatonina i és induïble per diferents estressos (Byeon et al., 2015). Finalment, la melatonina és degradada per la seva acció *scavenger* de radicals d'oxigen i nitrogen, i enzimàticament per mitjà de diverses 2-ODD (dioxigenases dependents de 2-oxoglutarat) amb activitat melatonina 2-hidroxilasa (M2H), recentment identificades a *Oryza sativa* (Byeon & Back, 2015).

La melatonina és un compost amfipàtic, i per tant, és capaç de travessar fàcilment membranes cel·lulars i entrar a diferents compartiments subcel·lulars (Shida et al., 1994). Així, a més de la síntesi *in vivo*, les plantes també poden absorbir melatonina exògena i acumular-la als seus òrgans. En funció de la concentració, el procés estudiat, l'espècie i el seu estat fisiològic, els efectes de melatonina aplicada exògenament varien des de no representar efectes, a augmentar la tolerància a l'estrès, fins a presentar toxicitat (Reiter et al., 2015). En plantes, la literatura acumula evidències de les seves funcions en la percepció i/o resposta a estressos abiòtics, com a promotor del desenvolupament (especialment associat a regulació del creixement i rizogènesis) i la regulació per ritmes circadians; però també en la resposta a estressos abiòtics, desenvolupament de

fruits i senescència foliar (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015; Hardeland, 2015; Reiter et al., 2015; Zhang et al., 2015b). Encara que en els darrers anys diversos estudis suggereixen la seva participació en processos de senescència i resposta a estressos, la seva possible implicació en la senescència floral no ha estat descrita. En processos de senescència foliar, el tractament amb diferents concentracions de melatonina altera les vies de senyalització de diferents hormones (auxines, ABA, àcid salicílic, etilè i jasmonats) (Weeda et al., 2014) i sistemes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics (Wang et al., 2012; Liang et al., 2015), resultant en un retard dels signes visibles i dels marcadors bioquímics i moleculars de la senescència. A més, la melatonina ha estat caracteritzada *in vivo* com un potent antioxidant d'espècies reactives d'oxigen i espècies reactives de nitrogen (Tan et al., 1993; Reiter et al., 2001; Galano et al., 2011). La melatonina retarda la inducció i progressió de senescència foliar induïda per l'edat, sequera o foscor (Wang et al., 2012; Wang et al., 2013a; Wang et al., 2013b; Wang et al., 2014; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2016). Aquest retard en la senescència ha estat associat a l'increment de l'expressió i activitat de mecanismes antioxidants enzimàtics, retardant la degradació de clorofil·les i mantenint la capacitat fotosintètica. Un altre efecte de l'aplicació de melatonina és la protecció de les membranes cel·lulars, sent capaç d'evitar la disrupció de membranes associada a estrès per fred o sequera (Zhang et al., 2015b). A més, hi ha evidències de què almenys en condicions de sequera, la melatonina pot regular el metabolisme d'ABA a nivell transcripcional, promovent la seva degradació i inhibint la seva síntesi, tot reduint el contingut d'ABA (Li et al., 2015).

3. Regulació redox

L'any 1956 Harman ja va postular la correlació entre la formació de radicals lliures i l'envelliment en la "teoria de l'envelliment pels radicals lliures" (Harman, 1956). Durant la senescència augmenta la producció de radicals lliures, i pel seu caràcter tòxic se suposa que la seva acumulació pot causar els processos de senescència i de degradació associats a aquesta. Com a organismes aerobis que

generen quantitats importants d'oxigen a causa del seu metabolisme energètic, i amb nombroses cadenes de transport d'electrons altament susceptibles als canvis de l'ambient, les plantes generen una gran quantitat d'espècies reactives (especialment espècies reactives d'oxigen, ROS) i presenten importants mecanismes antioxidants per modular aquest risc.

Les reaccions redox estan al centre del metabolisme energètic, anabolisme i catabolisme. Qualsevol pertorbació d'aquests per estressos ambientals o senyals del desenvolupament pot causar un augment de l'estrès oxidatiu i l'acumulació de d'espècies reactives d'oxigen, nitrogen i sofre. En els punts més sensibles a aquest augment, com ho són els fotosistemes i les cadenes de transport d'electrons de plastidis i mitocondries, hi ha una acumulació de mecanismes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics parcialment redundants. És important modular la producció i els nivells de ROS, perquè canvis en la seva concentració són signes de desordres fisiològics. Les ROS poden ser percebudes directament (Fischer et al., 2007; Slesak et al., 2007; Petrov & Van Breusegem, 2012), o per la seva acció oxidant sobre els mateixos antioxidants o sobre altres compostos especialment sensibles. Amb aquest paper destaquen proteïnes amb ponts disulfur sensibles a estat redox, lípids poliinsaturats (PUFA) i parelles redox solubles (nucleòtids nicotinàmida, ascorbat, glutatió) (Farmer & Mueller, 2013; Jones & Sies, 2015; Foyer & Noctor, 2016). No només els nivells de ROS i antioxidants són rellevants, també la seva distribució i estat redox als diferents òrgans i microcompartiments, contribuint a l'organització en el temps i l'espai en processos de diferenciació cel·lular, desenvolupament i adaptació a l'ambient (Mittler et al., 2011; Baxter et al., 2014; Jones & Sies, 2015). Les parelles redox solubles lliguen el metabolisme energètic, anabolisme i catabolisme de cada compartiment amb respostes de defensa a patògens i control de l'estat redox dels grups tiol/disulfur reguladors de moltes proteïnes (Noctor, 2006; Foyer & Noctor, 2011). Constituint punts d'integració i percepció de les alteracions d'aquests per factors ambientals i endògens a totes les escales d'organització, del microcompartiment a l'òrgan (Sattler et al., 2006; Foyer & Noctor, 2011; Farmer & Mueller, 2013; Munné-

Bosch et al., 2013; Baxter et al., 2014; Sevilla et al., 2015; Foyer & Noctor, 2016). Així ha d'existir un balanç entre la ràpida detoxificació de ROS, i els possibles productes oxidats, i el fet de permetre l'assoliment de concentracions necessàries per iniciar la senyalització. El control de la generació de ROS és important i representa un balanç complicat per la planta. Mentre de forma directa o indirecta poden actuar com a senyal d'un canvi ambiental per desencadenar respostes d'evitació i adaptació per tolerar un possible estrès, la generació localitzada de ROS també és necessària per respondre i controlar estressos biòtics. Una capacitat antioxidant excessiva és un avantatge a l'hora d'afrontar un tipus d'estrès però pot debilitar la resposta de la planta davant l'altre (Demmig-Adams et al., 2013; Bostock et al., 2014; Demmig-Adams et al., 2014).

De forma general els nivells de ROS, estrès oxidatiu, i finalment dany oxidatiu augmenten amb la progressió de la senescència d'òrgans a mesura que l'òrgan pateix diferents canvis metabòlics i fisiològics. Quan l'estrès oxidatiu supera un cert llindar, els mecanismes detoxificadors ja no són capaços de mitigar-ho completament i el dany oxidatiu comença. Els productes d'oxidació actuen en molts casos com a missatgers que modulen la progressió de la senescència. A mesura que el dany oxidatiu s'acumula i propaga, pot arribar a causar directament dany cel·lular i fuga d'electròlits, manifestant-se en l'estovament del fruit o pèrdua de textura dels productes frescos (via peroxidació lipídica i dany a les membranes), o indirectament promoure vies metabòliques que acceleren els darrers estadis de senescència i, en el cas dels fruits, la sobremaduració (Zhang et al., 2015c). Per altra banda, els òrgans senescents a la planta o com a producte fresc post-collita són especialment vulnerables a l'estrès oxidatiu associat a estressos biòtics i abiòtics (Kader, 2005; Kikuzawa & Lechowicz, 2011; Juvany et al., 2013), però a la vegada en condicions molt controlades aquests estressos poden ser emprats per augmentar la qualitat nutricional—inclouent la capacitat antioxidant—de productes frescos (Cisneros-Zevallos, 2003)

Diverses hormones produeixen ROS com a missatgers secundaris en les cascades de senyalització que integren la senyalització de canvis en els continguts locals d'hormones i/o la sensibilitat a aquestes. La capacitat tamponadora redox, que en gran part està determinada per l'abundància d'ascorbat als diferents compartiments, modula aquest senyal i les interaccions entre senyals de diferents hormones (Bartoli et al., 2013; Kohli et al., 2013). Altres antioxidants com glutatió, glutaredoxines, tioredoxines i peroxidases també participen en la integració de senyals hormonals i redox (Foyer & Noctor, 2011; Sevilla et al., 2015; Dietz, 2016). La interacció entre aquests dos importants sistemes de senyalització permet optimitzar la productivitat en condicions permissives, i tenir la capacitat de respondre a condicions difícils; tot regulant processos de creixement, desenvolupament, reproducció, mort cel·lular programada i respostes d'evitació i adaptació davant l'estrès (Bartoli et al., 2013; Xia et al., 2015). Aquest complex regulador també integra i modula altres mecanismes de senyalització i reguladors com llum, sucres (van Doorn & Woltering, 2008; Wingler & Roitsch, 2008; Gläßer et al., 2014), i ritmes circadians (Lai et al., 2012).

4. Regulació dels nivells de vitamines antioxidants

Les vitamines són un conjunt de compostos orgànics essencials per la dieta humana, sent verdures i fruits la major font de vitamines a la majoria de dietes (Combs, 2012; Fitzpatrick et al., 2012). D'aquesta manera, el terme vitamina és definit basat en requeriments humans, destacant que la pèrdua evolutiva de la capacitat per sintetitzar aquests compostos *de novo* causa aquest requeriment en la dieta d'aquests o els seus precursors immediats per mantenir una bona salut i un desenvolupament correcte (Combs, 2012). Però això no les fa menys essencials en el desenvolupament i metabolisme de les plantes com a cofactors, cosubstrat o per mecanismes no enzimàtics (Rébeillé et al., 2007; Hanson et al., 2016). Per exemple, moltes vitamines tenen directament un rol antioxidant o actuen com a cofactors o cosubstrat en reaccions redox (Asensi-Fabado & Munné-Bosch, 2010). Des d'un punt de vista purament químic, un antioxidant no és més que un compost

que preveu o retarda l'oxidació d'un altre compost. Biològicament, la definició d'antioxidant considera la seva capacitat per oxidar-se, tot protegint altres substrats més vitals i especialment sensibles (lípidis poliinsaturats, proteïnes, ADN) amb baixes concentracions, i la presència de mecanismes de reciclatge (Bast & Haenen, 2013). A la vegada, aquestes característiques fisicoquímiques les fan làbils a temperatura, llum, agents oxidants, humitat i canvis de pH (Fitzpatrick et al., 2012). *In vivo* aquestes condicions poden ser més o menys rellevants, però es a partir de la collita que aquesta labilitat causa grans pèrdues de valor nutricional i capacitat antioxidant, impactant la longevitat i valor del producte (Lee & Kader, 2000; Fitzpatrick et al., 2012). A causa de la rellevància de les vitamines antioxidants en la salut i el seu caràcter làbil, l'estudi de la seva producció i les pèrdues que es produeixen en tots els estadis de la producció des de la planta fins a l'emmagatzemament, distribució i cuinat és especialment rellevant. Els continguts de vitamines acumulats en el punt de partida són el primer punt, en molts casos pels estressos abiòtics i biòtics propis de la post-collita gairebé sempre només se'n pot reduir el seu contingut (Lee & Kader, 2000; Kader, 2005), encara que la manipulació controlada de les condicions ambientals és capaç d'augmentar els nivells de compostos d'interès organolèptic o nutricional després de la collita (Cisneros-Zevallos, 2003). D'aquí la rellevància d'entendre la seva fisiologia i la seva regulació per factors interns i externs. Així com l'impacte de les pràctiques de maneig i els programes de millora vegetal per augmentar el contingut de vitamines (biofortificació), podent no només millorar la nutrició humana, sinó també la resistència a l'estrès de la planta i del producte fresc (Fitzpatrick et al., 2012; Hanson et al., 2016).

Així, la vida comercial del producte fresc—hortalissa, flor tallada o fruit—és afectada pel contingut d'antioxidants total. En el cas de flor o fruit la senescència d'òrgans és el final de la seva comercial, però el cas del fruit és diferent. Un cop madur pot esdevenir la sobremaduració. En fruits amb reduïda capacitat antioxidant, les ROS s'acumulen ràpidament després de l'inici de la maduració (verolament, *onset of fruit ripening*) i la sobremaduració té lloc acceleradament

(Mondal et al., 2004). En canvi, fruits amb major capacitat antioxidant o amb aplicacions post-collita d'antioxidants, moderen o retarden el dany oxidatiu i per tant moderen i/o retarden la consegüent sobremaduració (Zhang et al., 2015c). Però més que la capacitat antioxidant total, només els nivells d'alguns antioxidants són eficaços davant l'increment de la sensibilitat a patògens oportunistes del fruit madur (Zhang et al., 2015c).

Vitamina C – ascorbat

L'àcid L-ascòrbic (vitamina C) és un compost multifuncional i ubic, amb funcions antioxidants, que actua com a cofactor enzimàtic i precursor d'oxalat i tartrat. Representa un dels metabòlits més abundants els teixits vegetals. Per exemple, en fulles verdes representa el 10% dels carbohidrats solubles (Smirnoff & Wheeler, 2000), però pot assolir concentracions encara més elevades en òrgans embornals com fruits, flors o tubercles (Fitzpatrick et al., 2012). Tot i la seva rellevància, no va ser fins l'any 1998 que la via síntesi principal en plantes va ser descrita (Wheeler et al., 1998), però els darrers elements d'aquesta només han estat identificats més recentment (Linster & Clarke, 2008). La glucosa és el substrat primari d'aquesta via, que per una sèrie de reaccions compartides amb la formació de sucres de la paret es transforma en GDP-L-galactosa (Fig. 3). Així, aquesta via és denominada de la L-galactosa o de Smirnoff-Wheeler (pels seus principals contribuïdors). A partir d'aquest punt, els principals punts reguladors són la GDP-L-galactosa fosforilasa (GGP, VTC2/VTC5), localitzada tant al citosol com al nucli; i el pas final per la L-galactolactona deshidrogenasa (GLDH), localitzat a la mitocòndria (Wheeler et al., 1998; Linster & Clarke, 2008). Plantes modificades genèticament sense GGP o GLDH no són viables, provant el rol vital d'aquesta via de síntesi de vitamina C i de la mateixa vitamina C en la planta (Bartoli et al., 2016). No obstant això, altres precursors poden contribuir a la síntesi d'àcid ascòrbic. L'àcid D-galacturònic provinent de la degradació de la pectina de les parets cel·lulars és transformat a través d'unes poques reaccions en àcid ascòrbic; sent rellevant aquesta via en els darrers estadis de la maduració de fruits (Badejo et

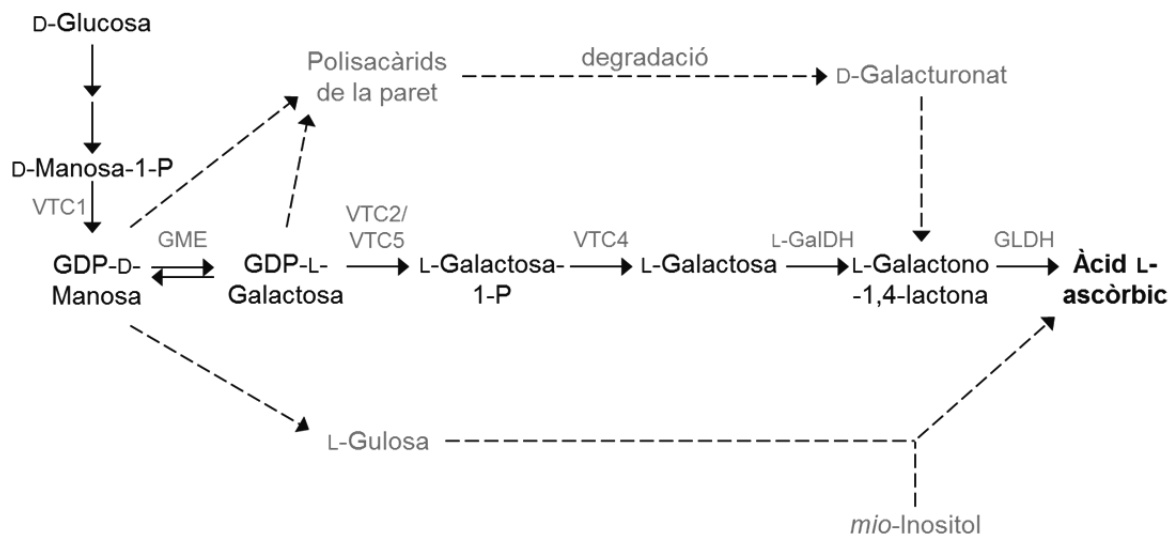


Fig. 3. Rutes biosintètiques de l'àcid ascòrbic en plantes. La principal via de la L-Galactosa es troba destacada (línia contínua), designant intermediaris i els enzims coneguts pel nom del gen que les codifica en *Arabidopsis*. Vies alternatives estan marcades per fletxes discontinües i només el principal intermediari que dóna nom a cada via és indicat. GME, GDP-D-Manosa epimerasa; L-GalDH, L-Galactosa deshidrogenasa; GLDH, L-Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa. Totes les reaccions tenen lloc al citosol amb l'excepció del darrer pas catalitzat per la GLDH localitzat a la mitocòndria.

al., 2012). Tot i això, aquestes dues vies convergeixen en la darrera reacció catalitzada per la L-GalLDH. A més, productes de l'oxidació de *mio*-inositol i la GDP-L-gulosa han estat proposats com a precursors d'àcid ascòrbic per vies independents a aquestes dos, però la seva contribució en plantes sembla molt menor (Bartoli et al., 2016).

Considerant les importants funcions redox de l'àcid ascòrbic el reciclatge de les formes oxidades resulta clau per mantenir la seva funció (Fig. 4). L'àcid ascòrbic pot ser oxidat a monodehidroascorbat i deshidroascorbat (MDHA i DHA) per diverses vies (Fig. 4): per *scavenging* directe d'algunes ROS, per *scavenging* d'algunes ROS mitjançat per enzims (com l'ascorbat peroxidasa, APX), enzimàticament acoblat a la reducció d'oxigen (ascorbat oxidasa, AO), regenerant altres compostos oxidats (com l' α -tocoferol), o sent consumit per generar oxalat o tartrat (Smirnoff & Wheeler, 2000; Debolt et al., 2007; Foyer & Noctor, 2011; Balestrini et al., 2012). MDHA i DHA poden ser reciclats essent reduïts a àcid ascòrbic enzimàticament per mitjà de les reductases de MDHA i DHA (MDHAR, DHAR) amb poder reductor de NADPH o de glutatió. Als cloroplasts pot ser

regenerat amb electrons fotosintètics per plastoquinona o ferredoxina (Asada, 2006; Foyer & Noctor, 2011). Tots aquests elements oxidants i antioxidants contribueixen a senyalització redox retrograda i dins del cloroplast (Pfannschmidt, 2010; Baxter et al., 2014; Miret & Munné-Bosch, 2015), i a la regulació de l'eficiència fotosintètica i la regulació d'aquesta pel cicle aigua-aigua (Asada, 1999). Finalment si el deshidroascorbat s'acumula, és degradat espontàniament i irreversiblement (Green & Fry, 2005).

La capacitat tamponadora redox és clau per les respostes senyalitzades per hormones. Aquest fet es fa palès pel fet que diferents mutants deficients en ascorbat presenten major resistència a patògens biotròfics (Pavet et al., 2005; Mukherjee et al., 2010), mentre sobreexpressors d'ascorbat oxidasa que presenten un estat redox més oxidat presenten menor resistència (Pignocchi et al., 2006). En el cas del glutatió també es presenten interaccions similars entre canvis en el *pool* i l'estat redox de la parella redox soluble, diferents estressos, i metabolisme i senyalització hormonal (Foyer & Noctor, 2011; Bartoli et al., 2013). A l'estar present en concentracions més baixes, interaccionar amb grups tiol reguladors de l'activitat de moltes proteïnes i variar menys el seu estat redox davant els estressos, alguns autors destaquen el paper regulador de l'estat redox del glutatió sobre el de l'ascorbat (Foyer & Noctor, 2011; Munné-Bosch et al., 2013).

La recerca en vitamina C ha prestat majoritàriament atenció al seu rol antioxidant, però tant en plantes com animals la vitamina C també participa en processos de senyalització redox, és un donador d'electrons en reaccions no catalitzades i també com a cosubstrat en reaccions catalitzades per un gran nombre d'enzims clau en el metabolisme (Arrigoni & De Tullio, 2000; Arrigoni & De Tullio, 2002; Foyer & Noctor, 2011). L'àcid ascòrbic pot interaccionar químicament sense intervenció d'enzims amb superòxid, peròxid d'hidrogen (amb el que també enzimàticament per peroxidases), ions metàl·lics lliures i peròxids orgànics (Arrigoni & De Tullio, 2002). Les dioxigenases depenent de 2-oxoglutarat (2-ODD) constitueixen una família d'enzims que requereix àcid

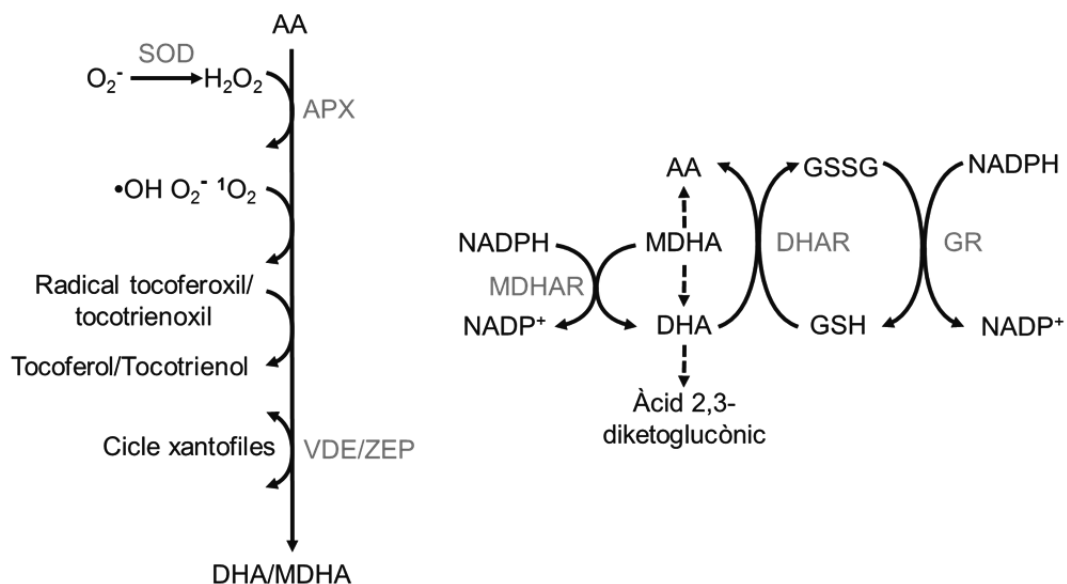


Fig. 4. (esquerra) Funcions antioxidants i detoxificadores de la vitamina C. L'àcid ascòrbic pot detoxificar ROS mitjançant reaccions enzimàtiques en el cas del peròxid d'hidrogen (APX, ascorbat peroxidasa) o no enzimàtiques amb la resta de ROS ($\cdot OH$, radical hidroxil; O_2^- , radical superòxid; 1O_2 , singlet d'oxigen) i altres radicals com els radicals de vitamina E, reciclant-les. A més l'ascorbat és un cofactor essencial en un gran nombre de reaccions claus pel metabolisme vegetal (veure text), se'n destaca el cicle de les xantofiles (VDE/SEP, veure Fig. 1). (dreta) Via de reciclatge de vitamina C. Després de la seva oxidació a MDHA (monodehidroascorbat), aquest pot ser reduït per la monodehidroascorbat reductasa (MDHAR) o pot dismutar no enzimàticament (línies trencades) en àcid ascòrbic (AA) i dehidroascorbat (DHA). El DHA és espontàniament i irreversiblement hidrolitzat a àcid 2,3-diketogluconic a menys que sigui reciclat per la dehidroascorbat reductasa (DHAR) fent servir el poder reductor del glutatió (GSH), o per electrons fotosintètics o respiratoris per mitjà de ferredoxina (no mostrat). El glutatió oxidat (GSSG) és reduït per la glutatió reductasa (GR) amb NADPH com a reductor.

ascòrbic com a cofactor. Presenten una gran rellevància en el metabolisme de les plantes i la disponibilitat d'àcid ascòrbic pot modular la seva activitat. Aquesta família inclou dioxigenases involucrades en el metabolisme hormonal: oxidases de gibberel·lines (biosíntesi de gibberel·lines), ACC oxidasa (darrer pas de la síntesi d'etilè), NCEDs (síntesi d'ABA), i degradació de melatonina (per la recentment descrita melatonina 2-hidroxilasa) (Byeon & Back, 2015). Però també enzims claus en el metabolisme de la paret com les prolil i lisil hidroxilases, potencialment regulant l'expansió i divisió cel·lular; el cicle de les xantofil·les; la síntesi de vitamina E i plastoquinones per la hidroxifenilpiruvat dioxigenasa; diverses hidroxilases del metabolisme dels flavonoides i alcaloides; i diversos enzims de la

α -oxidació dels àcids grassos. Així, l'àcid ascòrbic és un cosubstrat necessari per a la síntesi d'ABA, etilè i gibberel·lines, i la seva disponibilitat influeix la síntesi d'aquestes hormones (Arrigoni & De Tullio, 2002; Pastori et al., 2003).

La regulació de la síntesi d'àcid ascòrbic ha estat extensament estudiada a plantes. Mentre l'acumulació d'àcid ascòrbic inhibeix la seva pròpia síntesi, nivells elevats del seu precursor glucosa, l'estimulen (Smirnoff & Wheeler, 2000; Bartoli et al., 2016). La síntesi de vitamina C és regulada per la quantitat, qualitat de la llum i fotoperíode. Promovent l'acumulació d'àcid ascòrbic amb l'augment de la irradiància i per l'exposició a llum directa (relació llum vermella/vermella llunyana), però també per l'augment del fotoperíode (Bartoli et al., 2016). De la mateixa manera, un augment de la fotosíntesi també es correlaciona amb un augment dels continguts d'àcid ascòrbic. Un augment de l'activitat respiratòria al mitocondri també promou la seva síntesi (Bartoli et al., 2016). En general, els teixits joves en creixement i més actius presenten concentracions elevades d'àcid ascòrbic, mentre aquesta decreix amb la senescència dels diferents òrgans. Aquests processos són bàsicament regulats per hormones, però la recerca explorant la seva interacció amb el metabolisme de la vitamina C és escassa (Bartoli et al., 2016). Durant la senescència de fulles i flors, la producció i sensibilitat a l'etilè incrementa, mentre la concentració d'àcid ascòrbic decreix ràpidament (Barth et al., 2006). En canvi, defectes en la senyalització per etilè (una via de senyalització negativa) presenten més ascorbat a fulles i fruits (Bartoli et al., 2013). Plantes deficientes en brassinoesteroïdes presenten baixa síntesi d'àcid ascòrbic, però també produeixen majors quantitats d'etilè. Per altra banda, les gibberel·lines estimulen el creixement i també la síntesi d'àcid ascòrbic (Millar et al., 2003), mentre els jasmonats estimulen l'expressió i activitat dels enzims de reciclatge (Sasaki-Sekimoto et al., 2005). En fruits, que constitueixen una de les principals fonts de vitamina C en la majoria de dietes, el contingut de vitamina C pot ser molt variable i canvia durant la maduració. Mentre algunes espècies presenten concentracions molt elevades al fruit jove, es produeix una gran pèrdua amb la maduresa. En canvi en moltes altres hi ha un acumulació durant la maduració. L'àcid ascòrbic pot ser

sintetitzat al fruit, però també transportat llargues distàncies des d'òrgans font a òrgans embornal (Li et al., 2008). Aquesta darrera contribució des de les fulles és més important en fruits verds immadurs i decreix durant la maduració (Bartoli et al., 2016). En fruits, contribueixen tant la via de la L-galactosa com la de l'àcid D-galacturònic, reutilitzant els sucres alliberats per la degradació de la paret amb la maduració (Badejo et al., 2012). A mesura que progressa la maduració aquesta és més rellevant (Badejo et al., 2012), així com l'activitat dels enzims de reciclatge d'ascorbat (Cruz-Rus et al., 2011; Alós et al., 2013; Alós et al., 2014).

Encara que nombrosos estudis epidemiològics estableixen una relació positiva entre la vitamina C i beneficis per la salut humana (prevenció de malalties cardiovasculars, càncer i altres malalties), l'únic benefici demostrat clínicament per la suplementació amb vitamina C és la deficiència d'ascorbat manifestada com escorbut (Michels & Frei, 2013). Com altres compostos antioxidants rellevants a la dieta humana, l'estudi dels efectes de dosis farmacològiques de vitamina C en envelliment, càncer i prevenció de malalties degeneratives cròniques presenta resultats inconsistents (Ye & Song, 2008; Michels & Frei, 2013). Tampoc hi ha un efecte beneficiós consistent de la suplementació amb vitamina C en la longevitat de diferents organismes model, consistent amb els resultats d'estudis d'intervenció en humans (Pallauf et al., 2013). Cal tenir en compte que la majoria d'animals són capaços de sintetitzar àcid ascòrbic per diferents vies.

Curiosament, l'ascorbat té dos papers importants en el metabolisme i funció de l'altra vitamina objecte d'estudi d'aquesta tesi. L'àcid ascòrbic pot regenerar directament la vitamina E oxidada per la seva acció *scavenging* (Mène-Saffrané & DellaPenna, 2010), al mateix cop que té el potencial de regular la seva síntesi en ser un cofactor de l'enzim hidroxifenilpiruvat dioxigenasa que participa en la seva biosíntesi (Arrigoni & De Tullio, 2000).

Vitamina E – tocoferols, tocotrienols i compostos afins

La vitamina E es descrigué al 1922 com a un factor essencial en la dieta animal per una correcta reproducció (Evans & Bishop, 1922), però fins als anys 60s no s'identificaren les seves capacitats antioxidants (Epstein et al., 1966). La vitamina E consisteix en tocoferols i tocotrienols, que difereixen en el grau de saturació de la seva cua prenil. Aquesta cua és condensada amb un cap cromanol—responsable de la seva potent capacitat antioxidant—que presenta diferents patrons de metilació, donant les formes α , β , γ , i δ . Les diferents característiques fisicoquímiques pel diferent grau de saturació de la cua prenil, així com els diferents graus i posicions de metilació del cap cromanol donen diferent capacitat antioxidant en diferents medis (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; Atkinson et al., 2008). Les formes α - i γ -tocoferol són les formes més abundants a plantes, animals i humans (Sheppard et al., 1993).

L'anell aromàtic prové de la via de l'àcid siquímic (Fig. 5), mentre la cua poliprenil (fítol difosfat pels tocoferols, geranilgeranil difosfat pels tocotrienols, i solanesil difosfat pel plastocromanol-8) deriva de la via del metileritritol 4-fosfat (MEP) (DellaPenna & Pogson, 2006). La biosíntesi té lloc als plastidis i no hi ha evidències de transport intracel·lular ni intercel·lular (Maeda & DellaPenna, 2007). La síntesi dels tococromanols s'inicia amb la conversió d'hidrofenilpiruvat a àcid homogentísic, el qual és condensat amb diferents politerpens de la via del MEP per donar les diferents formes amb diverses transferases que presenten diferents afinitats pels diversos substrats (Yang et al., 2011). La combinació de l'activitat de diferents metil transferases i la tocoferol ciclasa donen lloc a les diferents formes α , β , γ , i δ (DellaPenna & Pogson, 2006). A més de la síntesi *de novo* de terpens, els tocoferols també es poden sintetitzar a partir de la degradació de les clorofil·les, amb una sèrie de quinases que fosforilen el fítol alliberat a fítol difosfat (Valentin et al., 2006; vom Dorp et al., 2015). Aquesta ruta, i la seva regulació, semblen ser les més rellevants per la síntesi de tocoferols i la regulació dels seus nivells en fulles

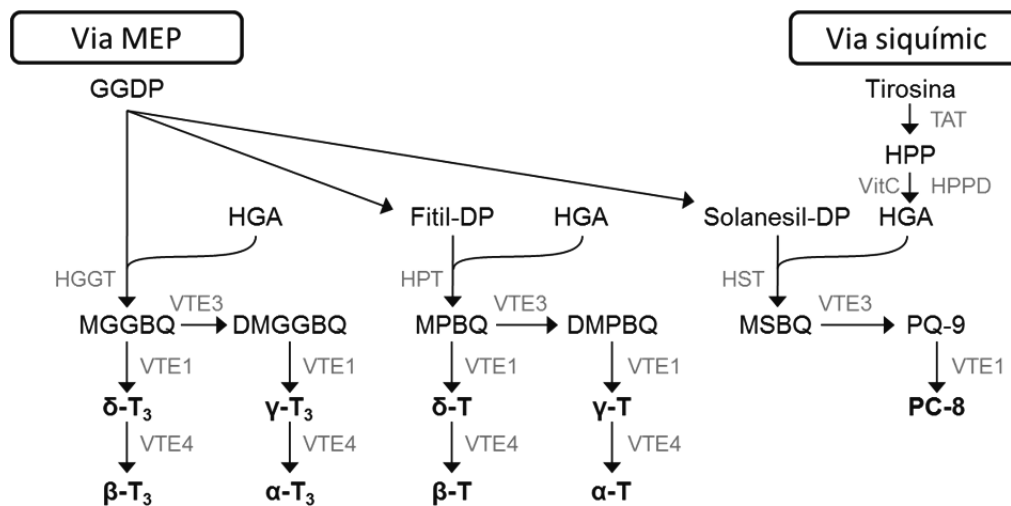


Fig. 5. Rutes biosintètiques de tocochromanols a plantes, incloent-hi: tocoferols (T), tocotrienols (T3) i plastocromanol-8 (PC-8). Els tocochromanols es formen per la condensació d'una cua prenil, que prové de la via del metileritritol 4-fosfat (MEP), i un cap polar derivat de la via del siquímat. Enzims que catalitzen les reaccions indicades en gris, amb la denominació del seu gen a *Arabidopsis*. DMGGBQ, 2,3-dimetil-6-geranilgeranil benzoquinol; DMPBQ, 2,3-dimetil-6-fitil-1,4-benzoquinol; DMSBQ, 2,3-dimetil-6-solanesil-1,4-benzoquinol; GGDP, geranilgeranil difosfat; HGA, àcid homogentísic; HST, homogentisat solanesiltransferasa; MGGBQ, 2-metil-6-geranilgeranil benzoquinol; MPBQ, 2-metil-6-fitil-1,4-benzoquinol; MSBQ, 2-metil-6-solanesil-1,4-benzoquinol; PQ-9, plastoquinona-9. En el cas dels tocoferols, el fitil difosfat també pot provenir de la degradació de la clorofil·la i la successiva acció dels enzims *VTE5* i *VTE6* (no mostrat).

joves i madures, almenys en *Arabidopsis* (Zhang et al., 2015a); i també sembla tenir un paper important durant la maduració de fruits (Almeida et al., 2016).

La importància de la vitamina E com a antioxidant ve donada per la seva capacitat tant de *scavenging* de radicals lipídics, aturant la cadena de peroxidació lipídica (Fig. 6), com per la seva capacitat de *quenching* i *scavenging* de l'oxigen singlet (Kruk et al., 2000; Munné-Bosch & Alegre, 2002). Com a conseqüència de l'activitat *scavenging*, es generen radicals tocoferoxil i tocotrienoxil, que poden ser regenerats per àcid ascòrbic i altres reductors (Bisby & Parker, 1995). Una oxidació posterior genera tocoferol/tocotrienol quinones que a través d'una sèrie d'oxidoreductases, deshidratases i donadors de poder reductor, poden reciclar aquestes formes oxidades (Kobayashi & DellaPenna, 2008; Eugeni Piller et al., 2014). Aparentment aquesta ruta és exclusiva de α -tocoferol, donant un nou

significat a l'acumulació preferent d'aquesta forma de vitamina E al llarg de l'evolució (Kobayashi & DellaPenna, 2008; Esteban et al., 2009).

Al regular la peroxidació lipídica, els plastocromanols controlen l'aparició dels productes de peroxidació amb destacada activitat senyalitzadora, com malondialdehid, jasmonats i altres oxilipines i espècies electrofíliques reactives (Farmer & Mueller, 2013). A més la vitamina E també inhibeix la peroxidació enzimàtica (no catalitzada per ROS) en inhibir l'activitat lipooxigenasa (Reddanna et al., 1985). D'aquí la rellevància de la vitamina E en la modulació de la senyalització retrògrada des del cloroplast (Fischer et al., 2007; Miret & Munné-Bosch, 2015). A més, diferents formes de vitamina E també han estat associades a la inhibició o activació de l'activitat d'altres enzims especialment associats a mecanismes de regulació, cascades senyalitzadores i activitats enzimàtiques en animals i plantes; encara que el mecanisme de cap d'elles ha estat dilucidat *in vivo* (Jiang et al., 2000a; Azzi, 2007; Traber & Atkinson, 2007; Brigelius-Flohé, 2009). Plantes deficientes en vitamina E presenten fenotips no sempre lligats directament a una funció antioxidant de la vitamina E, ni processos en els quals en principi participen directament els plastidis. Per exemple, les plantes deficientes en vitamina E presenten deficiències en l'exportació i transport de fotoassimilats associats a la deposició de cal·losa a la paret cel·lular en condicions de baixes temperatures

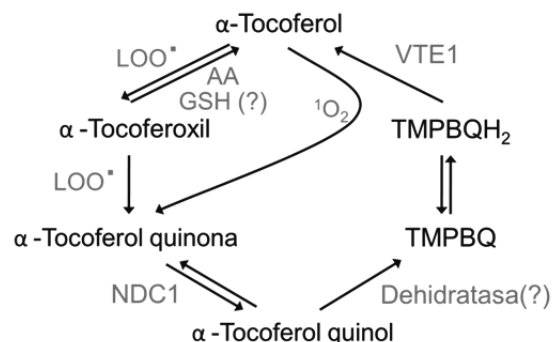


Fig. 6. Vies d'oxidació i reciclatge d'α-tocoferol a plantes. El procés i productes d'oxidació són homòlegs pels altres tococromanols, però el mecanisme de reciclatge no és present. AA, àcid ascorbic; GSH, glutatió; NDC1, NAD(P)H-dependent quinona oxidoreductasa; VTE1, tocoferol ciclasa; TMPBQ, 2,3,5-trimetil-6-fítill-1,4-benzoquinona; TMPBQH₂, 2,3,5-trimetil-6-fítill-1,4-benzoquinol. A més del *scavenging* de radicals peroxil (LOO⁻) i singlet d'oxigen (¹O₂), els tococromanols poden desactivar físicament el singlet d'oxigen mitjançant *quenching* (no mostrat).

(Maeda & DellaPenna, 2007; Maeda et al., 2014), o sense cap obstrucció simplàstica sota estrès salí (Asensi-Fabado et al., 2015), o per mecanismes no descrits durant la maduració de fruits (Almeida et al., 2016). Els fenotips extraplastidials de la deficiència de vitamina E podrien ser parcialment explicats per la recent descripció de certa continuïtat metabòlica entre les membranes dels cloroplasts i el reticle endoplasmàtic i els seus efectes en els enzims i receptors del reticle (Mehrshahi et al., 2013; Mehrshahi et al., 2014). Explicant potencialment alguna de les funcions no antioxidants descrites, com la modulació de la senyalització d'etilè per diferents formes de tocoferol (Cela et al., 2011).

En el regne vegetal hi ha una gran variabilitat en els continguts i la composició de vitamina E (Falk & Munné-Bosch, 2010), però els nivells d' α -tocoferol semblen tenir un avantatge evolutiu, donat que augmenten en els grups evolutivament més moderns (Esteban et al., 2009). En teixits fotosintètics madurs, l' α -tocoferol és la forma predominant, seguida del seu precursor immediat, γ -tocoferol, que incrementa en teixits molt joves i senescents (Lushchak & Semchuk, 2012; Juvany et al., 2013). Les diferents formes presenten diferent mobilitat a membrana i profunditat d'inserció, i per tant, diferent accessibilitat tant als radicals oxidats com als sistemes de reciclatge per ascorbat (Nagaoka et al., 2000; Atkinson et al., 2008). L'activitat reductora de ROS i radicals lipídics té lloc específicament a la superfície de les membranes, a la interfase hidrofòbica-hidrofílica (Atkinson et al., 2008). A més la cua més llarga i insaturada del tococromanol plastocromanol-8 (PC8) també és capaç de dissipar (*quenching*) l'oxigen singlet (Kruk et al., 2014). La vitamina E es troba associada preferentment als mateixos PUFA que protegeix de la peroxidació lipídica, trobant-se també més inserida dins la membrana (Marquardt et al., 2013) i contribuint a l'estabilització de les membranes, possiblement afectant processos associats a membranes com senyalització i l'activitat de proteïnes de membrana (Brigelius-Flohé, 2009; Mehrshahi et al., 2014). L'estructura dels tococromanols, una llarga cua prenil més o menys saturada unida a un cap polar, fa que siguin molècules amfipàtiques distribuïnt-se amb la cua prenil inserida a les diferents membranes dels plastidis amb l'anell

aromàtic polar i el grup hidroxil oxidable exposats a les superfícies (Fukuzawa et al., 1993; Atkinson et al., 2008).

Només els organismes fotosintètics són capaços de sintetitzar vitamina E, i totes les formes són sintetitzades i acumulades a plastidis (Munné-Bosch & Alegre, 2002; DellaPenna & Pogson, 2006). A més a més, s'ha descrit la seva presència a cossos lipídics i altres vesícules derivades del reticle endoplasmàtic (Fisk et al., 2006; White et al., 2006) possiblement degut a la recentment descrita interacció entre aquests orgànuls (Mehrshahi et al., 2013; Mehrshahi et al., 2014). Els animals poden ingerir totes les formes en la seva dieta, però la forma α -tocoferol és absorbida i retinguda selectivament per la proteïna transferidora de α -tocoferol (α -TTP, *α -tocopherol transfer protein*), mentre les altres formes són preferentment degradades al fetge (Hosomi et al., 1997; Schuelke et al., 2000; Traber, 2013). Curiosament el γ -tocoferol, la segona forma més abundant, és l'única capaç de detoxificar també espècies reactives del nitrogen pel patró de metilació de l'anell cromanol (Christen et al., 1997), però a la vegada el seu producte d'oxidació és notablement més tòxic (Bast & Haenen, 2002; Cornwell & Ma, 2007).

En molts casos els mutants deficients en vitamina E no presenten alteracions del fenotip visible, bioquímic o d'expressió genètica en condicions permissives. És només en diferents condicions d'estrès que es manifesta un fenotip clarament pernicios. La vitamina E juga un paper en la tolerància a diversos estressos. Nombrosos estressos condueixen a un augment de l'estrès oxidatiu i generació de ROS (Foyer & Noctor, 2009) que si no són detoxificats, poden causar danys oxidatius a lípids, proteïnes o àcids nucleics. Els nivells de vitamina E són especialment responsius a estressos abiòtics. El tipus d'estrès, la seva intensitat, l'estat fisiològic de la planta, i la sensibilitat pròpia de les diferents espècies/varietats determinen la dinàmica i la magnitud de l'acumulació de vitamina E (Munné-Bosch, 2005). L'exposició a alta intensitat de llum, estrès hídric, sequera, estrès salí, estrès per metalls, estrès per temperatura, ozó i per UV-B estan entre els estressos associats a increments de vitamina E (Lushchak &

Semchuk, 2012), però també augmenten els seus nivells en fases de desenvolupament primerencs i senescents tant d'òrgans com de planta sencera (Munné-Bosch & Alegre, 2002; Juvany et al., 2013). La vitamina E protegeix la planta contra l'estrès oxidatiu, associat a tots aquests estressos (Munné-Bosch, 2005). Però com amb altres mecanismes antioxidants lipídics (i.e., xantofil·les i carotens) es manifesten *trade-offs* entre la tolerància i resposta a estressos abiòtics i biòtics. Mentre el control de la generació de ROS és necessari per superar un estrès abiòtic, en molt estressos biòtics la resposta que permet controlar l'expansió del patogen requereix la generació i cúmul de ROS (Demmig-Adams et al., 2013; Demmig-Adams et al., 2014). A la vegada, l'activitat antioxidant de la vitamina E modula senyals redox i de productes d'oxidació lipídica necessàries per a la senyalització i modulació de la resposta a ambdós tipus d'estressos (Demmig-Adams et al., 2013; Miret & Munné-Bosch, 2015).

Hi ha evidència de la regulació hormonal de diferents enzims de la ruta de síntesi de vitamina E amb conseqüents canvis del seus nivells. Curiosament, en tots els casos escrits a la literatura els passos regulats impliquen passos anteriors a la condensació de la part polar i la cua prenil. I per tant no haurien d'afectar la distribució de les diferents formes α , β , γ , i δ , sinó el contingut de vitamina E total. Els jasmonats estan involucrats en la regulació de la tirosina aminotransferasa (TAT), que catalitza la síntesi d'hidroxifenilpiruvat (Sandorf & Holländer-Czytko, 2002). Mentre la *p*-hidroxifenilpiruvat dioxigenasa (HPPD) és responsable de la formació d'àcid homogentísic, necessari per a la síntesi tant dels diferents compostos de vitamina E com platocromanol-8 i plastoquinol-9. Almenys durant la maduració de fruits climatèrics i la senescència foliar, l'etilè promou l'expressió de la *p*-hidroxifenilpiruvat dioxigenasa, incrementant els nivells de vitamina E (Singh et al., 2011). Aquest enzim també pot ser promogut per IAA i ABA, presentant elements responsius a ABA (ABRE) en la seva regió promotora (Chaudhary & Khurana, 2009; Singh et al., 2011). La regulació dels precursors de la cua prenil és força més complexa, perquè el GGDP és precursor d'un ampli ventall de compostos: fil·loquinona (vitamina K), clorofil·les, gibberel·lines, carotenoides i

Introducció

tots els seus derivats (e.g., xantofil·les, productes d'oxidació volàtils, ABA, estrigolactones) (DellaPenna & Pogson, 2006).

Com amb altres compostos antioxidants rellevants a la dieta humana, l'estudi dels efectes beneficiosos de la vitamina E en envelliment i malalties degeneratives cròniques presenta resultats inconsistents (Stocker & Keaney, 2004; Stocker, 2007). No hi ha un efecte beneficiós consistent de la vitamina E en la longevitat de diferents organismes model consistent amb els resultats d'estudis d'intervenció en humans (Ernst et al., 2013). El meta-anàlisi d'estudis clínics amb dosis farmacològiques d' α -tocoferol determina efectes negatius o no significatius en la mortalitat i longevitat (Abner et al., 2011), cap efecte en càncer (Goodman et al., 2011) però efectes positius en la prevenció de malalties cardiovasculars (Lee et al., 2005; Ye & Song, 2008).

5. Models d'estudi

Brassica oleracea* var. *capitata

El gènere *Brassica* pertany a la família de les Brassicàcies, que inclou l'àmpliament estudiada planta model *Arabidopsis*, i representa més del 10% de la producció d'hortalisses i oli vegetal d'ús alimentari (Beilstein et al., 2006). La selecció per part de l'home ha generat un gran nombre de varietats de l'espècie *Brassica oleracea*, incloent-hi: cols, coliflor, bròcoli, cols de Brussel·les, kohl-



Fig. 7. Imatge composta de *Brassica oleracea* var. *capitata*. (esquerra) col sencera (imatge de portada de Miret (2012)). (dreta) de dreta a esquerra, successió de fulles externes als 0, 2, 4, 7 i 9 dies en condicions controlades a 4°C (a dalt) o 25°C (a baix) (imatge composta que forma part del treball enviat a Plant Biotechnology Journal (Miret et al., 2017)).

rabi, pak-choi i kale. Les varietats de *B. Oleracea* són riques en proteïnes, carotenoides, glucosinolats i altres compostos d'interès en la salut humana i de les plantes (Kramchote et al., 2012; Manchali et al., 2012; Sun et al., 2012). La col verda (*B. oleracea* var. *capitata*, Fig. 7) és un cultiu econòmicament rellevant (FAO, 2012) i és universalment consumida fresca, cuinada o processada (Chiang et al., 1993). *B. oleracea* var. *capitata* és rica en metabòlits secundaris amb activitats antioxidants i anticancerígenes, i beneficiosos per la prevenció de malalties cardiovasculars; com vitamina C, vitamina E, compostos fenòlics, carotenoides, glucosinolats i altres compostos menors.

Desentrellar la regulació del metabolisme d'aquests compostos, en especial durant la senescència és complicat per la complexitat del seu genoma (Liu et al., 2014). En aquest sentit, la seva proximitat filogenètica a la planta model *Arabidopsis* és enganyosa per les diverses duplicacions genòmiques patides per les *Brassica* (Schranz et al., 2006; Town et al., 2006). Però a la vegada útil per traslladar el coneixement mecanístic generat en *Arabidopsis* a plantes de gran interès agronòmic i explotar l'estudi de la varietat fenotípica (Paterson et al., 2001). Des del punt de vista del maneig i la manipulació de l'ambient pre- i post-collita hi ha grans oportunitats per minimitzar les pèrdues a la cadena logística i augmentar el valor i qualitat nutricional del producte (Cantwell & Suslow, 2001; Singh et al., 2006; Chen et al., 2012; Thongsavath et al., 2012).

Iris* × *hollandica* i *Lilium

Un important mercat agronòmic és el mercat de la flor tallada, en el qual la longevitat floral és un dels factors més importants a l'hora d'introduir i mantenir varietats als mercats (Lawson, 1996; Benschop et al., 2010). Donat que els pètals són els òrgans florals més visibles i normalment els primers a mostrar signes visibles de senescència, aquests limiten la longevitat floral (van Doorn & Woltering, 2008).

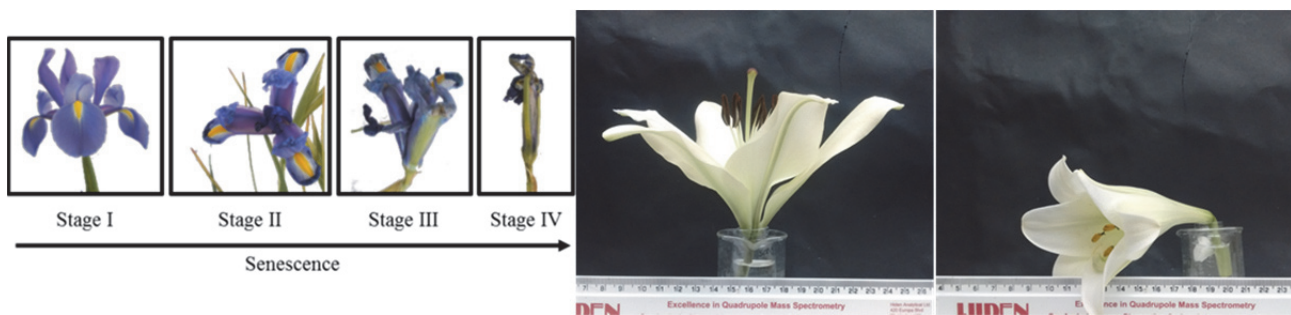


Fig. 8. (esquerra) imatge composta amb la successió d'estadis de senescència d'*Iris x hollandica* (Miret et al., 2014); (dreta) *Lilium* LA Courier i *Lilium longiflorum* cv. 'White heaven' completament obertes i en antesi (fotografies de l'autor).

El gènere *Lilium* (Fig. 8, dreta), originari de l'arxipèlag de les illes Ryukyu (Japó), pertany a la família de les Liliàcies que engloba més de 100 espècies i centenars de cultivars comercials. Són plantes monocotiledònies, bulboses, herbàcies i perennes, actualment distribuïdes per les zones temperades de l'hemisferi nord. Multitud de cultivars han estat seleccionades per la seva facilitat de cultiu, colors i formes (Benschop et al., 2010). L'altra espècie (Fig. 8, esquerra) amb la que s'ha treballat és *Iris × hollandica* (ca,es: iris; en: *Dutch iris*), un híbrid d'*Iris* desenvolupat a partir d'espècies natives del Mediterrani Occidental (*Iris tingitana* × *Iris xiphium*) durant el segle XIX a Holanda (Dykes, 1913; Rodionenko, 1961). Gràcies a la seva robustesa i facilitat per ser forçat en cultiu en hivernacle durant tot l'any ha estat molt popular entre els productors i comercialitzadors de flor tallada (Benschop et al., 2010).

És difícil aplicar totes les tècniques bioquímiques i moleculars habitualment disponibles per l'investigador a flors d'interès comercial. No hi ha cap model que hagi concentrat l'interès, recursos i esforços d'un conjunt prou gran i divers d'investigadors per a generar els recursos (especialment bases de dades) que es poden trobar en estudiar altres processos fisiològics (Rogers, 2013). Per això s'ha estudiat la regulació de la senescència de dues varietats de *Lilium* (Fig. 8, esquerra) amb diferents—encara que comparables—patrons de senescència de tèpals: *Lilium longiflorum* cv. 'White Heaven', on els tèpals s'escindeixen després de deshidratar-se, i *Lilium* L.A. cv. 'Courier' (híbrid de *L. longiflorum* × Asiàtic), en el qual aquests s'escindeixen turgents i amb escassos signes visibles de senescència

(Lombardi et al., 2015). Aquestes diferències faciliten evidenciar com diferents patrons de senescència presenten diferents respostes a nivell hormonal, redox i transcripcional. D'aquesta manera, es podrien revelar mecanismes subjacents sense necessitat de generar mutants i/o transgènics que presentessin guany o pèrdua de funció.

Totes les varietats de *Lilium* i *Iris* presents en aquesta tesi són insensibles o molt poc sensibles a l'etilè (Woltering & Doorn, 1988; van Doorn, 2001; van Doorn & Han, 2011). De forma similar a la senescència foliar i la maduració de fruits, en moltes flors l'etilè juga un paper clau en la promoció de la senescència floral, presentant un important augment de la seva síntesi i sensibilitat a aquest associat a la inducció de la senescència floral. En absència de l'etilè com a inductor, altres hormones poden assumir un paper clau. Durant el transcurs de la senescència s'identifica un augment en els nivells de ABA (Tripathi & Tuteja, 2007; Arrom & Munné-Bosch, 2012a). En molts casos, l'aplicació d'ABA o inhibidors de la seva síntesi promou o inhibeix la senescència dels pètals (Tripathi & Tuteja, 2007; Rogers, 2012). Tractaments amb gibberel·lines, citocinines, jasmonats i salicilats estan associats amb una major longevitat de la flor tallada (van Doorn & Han, 2011; van Doorn et al., 2012), complementant les diferències en els nivells hormonals endògens observats a la flor sense tallar (Arrom & Munné-Bosch, 2012a). Les auxines poden retardar la progressió de la senescència o promoure-la en diferents varietats, probablement perquè estimulen la síntesi d'etilè (Rubinstein, 2000; Lombardi et al., 2015). Una recent revisió centrada en *Lilium* (van Doorn & Han, 2011) acumula evidències dels factors que afecten la flor tallada post-collita i el paper rellevant de la regulació hormonal i redox en la qualitat i longevitat de la flor. Una recent revisió centrada en *Lilium* (van Doorn & Han, 2011) acumula evidències dels factors que afecten la flor tallada post-collita i el paper rellevant de la regulació hormonal i redox en la qualitat i longevitat de la flor. Però també és generalment aplicable a *Iris* (Celikel & van Doorn, 1995; Bailly et al., 2001; Pak & van Doorn, 2005; van Doorn et al., 2012) i altres flors insensibles a etilè (Tripathi & Tuteja, 2007). Aquesta mateixa revisió identifica

llacunes en la comprensió d'aquests i altres factors de regulació de la senescència i senyala com l'acumulació de dades pel treball de diversos grups va acompanyada per una manca d'explicació dels mecanismes subjacents segurament dificultada per la diversitat fisiològica de la multitud de varietats de *Lilium* estudiades i la manca d'un bon model de flor insensible a l'etilè en la que es concentrin els esforços i recursos de l'acadèmia i l'empresa (van Doorn & Han, 2011; Rogers, 2013).

***Rubus idaeus* L. cv. Heritage**

Rubus idaeus L. (ca: gerd; es: *frambuesa*; en: *red raspberry*; Fig. 9) és una espècie de *Rubus* nativa d'Europa i Àsia, de la que s'han desenvolupat centenars de varietats com a cultiu perenne a regions temperades de tot el món. Entre els consumidors els fruits són especialment apreciats per les seves qualitats organolèptiques i nutricionals, especialment pel seu elevat contingut d'antioxidants i polifenols (Beekwilder et al., 2005a; Rao & Snyder, 2010).

Encara que l'exposició a l'etilè pot promoure l'estovament i abscisió del gerd, aquests no són climatèrics (Perkins-Veazie & Nonnecke, 1992; Perkins-Veazie, 1995), per tant la seva maduració pot ser regulada per altres fitohormones. Els gerds són una important font de compostos beneficiosos per la salut, especialment compostos antioxidants. Destaquen elevats nivells de dues classes de polifenols, antocianines i el·lagitanins (Mullen et al., 2002a; Beekwilder et al., 2005a); vitamina C (De Ancos et al., 2000; Krüger et al., 2011); carotenoides (Beekwilder et al., 2008); tocoferols (Beekwilder et al., 2005a; Beekwilder et al., 2008); i altres compostos del metabolisme secundari reconeguts com a especialment beneficiosos per la salut (Beekwilder et al., 2005a; Beekwilder et al., 2005b). El contingut de



Fig. 9. Imatge composta amb la successió d'estadis de desenvolupament i maduració definits per *Rubus idaeus* cv Heritage (Miret et al., 2016): D'esquerra a dreta: Green, White, Pink, Red, Dark Red.

compostos antioxidants en gerds és influenciat per l'estadi de maduració en el moment de la collita. Els gerds vermells són àmpliament consumits frescos, congelats, o processats com a gelatines, suc o melmelades (Rao & Snyder, 2010). Pel mercat fresc o congelat es recull el fruit vermell, ferm però que es comença a separar del receptacle. Però pel mercat processat pot ser més interessant el fruit una mica més madur, similar al que el consumidor pot trobar fresc a qualsevol botiga (Rao & Snyder, 2010); amb les limitacions imposades pels sistemes de recol·lecció. En qualsevol cas, el fruit fresc només pot ser emmagatzemat pocs dies a baixes temperatures (Mullen et al., 2002b; Rao & Snyder, 2010). Aquesta vida útil limitada fa encara més important l'estudi de la seva fisiologia i les dinàmiques de desenvolupament i maduració. I la comprensió dels processos d'acumulació de compostos beneficiosos per la salut i d'interès organolèptic que li donen el valor. Per d'aquesta manera, informar la data de la collita i les millors pràctiques pre- i post-collita.

En gerds, les antocianines augmenten amb la maduració del fruit, i la variació en els continguts d'aquests i altres polifenols en un ampli nombre de genotips, climes i condicions de cultiu han estat descrites (Beekwilder et al., 2005b; Wang et al., 2009; Rao & Snyder, 2010); en la majoria dels casos, la literatura descriu només el punt final de la maduració comercial. En canvi, ben poc ha estat descrit sobre l'evolució durant el desenvolupament i la maduració de carotenoides (provitamina A), vitamina C i vitamina E (Beekwilder et al., 2008; Krüger et al., 2011; Carvalho et al., 2013) i encara menys la seva relació amb reguladors del creixement. Els esforços per manipular la maduració i el contingut d'antioxidants en gerds han estat en la majoria de casos centrats en augmentar la capacitat antioxidant total o el contingut de certs flavonoides beneficiosos per la salut. Més enllà de la variació per genotip i/o clima, sobretot s'han enfocat en l'estudi de l'efecte de manipular les condicions de cultiu (Anttonen & Karjalainen, 2005; Neocleous & Vasilakakis, 2007; Remberg et al., 2010; Palonen et al., 2011; Jin et al., 2012; Remberg et al., 2012) o de diferents pràctiques post-collita, de manipulació i d'emmagatzematge (Kalt et al., 1999; De Ancos et al., 2000;

Introducció

Remberg et al., 2010; Krüger et al., 2011; Remberg et al., 2012; Mazur et al., 2014b; Mazur et al., 2014a). Aquesta recerca és activa i continuada amb diferents aproximacions, però sobretot ha estat centrada en els efectes sobre la producció, els compostos fenòlics bioactius i l'activitat antioxidant total (Finn & Mezzetti, 2016). Canvis en les condicions de cultiu que causin un estrès ambiental moderat són una tècnica emprada en millorar la qualitat nutricional sense comprometre la producció, però poden tenir un impacte en posteriors anys en plantes perennes com la gerdera (Lee & Kader, 2000; Wang & Frei, 2011).

Pocs estudis han valorat les possibilitats de manipular els nivells de reguladors del creixement en gerderes, tot i que és una de les pràctiques amb major potencial per millorar la qualitat nutricional i valor del fruit (Rademacher, 2015). Per exemple aplicant metil jasmonat just abans de la collita s'incrementen els continguts d'antioxidants, sucres i antocianines (Wang & Zheng, 2005); manipulant transgènicament la biosíntesi d'auxines en els òvuls per augmentar la fecunditat i la producció per planta (Mezzetti et al., 2004); o l'ús d'inhibidors de la síntesi de gibberel·lines per regular el balanç entre el creixement vegetatiu i el reproductiu, i reduir la mà d'obra necessària per mantenir el cultiu (Palonen et al., 2013).

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Aquesta tesi s'ha desenvolupat amb l'objectiu principal de millorar el coneixement sobre la senescència d'òrgans i processos associats (maduració de fruits), i la seva regulació hormonal i redox.

Per dur a terme l'objectiu principal es varen proposar els següents objectius específics:

- Avaluar els canvis de reguladors endògens (fitohormones, estrès oxidatiu) implicats en la senescència foliar post-collita de *Brassica oleracea*, la senescència floral post-collita de *Lilium* i *Iris*, i la maduració de fruits de *Rubus idaeus*.
- Avaluar la idoneïtat de diverses aproximacions metodològiques en l'estudi de processos dinàmics en plantes no model. Avaluar l'adequació de tècniques amb diferents requeriments de recursos i coneixements per l'estudi de diferents models i processos fisiològics.
- Determinar l'efecte d'aplicacions exògenes d'ABA i/o el seu agonista parcial pirabactina just després del quallat del fruit sobre la progressió del desenvolupament i la maduració dels fruits de *R. idaeus*, i sobre la senescència foliar post-collita a *B. oleracea*.
- Avaluar l'efecte d'aplicacions exògenes d'ABA i/o pirabactina sobre el contingut de vitamina C i E, i el seu estat redox al llarg de la senescència foliar a *B. oleracea* i la maduració de fruits de *R. idaeus*.
- Determinar l'efecte d'aplicacions exògenes d'ABA i/o el seu agonista parcial pirabactina sobre la regulació redox, hormonal i transcripcional de la senescència foliar a *B. oleracea*.
- Determinar el rol de la melatonina en la senescència floral, discernint la rellevància de les seves funcions antioxidant i hormonal. Determinar l'efecte de tractaments de melatonina en la senescència floral post-collita a varietats de *Lilium* amb diferents patrons de senescència.

**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESI SOBRE
L'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS I LA
PARTICIPACIÓ DEL DOCTORAND**



Barcelona, 4 d'abril de 2017

El Dr. Sergi Munné Bosch, com a director de la Tesi Doctoral titulada **“Regulació redox i hormonal de processos de senescència d'òrgans”** presentada pel doctorand Javier A. Miret Barrio,

INFORMA sobre el factor d'impacte i la participació del doctorand en cadascun dels articles inclosos en la memòria d'aquesta Tesi Doctoral.

Capítol 1. Article **“Application of a rapid and sensitive method for hormonal and vitamin E profiling reveals crucial regulatory mechanisms in flower senescence and fruit ripening”**, publicat a la revista *Journal of Plant Growth Regulation*, índex d'impacte (2015) de 2.166. En aquest treball es posa a punt un mètode d'extracció i anàlisi del perfil hormonal i de vitamina E en paral·lel per ésser aplicat a l'estudi de processos de senescència d'òrgans i maduració de fruits. El doctorand ha posat a punt els mètodes de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, per a les anàlisis de vitamina E) i cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses en tàndem (HPLC-LC/LS, per a les anàlisis del perfil hormonal), ha realitzat tots els mostrejos, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primer autor del treball. El doctorand ha demostrat una gran capacitat de treball, així com un excel·lent maneig en els mostrejos i en l'ús de l'HPLC i l'HPLC-MS/MS per a les anàlisis de vitamina E i perfil hormonal. El doctorand profunditza de forma molt eficient en les tècniques de cromatografia i espectrometria de masses utilitzades i coneix molt bé els detalls que determinen un

bon maneig d'aquestes tècniques al laboratori. El doctorand demostra també una gran capacitat d'anàlisi i interpretació dels resultats, així com un excel·lent maneig de les fonts bibliogràfiques i de les tècniques de redacció dels articles.

Capítol 2. Article “**Abscisic acid and pyrabactin improve vitamin C contents in raspberries**”, publicat a la revista *Food Chemistry*, índex d'impacte (2015) de 4.052. En aquest treball es combinen eines d'anàlisi d'hormones i antioxidants emprades en el capítol anterior, amb tècniques espectrofotomètriques per a les anàlisis d'activitats enzimàtiques, en aquest cas relacionades amb el metabolisme de la vitamina C. Cal destacar la importància de l'estudi respecte a la dificultat de treballar en una espècie de gran interès agroalimentari amb una aproximació fisiològica amb la finalitat de conèixer millor els processos bioquímics que determinen la millora dels continguts de vitamina C en resposta a l'aplicació d'ABA i pirabactina. Aquest estudi demostra per primer cop que aquests compostos poden ser molt útils per millorar els continguts de vitamina C en fruits no climatèrics. El doctorand ha realitzat tot el mostreig, les anàlisis de les mostres, el tractament estadístic i l'elaboració dels resultats, i a més ha participat en el disseny experimental i discussió dels resultats, constant per tant com a primer autor del treball. El doctorand ha demostrat una gran capacitat de treball, així com una excel·lent predisposició a la millora dels experiments realitzats. El doctorand destaca per la seva gran capacitat d'anàlisi, interpretació dels resultats i per la seva habilitat en la redacció de l'article, la qual cosa és un exemple de la seva maduresa científica.

Capítol 3. Article “**ABA signalling manipulation suppresses senescence of a leafy vegetable stored at room temperature**”, enviat a la revista *Plant Biotechnology Journal*, índex d'impacte (2015) de 6.090. En aquest treball es descriu, entre altres aspectes, la importància de l'ABA en el control de processos de senescència post-collita, en aquest cas en un model de gran interès agroalimentari com és la col (*Brassica oleracea*). Cal destacar l'aproximació

experimental, amb un caire molt més aplicat que en els anteriors capítols, molt original i amb un alt valor científic, incloent-hi un nivell de profunditat extraordinari, englobant aspectes no només bioquímics, sinó també moleculars. El doctorand ha realitzat tots els mostreigs i anàlisis de les mostres, ha realitzat el tractament estadístic i bioinformàtic dels resultats, i ha elaborat la seva discussió en col·laboració amb el Dr. Paul Dijkwel de la Universitat de Massey (Nova Zelanda), on va realitzar una estada per a les anàlisis moleculars. A més, el doctorand va participar molt activament en el disseny experimental, constant per tant com a primer autor del treball. Degut a la gran maduresa científica del doctorand se l'invita en aquest cas a actuar com a autor de correspondència de l'article, en representació dels dos laboratoris on s'ha realitzat el treball, feina que fa amb gran dedicació i professionalitat. El doctorand fa palesa un cop més la seva gran maduresa científica amb la culminació d'aquest excel·lent treball.

I, per a què així consti als efectes oportuns,

Dr. Sergi Munné Bosch

RESULTATS



CAPÍTOL 1

**L'APLICACIÓ D'UN MÈTODE RÀPID I
SENSIBLE PER L'ANÀLISI DE PERFILS
HORMONALS I DE VITAMINA E REVELA
MECANISMES CRUCIALS DE REGULACIÓ
DE SENESCÈNCIA FLORAL I MADURACIÓ
DE FRUITS**

CAPÍTOL 1: L'aplicació d'un mètode ràpid i sensible per l'anàlisi de perfils hormonals i de vitamina E revela mecanismes crucials de regulació de senescència floral i maduració de fruits

Chapter 1. Application of a rapid and sensitive method for hormonal and vitamin E profiling reveals crucial regulatory mechanisms in flower senescence and fruit ripening

Javier A Miret, Jana Cela, Laís A Bezerra, Laia Arrom, Marta Juvany, Maren Müller, Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

Publicat a *Journal of Plant Growth Regulation* 2014, 33: 34–43

RESUM DEL CAPÍTOL 1

El coneixement sobre la maduració de fruits i la regulació de processos de senescència post-collita constitueix una eina molt important per prevenir la pèrdua de valor comercial en els mercats del fruit i la flor tallada. L'anàlisi combinat del perfil hormonal i els nivells de vitamina E pot revelar complexes interaccions entre fitohormones i estrès oxidatiu com a reguladors clau dels processos de senescència i maduració. Es van caracteritzar els perfils d'ambdós grups de metabòlits durant la maduració de fruits no climatèrics (gerd, *Rubus idaeus* L.) i la senescència de flors insensibles a l'etilè (*Dutch iris*, *Iris x hollandica* L.). Després d'una extracció inicial de la mostra, i sense passos addicionals de purificació, el perfil hormonal va ser analitzat per UPLC-MS/MS i els nivells de vitamina E per HPLC. Aquesta aproximació metodològica va ser molt ràpida i proporcionava prou sensibilitat per l'anàlisi d'un gran ventall de compostos a partir de mostres petites. La maduració de gerds va ser caracteritzada per una disminució dels nivells de citocinines [*t*-zeatina, ribòsid de *t*-zeatina, 2-isopentenil adenina, isopentenil adenosina (Z, ZR, 2-iP, i IPA, respectivament)] i gibberel·lines (GA₁ en particular). L'aplicació exògena d'ABA va prevenir la pèrdua de δ-tocoferol durant la maduració. La senescència floral d'*Iris* també es trobà sota estricte control hormonal, també mediat per citocinines i gibberel·lines. Els nivells de Z, ZR, 2-iP, GA₉, i GA₂₄ van disminuir als tèpals interns, mentre el nivell d'IPA va minvar a l'òrgan "estil fusionat a estigma" (S+S), suggerint funcions específiques de teixit per les diferents hormones. Els nivells d'α-tocoferol van minvar durant la senescència dels tèpals interns, suggerint un increment de l'estrès oxidatiu. En conclusió, la ràpida i sensible caracterització del perfil hormonal i de vitamina E pot ajudar a la comprensió dels processos fisiològics claus en la maduració de fruits i la senescència floral, permetent decisions informades per optimitzar la selecció i maneig de cultius.

Application of a Rapid and Sensitive Method for Hormonal and Vitamin E Profiling Reveals Crucial Regulatory Mechanisms in Flower Senescence and Fruit Ripening

Javier A. Miret · Jana Cela · Laís A. Bezerra ·
Laia Arrom · Marta Juvany · Maren Müller ·
Sergi Munné-Bosch

Received: 15 August 2013 / Accepted: 16 August 2013 / Published online: 28 September 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Knowledge of ripeness and regulation of post-harvest processes is an important tool to prevent loss of commercial value in both fruit and cut flower markets. The joint analysis of hormones and vitamin E levels can reveal complex interactions between hormones and oxidative stress as key regulators of postharvest processes. Profiling of both groups of metabolic compounds was performed during the ripening of non-climacteric fruits (red raspberry, *Rubus idaeus* L.) and senescence of ethylene-insensitive flowers (Dutch Iris, *Iris x hollandica* L.). After an initial extraction of the sample, without further purification steps, the hormonal profile was analyzed by UPLC-MS/MS and vitamin E levels were measured by HPLC. This methodological approach was very fast and had enough sensitivity for the analysis of small samples. Raspberry fruit maturation was characterized by a decline of cytokinin levels [zeatin, zeatin riboside, 2-isopentenyl adenine, and isopentenyl adenosine (Z, ZR, 2-iP, and IPA, respectively)] and gibberellins (GA₁ in particular). Exogenous application of ABA prevented δ -tocopherol loss during fruit ripening. *Iris* floral senescence was also under strict hormonal control, also mediated by cytokinins and gibberellins. Z, ZR, 2-iP, GA₉, and GA₂₄ levels decreased in inner tepals, whereas the level of IPA

decreased in style-merged-to-stigma tissues, thus suggesting tissue-specific roles for different hormones. α -Tocopherol levels decreased during senescence of inner tepals, hence suggesting enhanced oxidative stress. In conclusion, the rapid and sensitive hormonal and vitamin E profiling presented here can help in understanding the key physiological processes underlying fruit ripening and floral senescence.

Keywords Ethylene-insensitive · Flower senescence · Fruit ripening · Hormonal profile · Non-climacteric fruits · Vitamin E

Introduction

Postharvest biology processes are of great interest because of the commercial value of raw and processed agricultural and horticultural products. Furthermore, increased global population during the last few decades has been accompanied by a rapid rise in horticultural crop production, including the production of ornamental plants and flowers (Dehnen-Schmutz and others 2010; Lawson 1996). By 2050, the world's population is expected to reach 9 billion people. The Food and Agriculture Organization has estimated that the global demand for food will increase by 70 %, accompanied by limited water, energy, and land sources (FAO 2011). In this scenario, solutions to post-harvest losses require an integrated and innovative approach, especially in developing countries where high postharvest losses (up to 50 %) are accompanied by low agricultural productivity (Kader 2005). Reducing postharvest losses is an important tool for protecting actual production levels without the potential side effects of more intensive agricultural practices (Evenson and Gollin 2003; Tilman and others 2002). Thus, knowledge of the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00344-013-9375-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. A. Miret · J. Cela · L. A. Bezerra · L. Arrom · M. Juvany ·
M. Müller · S. Munné-Bosch (✉)
Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028
Barcelona, Spain
e-mail: smunne@ub.edu

regulation of postharvest processes can help to better understand and minimize these losses.

One of the most important causes of postharvest losses in horticultural production, in both volume and quality, is the lack of knowledge about fruit-ripening processes. Fruits are divided into climacteric or non-climacteric based on physiological differences in their ripening. Climacteric fruits are very well characterized in physiological terms, showing a peak in ethylene production and respiratory activity at the onset of ripening (Adams-Phillips and others 2004). Less is known about the regulation of ripening in non-climacteric fruits like citrus, grape, or strawberry—the most studied non-climacteric models (Aharoni and others 2002; Jia and others 2011; Pilati and others 2007; Symons and others 2012; Talon and others 1998). These fruits do not exhibit a peak in respiration, although a rise in ethylene is sometimes observed (Burdon and Sexton 1990; Chervin and others 2004; Jiang and Joyce 2003). Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) is an important commercial crop due to consumers' appreciation of the taste and nutritional value of its fruits. Despite the fact that ethylene promotes fruit softening and abscission, raspberries are non-climacteric (Perkins-Veazie and Nonnecke 1992) and ripening may be governed by phytohormones other than ethylene. It has been suggested that in non-climacteric fruits the balance between abscisic acid (ABA) and indole-3-acetic acid (IAA) is the key signal regulating fruit ripening (Archbold and Dennis 1984; Perkins-Veazie 1995). IAA levels are high in the early growth phases of the maturing fruit but diminish in later stages, antagonistically to ABA, which accumulates at the onset of ripening (Symons and others 2012). Raspberries are one of the richest dietary sources of antioxidants (Beekwilder and others 2005a; Kähkönen and others 2001; Rao and Snyder 2010), with important levels of two classes of health-promoting polyphenols, anthocyanins and ellagitannins (Beekwilder and others 2005b), vitamin C (De Ancos and others 2000), carotenoids (Beekwilder and others 2008), and vitamin E (Beekwilder and others 2005a). Red raspberries are widely consumed fresh, frozen, or in processed forms such as jellies, jams, and juices (Rao and Snyder 2010). For the fresh market, raspberries are usually harvested when bright-red and can be stored for only a few days at low temperatures (Mullen and others 2002). The content of different antioxidant compounds in red raspberry fruits is influenced by the stage of ripeness at the time of harvest. Only in the late stages, when the red fruit fully matures, do anthocyanins sharply increase (Beekwilder and others 2005b; Wang and Lin 2000; Wang and others 2009). However, little is known about the evolution of the contents of carotenoids and vitamin E throughout the ripening process of raspberries (Beekwilder and others 2008) and even less if this correlates with changes in the endogenous concentrations of

hormones. Efforts to manipulate antioxidant levels of raspberry fruits have been concentrated in postharvest treatments and storage (De Ancos and others 2000; Kalt and others 1999; Krüger and others 2011; Mullen and others 2002); few studies have analyzed the possibilities of manipulating growth conditions (Anttonen and Karjalainen 2005; Neocleous and Vasilakakis 2007; Remberg and others 2010) or the application and manipulation of plant growth regulators (PGRs) (Mezzetti and others 2004; Wang and Zheng 2005).

Another important horticultural market is the cut flower industry. In this market flower senescence is a great concern because it limits product shelf-life. Flower senescence leads to death of floral tissues throughout an ordered and highly programmed process involving, among others, a complex regulation by different classes of hormones. Ethylene plays a crucial role in flower senescence of many species (ethylene-sensitive; for example, carnation, rose) but is not (or slightly) involved in others (ethylene-insensitive; for example, *Iris*, tulip, lilies) (van Doorn 2001; Woltering and van Doorn 2009). Cytokinins, GAs, jasmonates, and ABA seem to be involved in petal senescence of ethylene-insensitive flowers (van Doorn and Woltering 2008). However, the role of different classes of cytokinins or GAs in different floral tissues has been poorly investigated thus far. In addition, flower senescence is usually accompanied by oxidative stress, which involves both increases in reactive oxygen species (ROS) levels and decreases in antioxidants (reviewed by Rogers 2012, 2013). The tight control of floral senescence leads to a marked temporal order of deterioration of floral pieces. In this way, petals (or tepals) are the first floral tissue to start the senescence process, which also marks the end of commercial flower longevity, whereas the gynoecium (and more specifically the ovary) does not senesce. In *Iris* flowers, senescence can be visually recognized by inward tepal rolling (from the tip to the center of the flower) and loss of water content and color (withering). Treatment with cytokinins or jasmonates (Macnish and others 2010; Van Doorn and others 2012) or with protease inhibitors (Pak and van Doorn 2005) significantly delayed *Iris* floral senescence. However, exogenous antioxidants did not significantly affect flower life span (Celikel and van Doorn 1995).

In this study the analysis of hormonal and vitamin E profiling was used to unravel key target molecules that regulate postharvest biology processes by using two case studies: floral senescence and fruit ripening. Requiring a minimum quantity of material and performing hormonal and vitamin E profiling in series, we aimed to characterize common regulatory metabolites in both physiological processes. Furthermore, we evaluated the possible effect of ABA treatment on vitamin E composition during raspberry fruit ripening.

Materials and Methods

Plant Material and Treatments

Experiment 1

Fruits from 2-year-old plants of ‘Heritage’ raspberries were harvested on 21 and 28 December 2011. Twenty raspberry plants had been purchased from a nursery (Ejea de los Caballeros, Spain) and grown in pots containing a mixture of peat:perlite:vermiculite (1:1:1 v/v/v) in a

greenhouse at the experimental fields of the Faculty of Biology of the University of Barcelona (Spain), at controlled temperature (24/18 °C, day/night) and irrigated with half Hoagland solution every day (Hoagland and Arnon 1950). Raspberry bushes were sprayed monthly with recommended fungicides and acaricides on a preventative schedule (Gleason and others 1990). Fruits were collected at different ripening stages, defined according to a subjective assessment of berry color as green, pink, and red (see Fig. 1a, adapted from Perkins-Veazie and Nonnecke 1992).

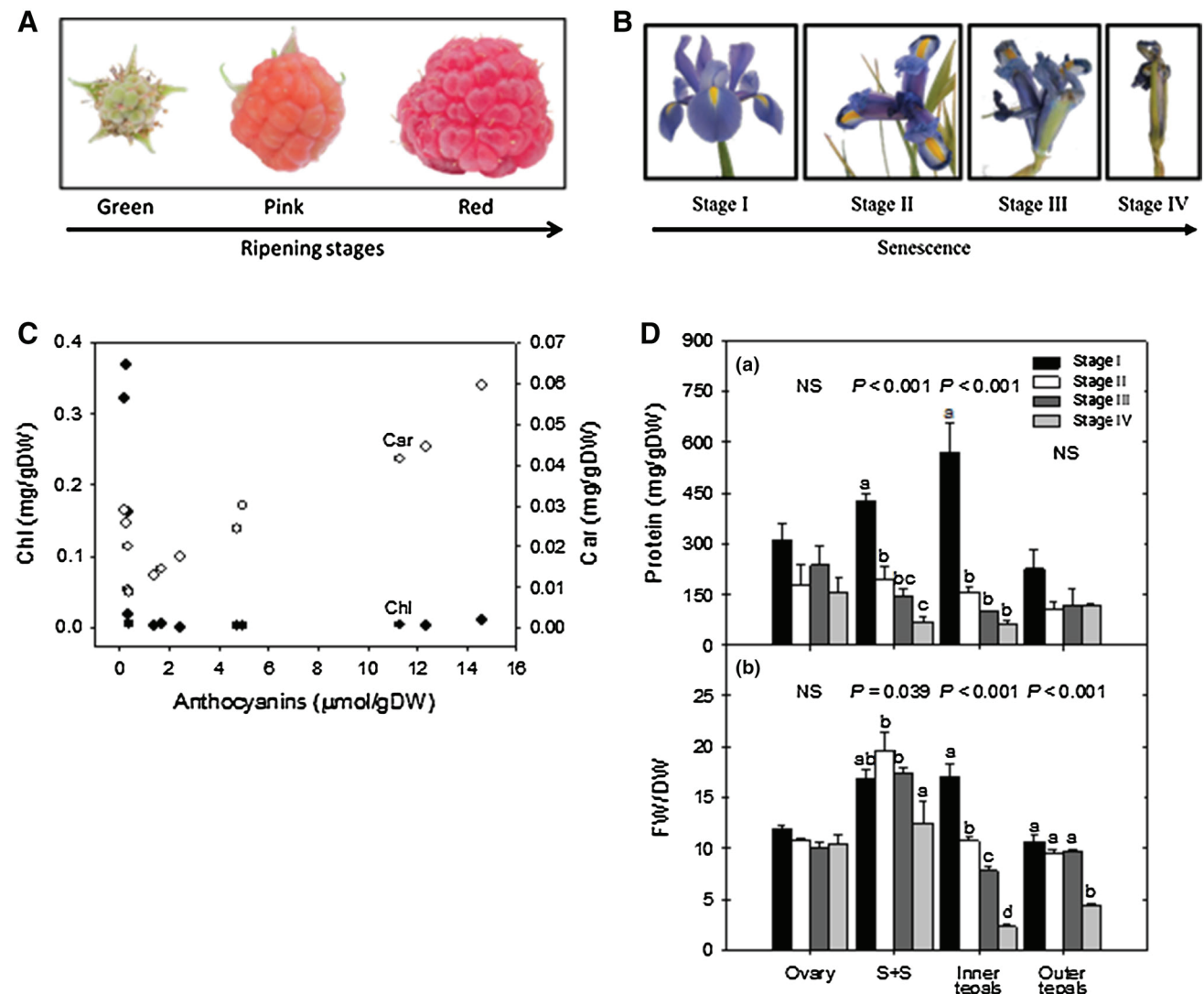


Fig. 1 Selected fruit ripening stages in *Rubus idaeus* (green, pink, and red) (a) and dispersion plot between anthocyanins and chlorophyll *a+b* (Chl) and total carotenoids (Car) during fruit ripening (b). Stage green corresponds to small and green fruit, stage pink to onset of ripening, and stage red to commercial ripe fruit. Floral developmental stages in *Iris x hollandica* cv. Telstar (c) and typical total protein and water loss (d). Chronologically, stage I corresponds to anthesis (full bloom), stage II shows the first signs of senescence (inward rolling in outer and inner tepals), stage III is advanced

senescence (forward tepal inward rolling), and stage IV shows complete senescence (closed flower). Measurements were performed on several floral tissues, including the ovary, style merged to stigma tissue (S+S), and inner and outer tepals. Data correspond to the mean ± SE of *n* = 4. Results of statistics are shown in the insets (ANOVA, *P* ≤ 0.05), and letters indicate differences between stages of development (Duncan test, *P* ≤ 0.05). NS, not significant (Color figure online)

Experiment II

Fruits from the same plants (collected between 22 and 27 June 2012) were used to evaluate the effects of exogenous ABA on pigment and antioxidant contents (chlorophyll, carotenoid, anthocyanin, and vitamin E). Green fruits were treated with 10^{-5} M 2-*cis*, 4-*trans*-ABA [dissolved in 0.5 % DMSO (dimethylsulfoxide) 0.1 % Tween-20 v/v] and compared to controls (with 0.5 % DMSO 0.1 % Tween-20 v/v only). The different treatments were applied once to fruits at the start of the green stage (small green fruits, after fruit-set) with a brush (about 200 μ L of solution was applied to each berry). Application was done at dawn to prevent photodestruction of ABA (Zaharia and others 2005). Fruits were marked and samples taken at the pink and red stages. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

For experiments I and II, fruits were cut with intact receptacle and pedicel to minimize wounding and were immediately frozen in liquid nitrogen. The fruits were subsequently stored at -80 °C until biochemical analyses. Only the drupelets (neither the pedicel nor the receptacle) were considered for analysis.

Experiment III

Pretreated (80 days at 9 °C) bulbs of Dutch iris flowers (*Iris x hollandica* cv. Telstar) were obtained from Mapi-floricultura S.L. (Madrid, Spain) and planted in the soil (Calcic Luvisol, FAO classification) of a PVC-made greenhouse (a polytunnel) with a planting density of 240 bulbs m^{-2} at the experimental fields of the Faculty of Biology of the University of Barcelona on 26 November 2008. Plants were watered with tap water once a week during the entire experiment. During the study, predawn air temperature and relative humidity ranged from 6.3 to 15.2 °C and 53–71 %, respectively. The study started on 13 March 2009, when most flowers reached anthesis (stage I).

For the study of flower senescence, developmental stages were chronologically described as stage I, flower at anthesis; stage II, first signs of inward rolling of the tepal from the apex; stage III, clear flower senescence (further inward rolling and appreciable tepal wilting and whitening); and stage IV, closed flower (loss of ornamental value) (see Fig. 1c). At each stage, floral tissues were separately sampled, including the ovary, outer tepals, inner tepals, and tepal-like style branches fused to stigmatic surfaces [called S+S (Weberling 1989)]. Samplings were carried out on 13 March (stage I), 18 March (stages II and III), or 25 March 2009 (stage IV). All sampled flowers were taken between 8:30 and 9:30 a.m. (UTC/GMT +1), and floral tissues were

immediately used for fresh weight or frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for biochemical analyses.

Physiological Indicators

Experiments I and II

For extraction of photosynthetic pigments, freeze-dried samples were ground with the mixer mill MM400 (Retsch GmbH, Haan, Germany) and repeatedly extracted with ice cold methanol (4 °C) using ultrasonication (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) for 40 min. Chlorophyll, carotenoid, and anthocyanin levels were measured spectrophotometrically as described elsewhere (Lichtenthaler and Wellburn 1983; Siegelman and Hendricks 1958).

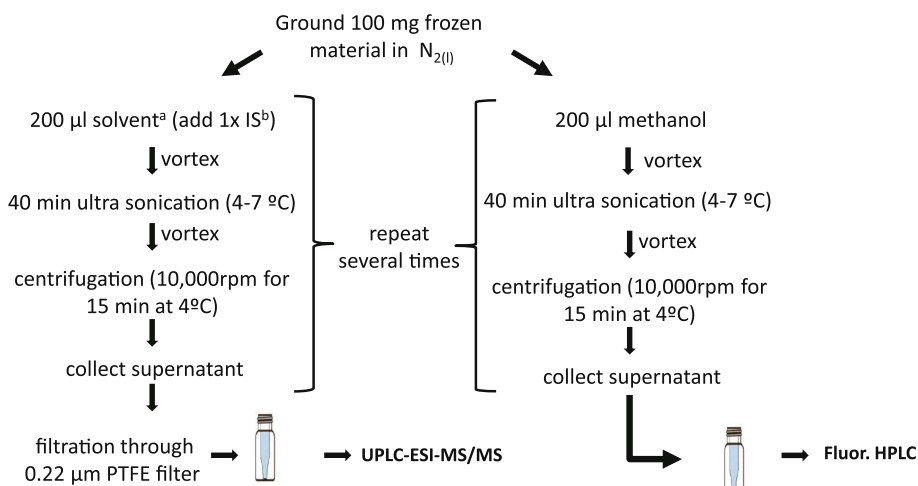
Experiment III

Protein concentration was determined as previously described by Bradford (1976). Briefly, 50 mg of sample was ground in liquid nitrogen and extracted twice with 1 mL 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 0.1 % Triton X-100. After centrifugation (10 min at 10,000 rpm, 4 °C), the supernatants were combined and 50 μ L was mixed with 1.5 mL of Bradford reagent (Sigma-Aldrich) to spectrophotometrically estimate total protein contents (absorbance at 595 nm). Bovine serum albumin was used as the standard. Water contents of all floral tissues were measured by weighing samples before and after drying to a constant weight at 65 °C.

Hormonal and Vitamin E Profiling

The extraction of phytohormones and vitamin E and profiling were performed in series as follows (Fig. 2). One hundred milligrams of tissue was ground with the mixer mill MM400 (Retsch GmbH) and separated in two Eppendorf tubes. To the first tube (for hormonal profiling), 200 μ L of methanol:isopropanol:acetic acid 20:79:1 (v/v/v) and internal standards (IS) [d_4 -SA, d_6 -ABA, d_5 -JA, d_5 -IAA, d_2 -GA₁, d_2 -GA₄, d_2 -GA₉, d_2 -GA₁₉, d_2 -GA₂₀, d_2 -GA₂₄, d_6 -2iP, d_6 -IPA, d_5 -Z, and d_5 -ZR (d_5 -Z and d_5 -ZR were also used as IS for DHZ and DHZR, respectively)] were added. To the second tube (for vitamin E profiling), 200 μ L of methanol was added. From here and until analyses, both tubes followed the same procedure for extraction. Extraction was achieved by repeated vortexing and ultrasonication (Branson 2510 ultrasonic cleaner) for 40 min. The procedure was repeated several times until extracts were colorless. After centrifugation, the collected supernatants were merged and two separate methods were used for analyses.

Fig. 2 Summary of the extraction protocols and analysis for phytohormone and vitamin E profiling in small amounts of plant material using UPLC/ESI-MS/MS and HPLC. ^aMethanol:isopropanol:acetic acid 20:79:1 (v/v/v). ^bDeuterated hormones (see “Materials and Methods” section for details)



For hormone profiling, supernatants were filtered through a 0.22- μm PTFE filter (Waters, Milford, MA, USA) before injection into the UPLC-MS/MS. The UPLC system consisted of an Aquity UPLCTM System (Waters) quaternary pump equipped with an autosampler. A HALOTM C18 column (2.1 \times 75 mm, 2.7 μm) (Advanced Materials Technology Inc., Wilmington, DE, USA) was used. Solvent A was water and 0.05 % glacial acetic acid and solvent B was acetonitrile with 0.05 % glacial acetic acid. The flow rate was set at 0.6 mL min⁻¹. Cytokinins (including zeatin [Z], zeatin riboside [ZR], isopentenyl adenosine [IPA], 2-isopentenyl adenine [2-iP], dihydrozeatin [DHZ], and dihydrozeatin riboside [DHZR]) were analyzed using method 1 (M1); and gibberellins (including GA₁, G₄, GA₉, GA₁₉, GA₂₀, and GA₂₄), ABA, jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), and IAA were analyzed using method 2 (M2). The gradient profiles were as follows [*t* (min), % A]: (0, 99), (2, 0), (2.40, 0), (2.60, 99), (3, 99) for M1 and (0, 99), (2.20, 0), (2.40, 0), (2.60, 99), (3, 99) for M2. MS and MS/MS experiments were performed on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (PE Sciex, Concord, ON, Canada). Analyses for M1 were performed using a Turbo Ionspray source in positive ion mode, and for M2 analyses were performed in negative ion mode. For both methods, the temperature was set at 400 °C and nebulizer, curtain, and collision gas (N₂) were set at 10, 12, and 4 (arbitrary units), respectively. Capillary voltage was 3.5 kV for M1 and -3.5 kV for M2. Quantification was made considering recovery rates for each sample by using deuterated standards (described before). Unlabeled IPA, Z, ZR, IAA, ABA, JA, and SA were purchased from Sigma-Aldrich. Unlabeled 2iP, DHZ, and DHZR and deuterium-labeled d₆-IPA, d₅-Z, d₅-ZR, d₅-IAA, d₆-ABA, d₄-SA, d₅-JA, and d₆-2iP were acquired from OlChemim Ltd (Olomouc, Czech Republic). Unlabeled and deuterium-labeled gibberellins were purchased

from Dr. Lewis Mander at the Australian National University (Canberra, Australia).

For vitamin E profiling, supernatants were injected directly into the isocratic HPLC system. This consisted of a PU-2089 Plus pump, an AS-2055 Plus autosampler, and a FP-1520 fluorescence detector (Jasco, Tokyo, Japan). Vitamin E compounds (α -, β -, γ -, and δ -tocopherols and tocotrienols) were separated on an Ultrabase 5 Si column [3.0 \times 250 mm, 5 μm (Akady, Barcelona, Spain)]. The solvent was *n*-hexane:1,4-dioxane (95.5:4.5 v/v) at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. Quantification was based on fluorescence signal (excitation at 295 nm, emission at 330 nm) using a calibration curve prepared with authentic standards for each of the eight compounds obtained from Sigma-Aldrich.

Statistical Analyses

Analysis of variance (ANOVA) was performed using the Duncan post-hoc test to examine statistical differences across stages and/or treatments. Differences were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. In experiment I, a two-tailed Pearson test was applied to determine correlations between the contents of pigments, antioxidants, and hormones. All analyses were conducted using SPSS v.18 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results and Discussion

Phytohormones are structurally diverse compounds that are usually present at nanomolar levels. Hormone actions build a signaling network and mutually regulate several signaling and metabolic systems in a complex cross-talk. Furthermore, these signaling cascades act in concert with that of ROS and antioxidants to modulate both plant stress responses and key developmental processes, including

senescence (as reviewed by Schippers and others 2007). Vitamin E is a lipophilic antioxidant with an important role in lipid metabolism (Mehrshahi and others 2013) and a good indicator of oxidative stress in senescence processes (Arrom and Munné-Bosch 2010). The methodological approach presented here provided fast, precise, and sensitive hormonal and vitamin E profiling of fruit ripening and flower senescence. Extraction of up to 60–80 samples was completed in a morning. Autosamplers allowed performance of hormone analysis in 7–8 h and vitamin E determination in 30–40 h. Raw data from hormone determination required more time to quantify and analyze the results obtained. In approximately a working week (5 days) 16 hormones and the 8 compounds of vitamin E can be extracted and quantified. With very little additional work (2–3 h), the methanol extract was also used to spectrophotometrically quantify plant pigments (chlorophylls, carotenoids, and anthocyanins).

Raspberry fruit maturation was characterized by a decline of chlorophyll (Chl) content during the first stages of ripening—from green to pink—remaining at low concentrations at later stages (Supplementary Fig. 1). The chlorophyll *alb* ratio (Chl *alb*) followed the same pattern. Anthocyanin levels increased steadily through the analyzed ripening stages to reach concentrations up to 12.7 $\mu\text{mol/g}$ DW at the red stage. Carotenoid levels increased only later, between the pink and red stage (Supplementary Fig. 1). The accumulation of anthocyanins was well correlated with increasing levels of carotenoids ($R = 0.897$; $P < 0.001$), whereas anthocyanin contents correlated with tocopherol levels (Supplementary Table 1). Variable concentrations of α -, γ -, and δ -tocopherol were measured through raspberry ripening, without major changes between stages. γ -Tocopherol was the most abundant vitamin E form at all stages and α -tocopherol was the least (Supplementary Fig. 1). Through fruit maturation γ -tocopherol represented from 77 (green) to 65 % (red) of vitamin E contents, while α -tocopherol relative content doubled from 7 to 15 %. β -Tocopherol was detected at non-quantifiable concentrations, whereas no tocotrienol was detected in any sample.

The endogenous levels of cytokinins, including zeatin, zeatin riboside, 2-isopentenyl adenine, and isopentenyl adenosine, decreased between green and pink stages and positively correlated with chlorophyll levels (Fig. 3; Supplementary Fig. 2), whereas levels of DHZ and its riboside (DHZR) were not significantly altered. The most abundant cytokinin forms at all stages were free DHZ and the ribosides DHZR and ZR. ABA levels increased while auxin (IAA) levels tended to decrease through the analyzed stages, although these changes were not significant. JA and SA concentrations decreased before the pink stage to stay at levels similar to those at the red stage (Supplementary Fig. 2). Total gibberellin content dramatically decreased

between the green and pink stages, mostly due to a decrease in the contents of GA_1 (Fig. 3; Supplementary Table 2). Furthermore, ABA levels, which tended to accumulate at later stages of fruit ripening (from pink to red) positively correlated with carotenoid and anthocyanin accumulation. The application of exogenous ABA did not cause significant differences in chlorophyll, carotenoid, or anthocyanin contents (Fig. 4). However, application of ABA prevented δ -tocopherol loss during fruit ripening (Fig. 4). α -Tocopherol usually is considered the most nutritionally valuable form of vitamin E because it has the highest affinity with α -TTP (α -tocopherol transport protein) (Hosomi and others 1997), differentially favoring α -tocopherol transport and preventing its degradation (Schuelke and others 2000). Despite this, there is evidence that other vitamin E forms can play new roles in plants, animals, and humans (Brigelius-Flohé 2009; Falk and Munné-Bosch 2010; Tan and others 2012).

The first visual signs of senescence in *Iris* tepaloid tissues is visually determined as inward rolling of the tissue, first in inner tepals, shortly after in outer tepals, and thereafter on the stigmatic surface of the S+S tissue (Fig. 1). Results showed that both outer tepals and tepal-like styles, but particularly inner tepals, displayed strong protein degradation during senescence, whereas wilting is more apparent on inner tepals, particularly at the early stages of senescence (Fig. 1). Major changes in endogenous hormones were found in inner tepals, but significant variations were also found in outer tepals and the ovary. In regard to cytokinins, major changes were found in inner tepals, showing significant decreases of Z, ZR, and 2-iP (Fig. 5). On the other hand, IPA levels remained constant in all tepal-like tissues throughout *Iris* floral senescence, with S+S as the only exception; its levels decreased in stage II and then remained stable (Supplementary Fig. 3). Likewise, IAA levels also did not show significant variations in any tissue or stage of floral development; its levels decreased only at stage II in inner tepals. On the other hand, ABA, JA, and SA contents were significantly reduced in senescing inner tepals. Outer tepals also presented significant decreases in SA contents, but only at the latest stage of development (Fig. 5; Supplementary Fig. 3). The gynoecium also showed significant endogenous ABA, JA, and SA variations. Although GA_1 , GA_{19} , and GA_{20} were also analyzed, only GA_4 , GA_9 , and GA_{24} were found during *Iris* floral senescence. Indeed, significant changes in gibberellin contents were found only in inner tepals, showing decreases in both GA_9 and GA_{24} just after anthesis (Supplementary Fig. 4).

Both α - and β -tocopherol, and also β -tocotrienol, were identified in all the analyzed floral tissues of *Iris* senescing flowers, at least at anthesis. However, significant variations during senescence were observed only for α -tocopherol in

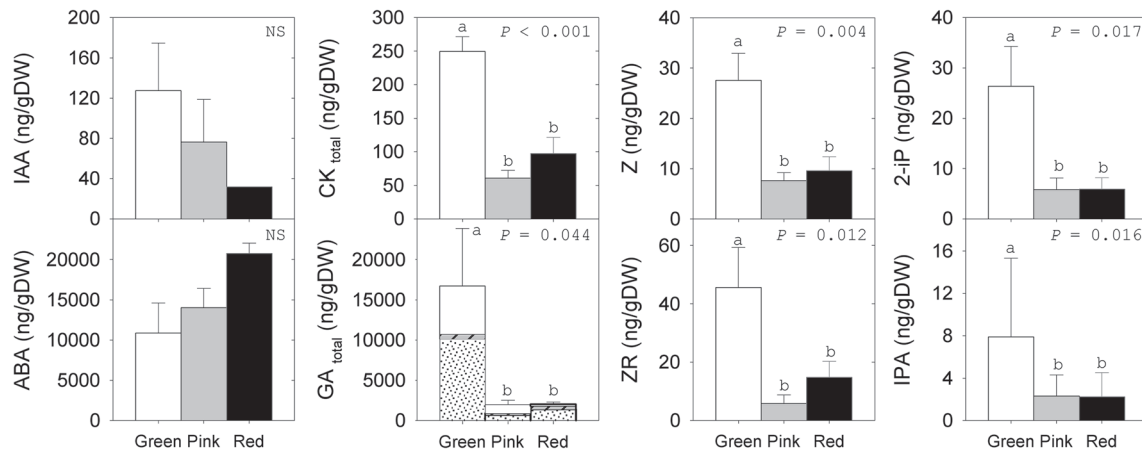


Fig. 3 Endogenous contents of indole-3-acetic acid (IAA), abscisic acid (ABA), total cytokinins (CK_{total}), including zeatin (Z), zeatin riboside (ZR), 2-isopentenyl adenine (2-iP), and isopentenyl adenosine (IPA), and total gibberellins (GA_{total}), including the active GA₁ (empty), GA₄ (shaded), and the sum of other GAs (GA₉, GA₁₉, GA₂₀,

and GA₂₄, dotted bars), of raspberry fruits through three ripening stages (green, pink, and red). Data represent the mean ± SE of *n* = 4. One-way ANOVA *P* values are shown in the inlets (significance at *P* ≤ 0.05), letters indicate differences between stages of development (Duncan test, *P* ≤ 0.05). NS not significant

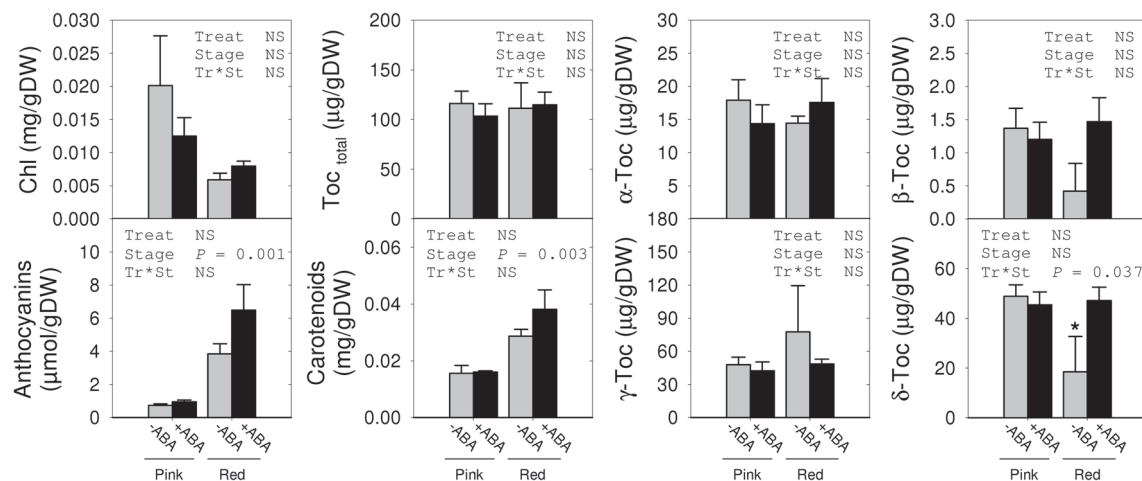


Fig. 4 Contents of chlorophyll *a+b* (Chl), total carotenoids and anthocyanins, total tocopherols (Toc_{total}), α -tocopherol (α -Toc), β -tocopherol (β -Toc), γ -tocopherol (γ -Toc), and δ -tocopherol (δ -Toc) of raspberry fruits at two ripening stages (pink and red) after treatment with ABA at the start of the green stage. Data represent the

mean ± SE of *n* = 4. Two-way ANOVA *P* values are shown in the inlets (significance at *P* ≤ 0.05), letters indicate differences between stages of development (Duncan test, *P* ≤ 0.05). NS not significant. Tocotrienols were not detected in raspberry fruits

inner tepals, which showed a reduction in α -tocopherol content just after anthesis (Fig. 5). α -Tocopherol affords protection to membranes mainly by quenching and scavenging singlet oxygen and reacting with lipid peroxy radicals, which helps maintain membrane stability and reduce the extent of lipid peroxidation (Kamal-Eldin and Appelqvist 1996; Maeda and DellaPenna 2007). Therefore, α -tocopherol loss in inner tepals during senescence may be indicative of oxidative stress. Because α -tocopherol is also involved in the regulation of fatty acid desaturases (Mehrshahi and others 2013), α -tocopherol loss in inner tepals during senescence may also be related to changes in lipid metabolism during flower senescence. Interestingly, both β -tocopherol and β -tocotrienol were also identified in all *Iris* floral tissues.

However, in both cases, significant amounts were detected only in the ovary at anthesis (Fig. 5). To our knowledge, this is the first report of any tocotrienol form in flowers. Thus, although no specific roles for tocotrienols in floral tissues have been described yet, there is growing evidence that their slight structural differences might confer them unique physiological functions in both plants and animals (nutritionally), different from that of tocopherols (Müller and others 2012; Tan and others 2012). Further research is needed to better understand the role of tocopherols and tocotrienols in floral pieces beyond their role as antioxidants.

In summary, cytokinins and gibberellins have been described as the best PGRs in delaying flower senescence. In this way, commercial mixtures (for example, Promalin®)

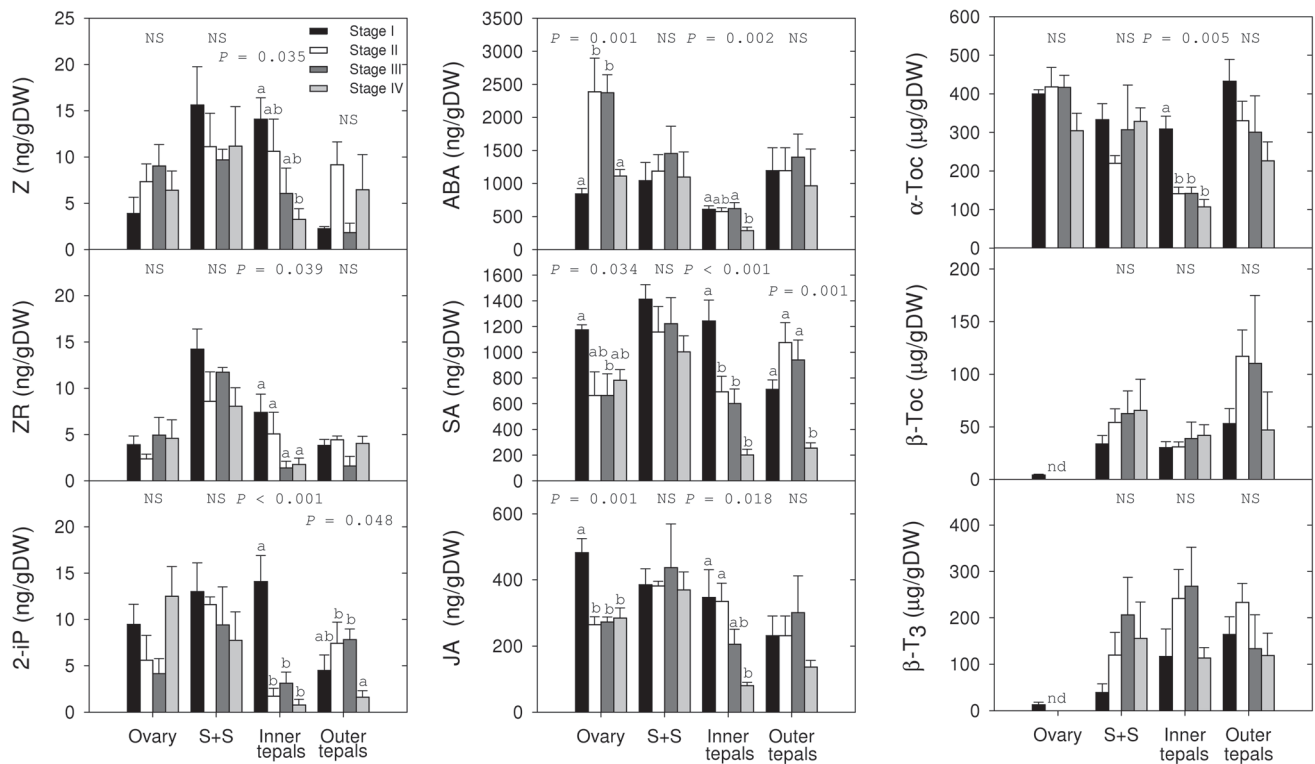


Fig. 5 Endogenous contents of the cytokinins, zeatin (Z), zeatin riboside (ZR), 2-isopentenyl adenine (2-iP), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), α -tocopherol, β -tocopherol, and β -tocotrienol (β -T₃) in ovary, style merged to stigma tissue (S+S), inner tepals and outer tepals throughout floral senescence of

Iris x hollandica cv. Telstar. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 4$. The *inlets* show results of statistics (ANOVA, $P \leq 0.05$) and *letters* indicate differences between developmental stages (Duncan test, $P \leq 0.05$). *NS* not significant. For details of developmental stages, see Fig. 2

of gibberellins (GA₄₊₇) and synthetic cytokinins (benzyladenine) are successfully used to significantly extend the vase-life of several cut flowers. When applied alone, cytokinins exert a significant delaying effect on flower senescence in both ethylene-sensitive and -insensitive species (reviewed by van Doorn and Woltering 2008). Likewise, exogenous gibberellins act as delayers of senescence in ethylene-sensitive species [possibly through modulating ABA (Rogers 2012)] but also in ethylene-insensitive flowers (Tripathi and Tuteja 2007; van Doorn and Woltering 2008). However, the effectiveness of treatments depends largely on the specific cytokinin and gibberellin used in each study. Thus, the gibberellin means of action might vary depending on the species in a manner that has not been reported yet. In *Iris*, both cytokinins and gibberellins decreased during senescence. However, because major changes in zeatin, zeatin riboside, and 2-isopentenyl adenine were shown in inner tepals in particular, and changes in isopentenyl adenoside occurred in S+S tissue only, it is suggested that there is a different role for specific cytokinins in each floral tissue during senescence. The results obtained here with metabolite profiling, in this case for hormones, is of particular interest because

they can provide important cues for the development of new products with hints of the specific cytokinins and gibberellins with potential for extending vase-life. Interestingly, levels of cytokinins and gibberellins also decreased during the early stages of fruit ripening, in parallel with chlorophyll loss in raspberries, thus indicating that these two groups of plant hormones play a crucial regulatory role in inhibiting ripening and senescence of non-climacteric fruits and ethylene-insensitive flowers, respectively.

Conclusions

We presented a rapid, sensitive, high-throughput and cost-effective scheme that combined methods for quantification of 16 endogenous hormones from 7 phytohormone classes and 8 vitamin E compounds. This approach requires minimal plant tissue, is highly reproducible, and has been successfully applied for the analysis of dynamic changes in endogenous concentrations of hormones and vitamin E in complex physiological processes like fruit ripening and flower senescence. Furthermore, this approach is equally applicable

to fresh, frozen, or freeze-dried tissue and can be easily adapted to a wide range of plant species and tissues. This study showed that this can be a pertinent approach to selectively identify specific metabolites involved in the regulation of postharvest and other processes of high economic value.

Acknowledgments This work was supported by the prize ICREA Academia given to SMB, funded by the Generalitat de Catalunya. JAM holds a FPU fellowship from the Spanish Government. We are very grateful to Serveis de Camps Experimentals and Serveis Científic-tècnics (University of Barcelona) for technical assistance.

References

- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J (2004) Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci* 9:331–338
- Aharoni A, Keizer LCP, Broeck HCVD et al (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiol* 129:1019–1031
- Anttonen MJ, Karjalainen RO (2005) Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *J Food Compos Anal* 18:759–769
- Archbold D, Dennis F (1984) Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *J Am Soc Hortic Sci* 109:330–335
- Arrom L, Munné-Bosch S (2010) Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence. *Plant Sci* 179:289–295
- Beekwilder J, Hall RD, Ric Vos CHD (2005a) Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. *BioFactors* 23:197–205
- Beekwilder J, Jonker H, Meesters P et al (2005b) Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J Agric Food Chem* 53:3313–3320
- Beekwilder J, van der Meer IM, Simic A et al (2008) Metabolism of carotenoids and apocarotenoids during ripening of raspberry fruit. *BioFactors* 34:57–66
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brigelius-Flohé R (2009) Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Rad Biol Med* 46:543–554
- Burdon JN, Sexton R (1990) The role of ethylene in the shedding of red raspberry fruit. *Ann Bot* 66:111–120
- Celikel FG, van Doorn WG (1995) Solute leakage, lipid peroxidation, and protein degradation during the senescence of *Iris* tepals. *Physiol Plant* 94:515–521
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan J-P et al (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci* 167:1301–1305
- De Ancos B, Gonzalez EM, Cano MP (2000) Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J Agric Food Chem* 48:4565–4570
- Dehnen-Schmutz K, Holdenrieder O, Jeger MJ, Pautasso M (2010) Structural change in the international horticultural industry: some implications for plant health. *Sci Hortic* 125:1–15
- Evenson RE, Gollin D (2003) Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science* 300:758–762
- Falk J, Munné-Bosch S (2010) Tocochromanols functions in plants: antioxidation and beyond. *J Exp Bot* 61:1549–1566
- FAO (2011) The state of the world's land and water resources for food and agriculture. A summary report. Rome, United Nations Food and Agriculture Organization
- Gleason M, Lewis D, Nonnecke G, Hatterman-Valenti H (1990) Iowa commercial small fruit spray guide. Iowa State Coop Ext Serv Bull Pm 1375
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp Sta Circ* 347
- Hosomi A, Arita M, Sato Y et al (1997) Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 409:105–108
- Jia HF, Chai YM, Li CL et al (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol* 157:188–199
- Jiang Y, Joyce DC (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regul* 39:171–174
- Kader AA (2005) Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce. *Acta Hortic* 682:2169–2176
- Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M (2001) Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 49:4076–4082
- Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL (1999) Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J Agric Food Chem* 47:4638–4644
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LÅ (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31:671–701
- Krüger E, Dietrich H, Schöppl E et al (2011) Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. *Postharvest Biol Technol* 60:31–37
- Lawson RH (1996) Economic importance and trends in ornamental horticulture. *Acta Hortic* 432:226–237
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11:591–592
- Macnish AJ, Jiang CZ, Reid MS (2010) Treatment with thidiazuron improves opening and vase life of iris flowers. *Postharvest Biol Technol* 56:77–84
- Maeda H, DellaPenna D (2007) Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Curr Opin Plant Biol* 10:260–265
- Mehrshahi P, Stefano G, Andaloro JM, Brandizzi F, Froehlich JE, DellaPenna D (2013) Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:12126–12131
- Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A (2004) The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol* 4:4
- Mullen W, Stewart AJ, Lean MEJ et al (2002) Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem* 50:5197–5201
- Müller M, Cela J, Asensi-Fabado MA, Munné-Bosch S (2012) Tocotrienols in plants: occurrence, biosynthesis and function. In: Tan B, Watson RR, Preedy VR (eds) *Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, pp 1–16
- Neocleous D, Vasilakakis M (2007) Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. “Autumn Bliss”). *Sci Hortic* 112:282–289
- Pak C, van Doorn WG (2005) Delay of *Iris* flower senescence by protease inhibitors. *New Phytol* 165:473–480
- Perkins-Veazie P (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Hortic Rev* 17:267–297
- Perkins-Veazie P, Nonnecke G (1992) Physiological changes during ripening of raspberry fruit. *HortScience* 27:331–333
- Pilati S, Perazzolli M, Malossini A et al (2007) Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set

- of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BMC Genomics* 8:428
- Rao AV, Snyder DM (2010) Raspberries and human health: a review. *J Agric Food Chem* 58:3871–3883
- Remberg SF, Sørenstebj A, Aaby K, Heide OM (2010) Influence of postflowering temperature on fruit size and chemical composition of glen ample raspberry (*Rubus idaeus* L.). *J Agric Food Chem* 58:9120–9128
- Rogers HJ (2012) Is there an important role for reactive oxygen species and redox regulation during floral senescence? *Plant, Cell Environ* 35:217–233
- Rogers HJ (2013) From models to ornamentals: how is flower senescence regulated? *Plant Mol Biol* 82(6):563–574
- Schippers JHM, Jing HC, Hille J, Dijkwel PP (2007) Developmental and hormonal control of leaf senescence. In: Gan S (ed) *Senescence processes in plants*, 2nd edn. Blackwell, Oxford, pp 145–170
- Schuelke M, Elsner A, Finckh B et al (2000) Urinary alpha-tocopherol metabolites in alpha-tocopherol transfer protein-deficient patients. *J Lipid Res* 41:1543–1551
- Siegelman HW, Hendricks SB (1958) Photocontrol of alcohol, aldehyde, and anthocyanin production in apple skin. *Plant Physiol* 33:409–413
- Symons GM, Chua YJ, Ross JJ et al (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J Exp Bot* 63:4741–4750
- Talon M, Tadeo FR, Ben-Cheikh W et al (1998) Hormonal regulation of fruit set and abscission in *Citrus*: classical concepts and new evidence. *Acta Hort* 463:209–218
- Tan B, Watson RR, Preedy VR (2012) *Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA et al (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671–677
- Tripathi SK, Tuteja N (2007) Integrated signaling in flower senescence: an overview. *Plant Signal Behav* 2:437–445
- Van Doorn WG (2001) Categories of petal senescence and abscission: a re-evaluation. *Ann Bot* 87:447–456
- Van Doorn WG, Woltering EJ (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. *J Exp Bot* 59:453–480
- Van Doorn WG, Çelikel FG, Pak C, Harkema H (2012) Delay of *Iris* flower senescence by cytokinins and jasmonates. *Physiol Plant* 148:105–120
- Wang SY, Lin HS (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem* 48:140–146
- Wang SY, Zheng W (2005) Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. *Int J Food Sci Technol* 40:187–195
- Wang SY, Chen CT, Wang CY (2009) The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chem* 112:676–684
- Weberling F (1989) *Morphology of flowers and inflorescences*. Cambridge University Press, Cambridge
- Woltering EJ, van Doorn W (2009) Petal senescence: new concepts for ageing cells. *Acta Hort* 847:161–170
- Zaharia LI, Walker-Simmon MK, Rodríguez CN, Abrams SR (2005) Chemistry of abscisic acid, abscisic acid catabolites and analogs. *J Plant Growth Regul* 24:274–284

FOR ONLINE PUBLICATION ONLY

Supplemental Table 1 Pearson correlation between pigments, anthocyanins and tocopherols contents throughout the ripening of raspberry fruits ($n = 13$).

	Chl	Chl <i>a/b</i>	Car	Car/Chl	Ant	Ant/Chl	α -Toc	γ -Toc	δ -Toc	Toc _{total}
Chl	-									
Chl <i>a/b</i>	0.555	-								
Car	-0.006	-0.371	-							
Car/Chl	-0.590*	-0.783**	0.444	-						
Ant	-0.414	-0.577*	0.897**	0.661*	-					
Ant/Chl	-0.487	-0.730**	0.642*	0.925**	0.828**	-				
α -Toc	-0.535	-0.072	0.325	0.080	0.481	0.147	-			
γ -Toc	0.387	0.452	0.010	-0.640*	-0.193	-0.543	0.375	-		
δ -Toc	-0.607*	-0.020	-0.339	-0.198	-0.086	-0.278	0.728**	0.282	-	
Toc _{total}	0.102	0.346	-0.008	-0.553	-0.094	-0.479	0.628*	0.943**	0.566	-

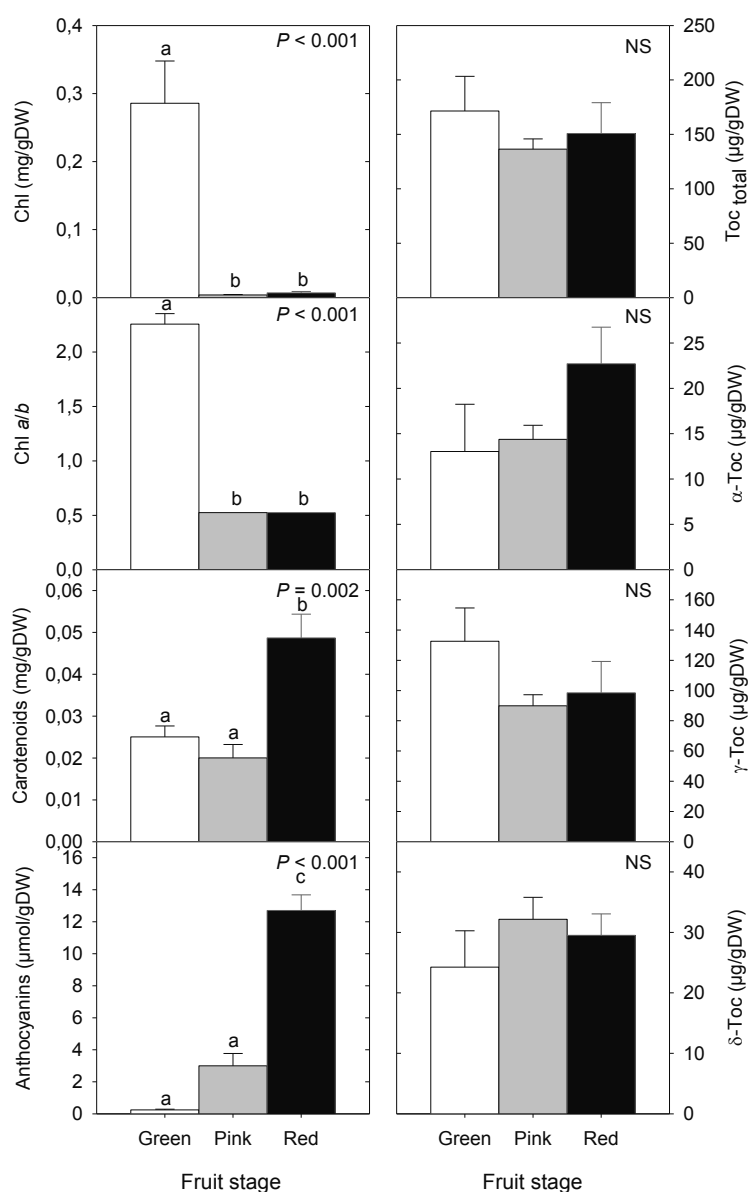
Chlorophyll (Chl), chlorophyll *a/b* ratio (Chl *a/b*), carotenoids (Car), anthocyanins (Ant), α -tocopherol (α -Toc), γ -tocopherol (γ -Toc), δ -tocopherol (δ -Toc), total tocopherols (Toc_{total}) and some ratios between them are shown. An asterisk indicates correlation significance at $P \leq 0.05$ level (2-tailed); two asterisks indicate correlation significance at $P \leq 0.01$ level (2-tailed).

Supplemental Table 2 Pearson correlation between analyzed hormones and pigments, anthocyanins and tocopherols contents throughout the ripening of raspberry fruits ($n = 13$).

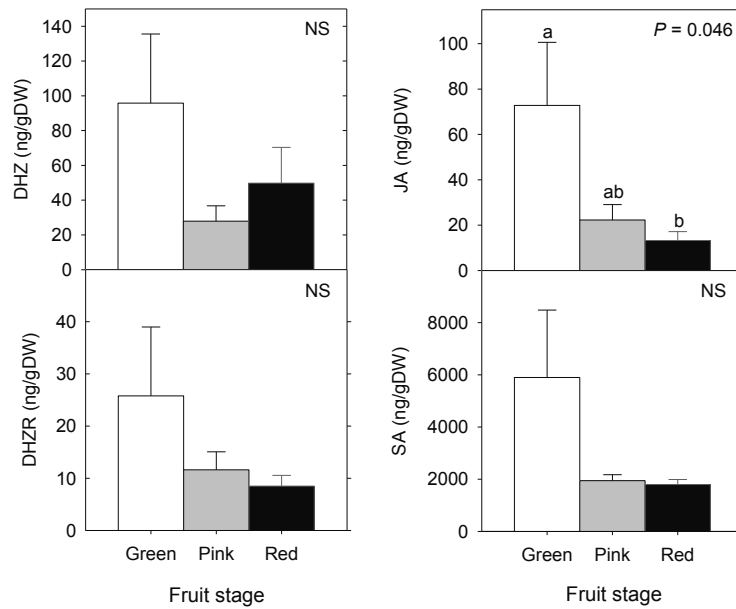
	Chl	Chl <i>a/b</i>	Car	Car/Chl	Ant	Ant/Chl	α -Toc	γ -Toc	δ -Toc	Toc _{total}
Z	0,682*	0,382	0,009	-0,316	-0,270	-0,228	-0,178	0,461	-0,352	0,268
ZR	0,828**	0,364	0,180	-0,466	-0,155	-0,327	-0,238	0,674*	-0,429	0,430
DHZ	0,381	0,351	0,124	-0,364	-0,097	-0,228	0,141	0,406	-0,062	0,333
DHZR	0,712*	0,150	-0,083	-0,344	-0,310	-0,295	-0,558	0,264	-0,481	0,030
2-iP	0,876**	0,366	0,026	-0,399	-0,319	-0,369	-0,426	0,451	-0,525	0,197
IPA	0,664*	0,404	0,073	-0,472	-0,284	-0,384	-0,193	0,436	-0,351	0,236
CK _{total}	0,797**	0,408	0,210	-0,417	-0,156	-0,269	-0,211	0,556	-0,475	0,314
IAA	0,310	0,497	-0,506	-0,663	-0,604	-0,645	-0,310	-0,199	-0,034	-0,237
ABA	-0,363	-0,570	0,666*	0,778**	0,741**	0,799**	0,414	-0,093	-0,088	-0,027
JA	0,854**	0,471	-0,147	-0,536	-0,480	-0,478	-0,739**	-0,009	-0,704*	-0,275
SA	0,866**	0,269	0,062	-0,341	-0,264	-0,266	-0,647*	0,219	-0,678*	-0,061
GA ₄	0,384	0,002	0,523	-0,019	0,322	0,139	0,275	0,611*	-0,248	0,460

Correlations between analyzed hormones (see Abbreviation list) and chlorophyll (Chl), chlorophyll *a/b* ratio (Chl *a/b*), carotenoids (Car), anthocyanins (Ant), α -tocopherol (α -Toc), γ -tocopherol (γ -Toc), δ -tocopherol (δ -Toc), total tocopherols (Toc_{total}) and some ratios between them. An asterisk indicates correlation significance at $P \leq 0.05$ level (2-tailed); two asterisks indicate correlation significance at $P \leq 0.01$ level (2-tailed).

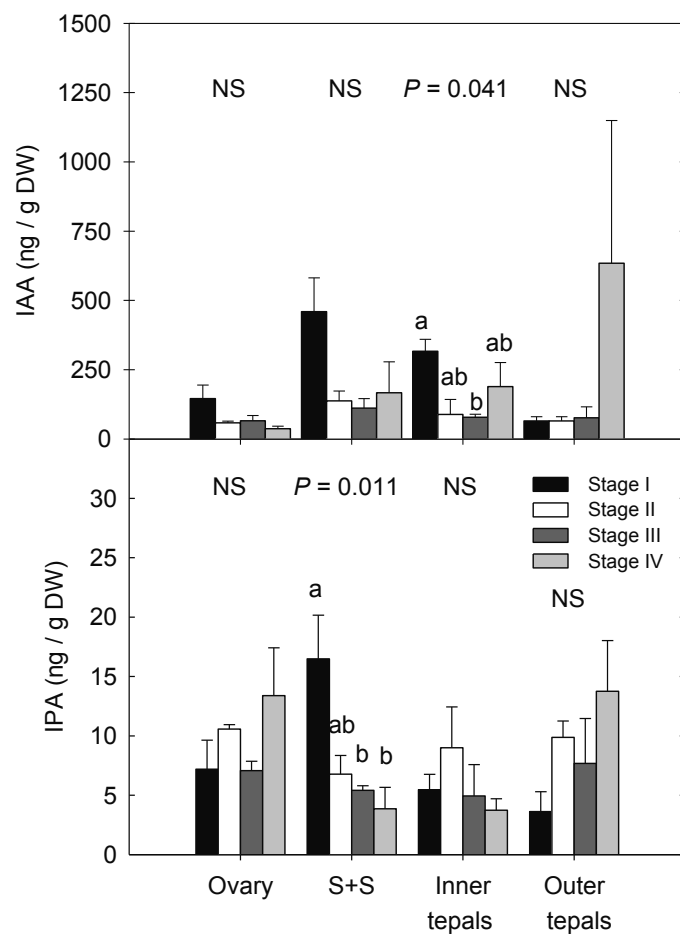
Supplemental Fig. 1 Contents of chlorophyll (Chl), chlorophyll *a/b* ratio (Chl *a/b*), carotenoids (Car), anthocyanins (*left*), total tocopherols (Toc_{total}), α -tocopherol (α -Toc), γ -tocopherol (γ -Toc) and δ -tocopherol (δ -Toc) of raspberry fruits at three ripening stages (Green, Pink and Red). β -tocopherol was not detected in any of the samples. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 4$. Values from the same variable followed by the same letter are not different at $P \leq .5$ according to Duncan post-hoc test.



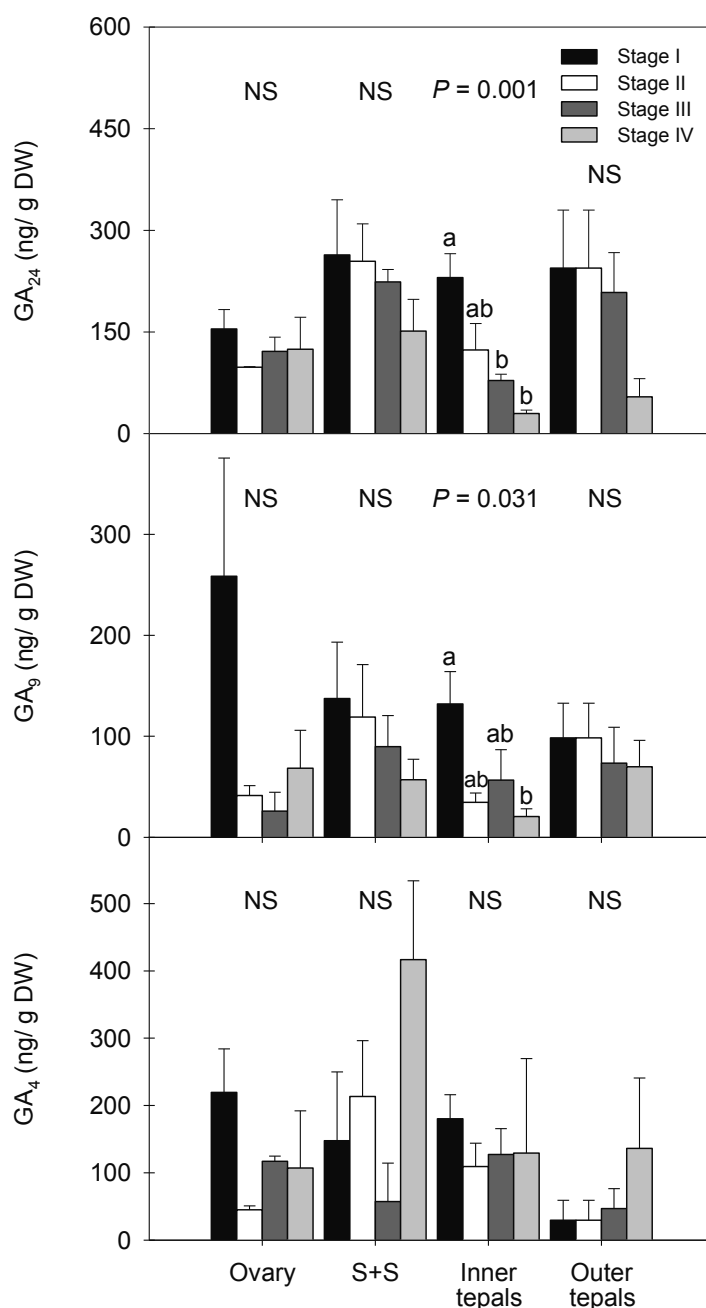
Supplemental Fig. 2 Contents of total dihydrozeatin (DHZ), dihydrozeatin riboside (DHZR), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) of raspberry fruits at three ripening stages (Green, Pink and Red). Data represent the mean \pm SE of $n = 4$. Values from the same variable followed by the same letter are not different at $P \leq 0.05$ according to Duncan post-hoc test.



Supplemental Fig. 3 Contents of indole-3-acetic acid (IAA) and isopentenyladenosine (IPA) in ovary, style merged to stigma tissue (S+S), inner tepals and outer tepals throughout floral senescence of *Iris x hollandica* cv. Telstar. Data correspond to the mean \pm SE of $n = 4$. The inlets show results of statistics (ANOVA, $P \leq 0.05$) and letters indicate differences between developmental stages (Duncan test, $P \leq 0.05$). NS, not significant. For details of developmental stages, see Fig. 2. Values from the same variable followed by the same letter are not different at $P \leq 0.05$ according to Duncan post-hoc test.



Supplemental Fig. 4 Contents of GA₂₄, GA₉ and GA₄ in ovary, style merged to stigma tissue (S+S), inner tepals and outer tepals throughout floral senescence of *Iris x hollandica* cv. Telstar. Data correspond to the mean ± SE of *n* = 4. The insets show results of statistics (ANOVA, *P* ≤ 0.05) and letters indicate differences between developmental stages (Duncan test, *P* ≤ 0.05). NS, not significant. For details of developmental stages, see Fig. 2. Values from the same variable followed by the same letter are not different at *P* ≤ 0.05 according to Duncan post-hoc test.





CAPÍTOL 2

L'ÀCID ABSCÍSIC I LA PIRABACTINA MILLOREN EL CONTINGUT DE VITAMINA C EN GERDS

CAPÍTOL 2: L'àcid abscísic i la pirabactina milloren el contingut de vitamina C en gerds

Chapter 2. Abscisic acid and pyrabactin improve vitamin C contents in raspberries

Javier A Miret, Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

Publicat a Food Chemistry 2016, 203: 216–223

RESUM DEL CAPÍTOL 2

L'àcid abscísic (ABA) és una fitohormona amb funcions rellevants en senescència, maduració de fruits i respostes a estressos ambientals. Es van estudiar els efectes de l'ABA i la pirabactina (*pyrabactin*, un agonista parcial no fotosensible de l'ABA) en el desenvolupament i maduració del gerd (*Rubus idaeus* L.), amb èmfasi en els seus efectes en la composició de vitamines i antioxidants. L'aplicació d'ABA i/o pirabactina just després del quallat del fruit (*fruit set*) no va tenir efectes en els patrons temporals de desenvolupament i maduració. Tampoc va modificar el contingut de provitamina A (carotenoides) ni vitamina E (tocoferols). En canvi, ABA i pirabactina van modificar l'estat redox de la vitamina C a les primeres fases del desenvolupament i varen més que doblar el contingut de vitamina C al final de la maduració. Aquests canvis van ser parcialment explicats per canvis en l'oxidació i reciclatge de l'ascorbat. Així doncs, aplicacions d'ABA i pirabactina poden usar-se per incrementar el contingut de vitamina C de fruits madurs, augmentant la qualitat del fruit i el seu valor. No obstant això, els tractaments que contenen pirabactina—combinat amb ABA o per si sola—disminuïen el contingut de proteïnes, limitant parcialment la seva aplicabilitat.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Abscisic acid and pyrabactin improve vitamin C contents in raspberries



Javier A. Miret, Sergi Munné-Bosch*

Departament de Biologia Vegetal, Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2015
 Received in revised form 4 February 2016
 Accepted 5 February 2016
 Available online 6 February 2016

Chemical compounds studied in this article:

Abscisic acid (PubChem CID: 5280896)
 Ascorbic acid (PubChem CID: 54670067)
 Dehydroascorbic acid (PubChem CID: 440667)
 Hydrogen peroxide (PubChem CID: 784)
 Pyrabactin (PubChem CID: 1125790)
 alpha-Tocopherol (PubChem CID: 14985)
 delta-Tocopherol (PubChem CID: 92094)

Keywords:

Abscisic acid
 Antioxidants
 Fruit ripening
 Dehydroascorbate
 Tocopherol
 Enzymatic activity
Rubus idaeus

ABSTRACT

Abscisic acid (ABA) is a plant growth regulator with roles in senescence, fruit ripening and environmental stress responses. ABA and pyrabactin (a non-photosensitive ABA agonist) effects on red raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit development (including ripening) were studied, with a focus on vitamin and antioxidant composition. Application of ABA and/or pyrabactin just after fruit set did not affect the temporal pattern of fruit development and ripening; neither provitamin A (carotenoids) nor vitamin E contents were modified. In contrast, ABA and pyrabactin altered the vitamin C redox state at early stages of fruit development and more than doubled vitamin C contents at the end of fruit ripening. These were partially explained by changes in ascorbate oxidation and recycling. Therefore, ABA and pyrabactin applications may be used to increase vitamin C content of ripe fruits, increasing fruit quality and value. However, treatments containing pyrabactin—combined with ABA or alone—diminished protein content, thus partially limiting its potential applicability.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Climacteric fruits are well characterized in physiological terms, showing a peak in ethylene production and a respiratory burst at the onset of ripening (Seymour, Østergaard, Chapman, Knapp, & Martin, 2013) regulating the development of the traits associated with ripe fleshy fruits: (i) change of color due to alteration of chlorophyll, carotenoid, and/or anthocyanin contents; (ii) modification of texture via alteration of cell turgor and cell wall structure and/or metabolism; (iii) import, accumulation and modification of sugars, acids, and volatiles that determine nutritional quality, flavor, and aroma; and (iv) enhanced susceptibility to opportunistic pathogens and herbivores (Seymour et al., 2013; Symons et al., 2012). Less is known about ripening regulation in non-climacteric fruits and its association with ripening traits. These fleshy fruits sometimes present a rise in ethylene levels, but do not exhibit a respiratory peak (Perkins-Veazie & Nonnecke, 1992).

Without ethylene as the key signal regulating fruit ripening, evidence has accumulated that the balance between abscisic acid (ABA) and indole-3-acetic acid (IAA) plays this role in non-climacteric fruits (Seymour et al., 2013). IAA levels are high in the early growth and expansion phases of the developing fruit but decrease in later ripening stages, antagonistically to ABA, accumulated from the onset of ripening to later stages (Seymour et al., 2013; Symons et al., 2012). ABA contents and signaling are strictly regulated all through fruit development and ripening (Romero, Lafuente, & Rodrigo, 2012; Symons et al., 2012), with very low ABA levels at the start of fruit development that sharply rise as fruit ripens, especially after the onset of fruit ripening. Conserving the capacity to synthesize and perceive ABA is essential for a proper fruit ripening (Chai, Jia, Li, Dong, & Shen, 2011; Jia et al., 2011). And so forth, it is widely suggested that ABA plays an important role in the regulation of the rate of fruit ripening in non-climacteric fruits, with disturbs on ABA metabolism or perception representing a great impact on the associated fruit characteristics (Chai et al., 2011; Romero et al., 2012; Setha, 2012; Seymour et al., 2013; Zhang, Yuan, & Leng, 2009).

* Corresponding author.

E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

Vitamins are a group of organic compounds that are absolutely required in the human diet and the major source in most diets are vegetables and fruits. Notably, vitamin C (ascorbate) contents in fruits are high but very variable and especially sensitive to pre- and post-harvest conditions (Lee & Kader, 2000). Due to its importance in health and fruit quality, it is important to understand the evolution of vitamin C contents through its production and losses during fruit development and ripening. The study of vitamin C dynamics throughout fruit developing and ripening may help in establishing harvest dates in order to maximize the amount of vitamin C in fruits, thus improving its quality and value. To the best of our knowledge there are no previous studies of vitamin C contents throughout the development and ripening of raspberry fruits.

Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) is an important commercial crop due to its rich nutritional value and organoleptic characteristics. Despite the fact that ethylene partially promotes fruit softening and abscission, raspberries are non-climacteric (Perkins-Veazie & Nonnecke, 1992). Raspberries are a valuable source of phytochemicals, notably antioxidants (Beekwilder, Hall, & Ric Vos, 2005; Rao & Snyder, 2010), with important contents of two classes of health-promoting polyphenols—anthocyanins and ellagitannins (Beekwilder et al., 2005)—vitamin C (De Ancos, Gonzalez, & Cano, 2000), carotenoids (Beekwilder et al., 2008), vitamin E (Beekwilder et al., 2005) and various secondary metabolites (Beekwilder et al., 2005). The content of different antioxidant compounds in red raspberry fruits is influenced by the stage of ripeness at the time of the harvest. Raspberries are usually harvested once fully ripe and the berry starts to detach from the receptacle, and they can only be stored for a few days and at low temperatures (Rao & Snyder, 2010). This limited shelf-life stresses the importance of understanding its physiology and the dynamics of their valued phytochemicals throughout its development and ripening to select the best harvest date.

Variations in phenolic contents are well described in a number of raspberry varieties and growth conditions; only in the late stages when the red fruit fully matures, anthocyanins sharply increase (Beekwilder et al., 2005). However, little has been described about the evolution of carotenoids (provitamin A), vitamin C and vitamin E contents throughout ripening in raspberries (Beekwilder et al., 2008; Krüger, Dietrich, Schöpplein, Rasim, & Kürbel, 2011); and even less if these might be associated or not with plant growth regulators (Miret et al., 2014). The efforts to manipulate antioxidant and vitamin levels of raspberry fruits—almost always focused in flavonoids and antioxidant activity—have been concentrated in postharvest and storage practices (De Ancos et al., 2000; Krüger et al., 2011); a number of studies have analyzed the possibilities of manipulating growth conditions (Anttonen & Karjalainen, 2005; Neocleous & Vasilakakis, 2007); while only a few explore the potential of plant growth regulators, i.e.: with the application of methyl jasmonate before harvest (Wang & Zheng, 2005) or manipulating auxins biosynthesis (Mezzetti, Landi, Pandolfini, & Spena, 2004).

Understanding the physiology and biochemical basis of vitamin and antioxidant contents throughout fruit development and ripening is necessary to help in selecting the best harvest time and to prevent loss of nutritional and commercial value at harvest and postharvest. The aim of the present study was the evaluation of the potential effects of ABA applications just after fruit set on fruit quality, with a focus on antioxidants and vitamins. We extended this approach to pyrabactin, a non-photosensitive ABA agonist with great agronomic potential. Pyrabactin is a non-photosensitive partial ABA agonist and antagonist (Park et al., 2009). Apart from mimicking and blocking ABA signals, it has been proven to be effective in modulating stomatal closure (Puli & Raghavendra, 2012) as well as leaf and flower senescence (Arrom

& Munné-Bosch, 2012a, 2012b) but its potential effects in fruit ripening are still unknown.

2. Material and methods

2.1. Plant material and treatments

Fruits from 2-year-old plants of cv. 'Heritage' raspberries were harvested between the 22th and 27th of June 2012. Twenty raspberry plants were purchased from a nursery (Ejea de los Caballeros, Spain) and grown in pots containing a mixture of peat:perlite:vermiculite (1:1:1, v/v/v) in a greenhouse at the experimental fields of the Faculty of Biology at the University of Barcelona (NE Spain) with controlled temperature (24/18 °C, day/night) and irrigated with half Hoagland solution every day. Raspberry bushes were sprayed monthly with recommended fungicides and acaricides on a preventive schedule. Green fruits (one or two days after fruit set) were treated with 10^{-5} M ABA (dissolved in 0.5% dimethyl sulfoxide and 0.1% Tween-20 (v/v)), 10^{-5} M pyrabactin, 10^{-5} M pyrabactin + 10^{-5} M ABA, and a control treatment (with 0.5% dimethyl sulfoxide 0.1% Tween-20 only). The different treatments were applied once to fruits at the start of the green stage (small green fruits, after fruit-set) with a brush until the solution ran off (ca. 200 μ l of solution was applied to each berry). Application was done at dawn to limit ABA photo-destruction (Zaharia, Walker-Simmon, Rodríguez, & Abrams, 2005).

Fruits were collected at different ripening stages, defined according to a subjective assessment of berry color as green, white, pink, red and dark red (abbreviated as G, W, P, R and DR, adapted from Perkins-Veazie & Nonnecke, 1992). Sampling always took place between 8 a.m. and 10 a.m. (UTC/GMT +1). Fruits were cut with intact receptacle and pedicel to minimize wounding effects, weighed, immediately frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80 °C until biochemical analyses. Only the drupelets (the edible part of the fruit, with neither the pedicel nor the receptacle) were considered for all biochemical analyses. Unless stated otherwise, 5 independent biological replicates were used for all biochemical analyses. The ripening time pattern was monitored by the daily register of the ripening stage of 85–100 fruits per treatment. Further, a subset of these was also harvested at each stage to determine whole fruit fresh and dry weight, as well as the maximum efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_m ratio, an indicator of chloroplast functionality).

Unless stated otherwise, all chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Germany) and were of HPLC grade or superior.

2.2. Vitamin E and pigment determination

The extraction of vitamin E compounds, total carotenoids, chlorophyll and anthocyanins was performed after Miret et al. (2014), as follows. In brief, 100 mg of tissue was ground with the mixer mill MM400 (Retsch GmbH, Germany) and extracted with cold methanol by repeated vortexing and ultrasonication (Branson 2510 ultrasonic cleaner; Branson, USA). The procedure was repeated several times until the pellet was colorless. After centrifugation, the collected supernatants were merged. Vitamin E was determined by HPLC with fluorescence detection using a calibration curve prepared with authentic standards for each tocopherol and tocotrienol compound (Miret et al., 2014). Chlorophyll, carotenoids and anthocyanin levels (as cyanidin-3-glucoside equivalents) were determined spectrophotometrically (Lichtenthaler & Wellburn, 1983; Siegelman & Hendricks, 1958).

2.3. Vitamin C determination

Vitamin C contents, both its reduced and oxidized forms—ascorbic acid (AA) and dehydroascorbate (DHA)—were determined by the enzymatic method. In brief, 100 mg of tissue was ground with the mixer mill MM400 and extracted with cold 6% (w/v) metaphosphoric acid and 0.2 mM diethylene triamine pentaacetic acid by vortexing and ultrasonication. After centrifugation, vitamin C determinations were performed in triplicate after [Queval and Noctor \(2007\)](#) using a quartz microplate. Vitamin C redox state was calculated as $AA/(AA + DHA)^{-1}$ and expressed as a percentage.

2.4. Hydrogen peroxide, lipid hydroperoxides and total phenols determination

For hydrogen peroxide determination, frozen tissue was ground with the mixer mill MM400 and extracted with cold 5% (w/v) trichloroacetic acid by repeated vortexing and ultrasonication. Interfering compounds were removed with polyvinylpyrrolidone (PVPP). Hydrogen peroxide contents were determined in triplicate by the Ferrous-Orange Xylenol (FOX) method, with the extract treated with catalase as a negative control for each sample and incubated with ascorbate oxidase to remove possible interferences by ascorbic acid ([Queval, Hager, Gakière, & Noctor, 2008](#)).

For lipid hydroperoxides and total soluble phenols determination, frozen tissue was ground with the mixer mill MM400 and extracted with cold methanol containing 0.01% (w/v) butylated hydroxytoluene (to avoid further peroxidation) by repeated vortexing and ultrasonication. Total soluble phenols were determined in triplicate through the Folin-Ciocalteu method with tannic acid as standard ([Ainsworth & Gillespie, 2007](#)). Interfering compounds were removed with PVPP before lipid hydroperoxides were determined in triplicate by the FOX-2 method ([Bou, Codony, Tres, Decker, & Guardiola, 2008](#)), with the extract treated with triphenylphosphine as a negative control for each sample and expressed as hydrogen peroxide equivalents, after a concurrently assayed standard curve.

2.5. Protein and vitamin C enzymatic activity determination

Protein contents, ascorbate oxidase (AO) and dehydroascorbate reductase (DHAR) enzymatic activities were extracted with a buffer containing 1 M NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.05% (v/v) β -mercaptoethanol, 5% (w/v) PVPP in 150 mM KPO_4 buffer pH 7.5. Presence of 1 M NaCl recovered both soluble and ionically bound activity. Protein concentration was determined with Bradford reagent (Panreac, Spain) and bovine serum albumin as standard using the 590/450 nm absorbance ratio, after [Zor and Selinger \(1996\)](#). AO activity was determined as described elsewhere ([Hossain, Nakano, & Asada, 1984](#)). Assay conditions: 10 μ l extract with up to 200 μ l 100 mM KPO_4 pH 6.5 containing 0.1 mM ascorbic acid, monitoring ascorbic acid consumption at 265 nm. DHAR activity was determined as described ([Nakano & Asada, 1981](#)). Assay conditions: 20 μ l extract, up to 200 μ l 100 mM KPO_4 pH 6.5 containing 3 mM reduced glutathione and 2.5 mM dehydroascorbate, monitoring ascorbic acid generation at 265 nm and corrected for oxidized glutathione absorbance.

Ascorbate peroxidase (APX) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) enzymatic activities were extracted with the above described enzymatic activity extraction buffer with the addition of 5 mM ascorbic acid to preserve plastidial APX activity. APX activity was determined as described ([Nakano & Asada, 1981](#)). Assay conditions: 20 μ l extract, up to 160 μ l 100 mM KPO_4 pH 7.0 containing 2.5 mM hydrogen peroxide, monitoring ascorbic acid consumption at 290 nm. MDHAR activity was determined as described ([Hossain et al., 1984](#)). Assay conditions: 10 μ l extract, up to 200 μ l 100 mM

KPO_4 pH 7.8 containing 0.6 mM ascorbic acid, 0.25 mM NADH and 0.8 U ml^{-1} ascorbate oxidase, monitoring NADH consumption at 340 nm.

All reagents were freshly prepared and filtered through 0.5 μ m PVDF filters just before use. All enzymatic activity assays were performed at least in triplicate with negative controls concurrently running with a Hellma Analytics (Germany) quartz microplate (when required) and a BioRad (USA) x Mark microplate spectrophotometer set at 25 °C. The maximum rates were calculated with MPM6.0 software (BioRad) with at least 4 fitting points, using the fastest reading rate enabled by the spectrophotometer (every 8 s).

2.6. Statistical analyses

Unless stated otherwise, all analyses considered 5 independent biological replicates. Analysis of variance ANOVA was performed to examine statistical differences between stages and/or treatments, using the Tukey-*b* post hoc test. Differences were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. All analyses were conducted using SPSS software (Release Version 20; IBM, USA).

3. Results & discussion

3.1. Effects of ABA/pyrabactin on vitamin E, carotenoids and anthocyanins

Red raspberry fruit development and ripening was characterized by texture and color changes, concurrently with a decrease in chlorophyll and carotenoid contents ([Fig. 1, Suppl. Fig. 1](#)). Development was first characterized by the transition from the initial green stage to white stage, which was followed by a brief pink transition phase at the onset of ripening—when anthocyanin accumulation and softening started to develop. This led to the red phase, presenting bright red and firm but softer fruits. Dark red was the latest studied stage presenting darker and softer fruits. Applications of 10^{-5} M ABA and/or pyrabactin just after fruit set (ABA/pyrabactin, hereon) did not affect the progression through developmental stages ($n = 85$ – 100 , [Suppl. Fig. 2](#)), nor yet fresh, dry weights or fruit water content at the different stages ([Suppl. Fig. 3](#)). No significant differences on pigment contents (carotenoids, anthocyanins) were observed in fruits treated with ABA and/or pyrabactin, neither in absolute contents nor relative to chlorophyll levels ([Suppl. Fig. 4](#)).

The four tocopherol homologues (α -, β -, γ - and δ -tocopherol) were detected through all stages of fruit development and ripening ([Fig. 1, Suppl. Fig. 5](#)), being α - and δ -tocopherol the major forms. No tocotrienols (the other group of compounds that constitute vitamin E) were detected. Total vitamin E levels slowly decreased throughout development and ripening till commercial ripeness. After vitamin E levels attained a minimum at the red stage, levels rose up to $46 \mu\text{g gDW}^{-1}$ in the dark red stage. The application of ABA/pyrabactin after fruit set did not alter vitamin E contents or composition through fruit ripening ([Suppl. Fig. 5](#)). Large variations in vitamin E contents between varieties have been reported in ripe raspberries, with α -, γ - and δ -tocopherol consistently found in different varieties ([Beekwilder et al., 2008; Carvalho, Fraser, & Martens, 2013](#)). These reports quantified vitamin E compounds through different high performance chromatographic techniques coupled to UV detection, while in the present study vitamin E compounds were quantified through fluorescence, a more sensitive detection method.

3.2. Effects of ABA/pyrabactin treatments on vitamin C

Vitamin C contents—sum of reduced and oxidized forms, ascorbic acid (AA) and dehydroascorbate (DHA)—decreased after the

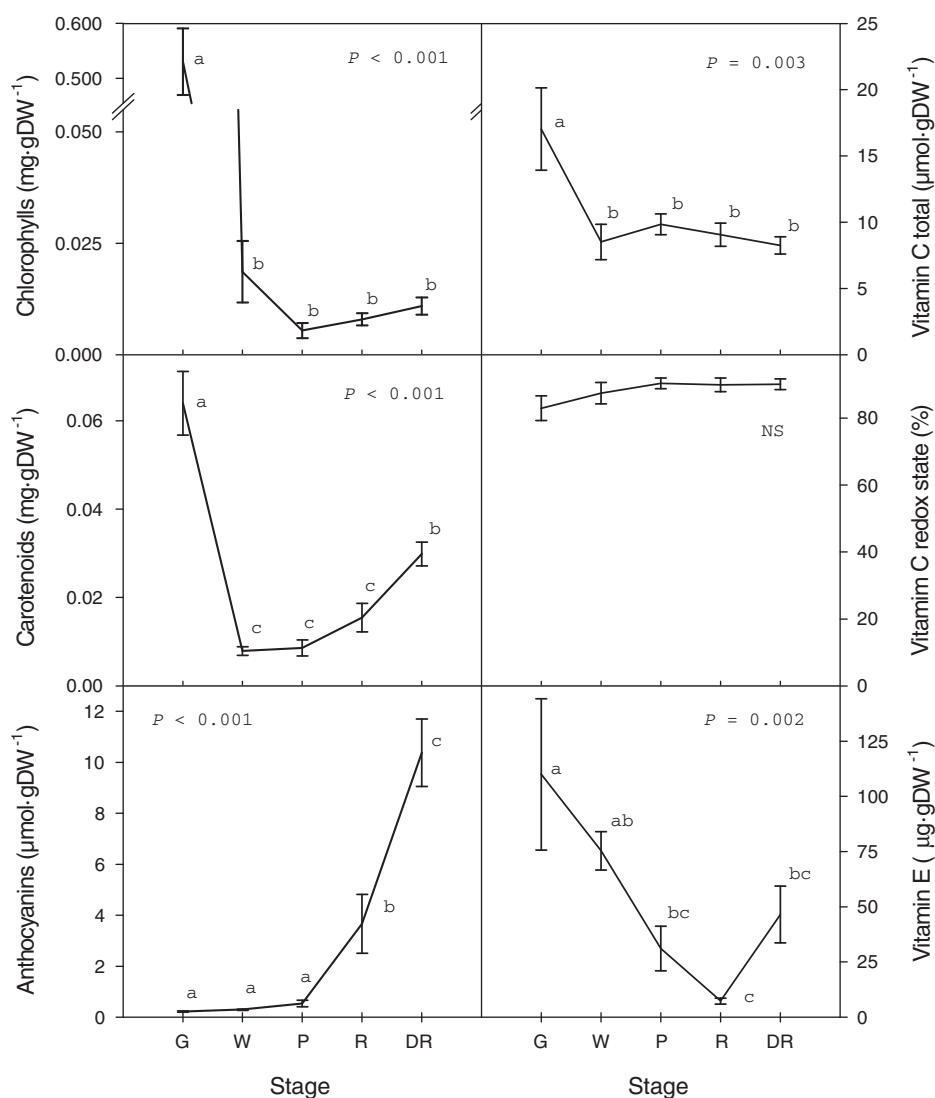


Fig. 1. Characterization of raspberry fruit ripening. Pigments—chlorophylls, carotenoids and anthocyanins—total vitamin C, and its redox state (AA/(AA + DHA))⁻¹; and total vitamin E contents throughout development and ripening stages (for details on stages, see Suppl. Fig. 1). Data represent the mean ± SE of n = 5. Results of one-way ANOVA with P-values are shown in the inlets. Letters indicate differences between experimental conditions (Tukey-b test, P ≤ 0.05). AA, ascorbic acid; DHA, dehydroascorbate. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red. NS, not significant.

green stage to present no further major changes during fruit development and ripening in non-treated fruits (Fig. 1). Redox state (the ratio between the reduced form and the total vitamin C pool) did not change during fruit development and ripening. ABA/pyrabactin application led, however, to changes on total vitamin C content in the dark red stage (latest sampled stage); ABA treatment more than doubled ascorbic acid contents at this stage (Fig. 2)—from 7.4 (control) to 15.8 μmol gDW⁻¹—while almost doubled total vitamin C content from 8.2 to 15.9 μmol gDW⁻¹ (Suppl. Fig. 6). Treatments including pyrabactin (combined or not with ABA) also showed a major, but smaller, rise on ascorbic acid and total vitamin C contents (Fig. 2, Suppl. Fig. 6).

While ABA/pyrabactin applications caused only minor changes on vitamin C contents until the last sampled stage, they changed its redox state throughout the different development and ripening stages. Whereas control fruits showed a redox state between 82% and 90% throughout fruit development and ripening, the redox state pattern changed significantly after ABA/pyrabactin applications. At the white stage, pyrabactin and ABA + pyrabactin treated fruits showed a lower redox state compared to controls. In the pink stage (corresponding to the onset of fruit ripening)

ABA + pyrabactin maintained a lower redox state, while ABA and pyrabactin treatments alone were higher, but still lower than controls. At the red stage, the ABA treatment recovered the difference with the control, while pyrabactin and ABA + pyrabactin were still lower. Finally, at the dark red stage all redox states were comparable, thus the difference between treatments disappeared. White was the only stage when ABA was lower than control, while treatments containing pyrabactin (pyrabactin and ABA + pyrabactin) presented a more oxidized redox state during most of the development and ripening, from white to red stages. Without major changes on ascorbic acid, changes in redox state were caused by higher dehydroascorbate content relative to the controls. In the dark red stage, these differences between treatments disappeared, compensated by the rise of ascorbic acid and total ascorbate pool levels. While there are some descriptions of the effects of genetic (cultivar) and environmental (season, climate, agricultural practices) factors on vitamin C contents at harvest (Beekwilder et al., 2005; De Ancos et al., 2000), there is scarce information about the evolution of vitamin C contents throughout raspberry development and ripening. Only Krüger et al. (2011) previously reported ascorbic acid contents in three ripeness stages (in cv. ‘Tulameen’):

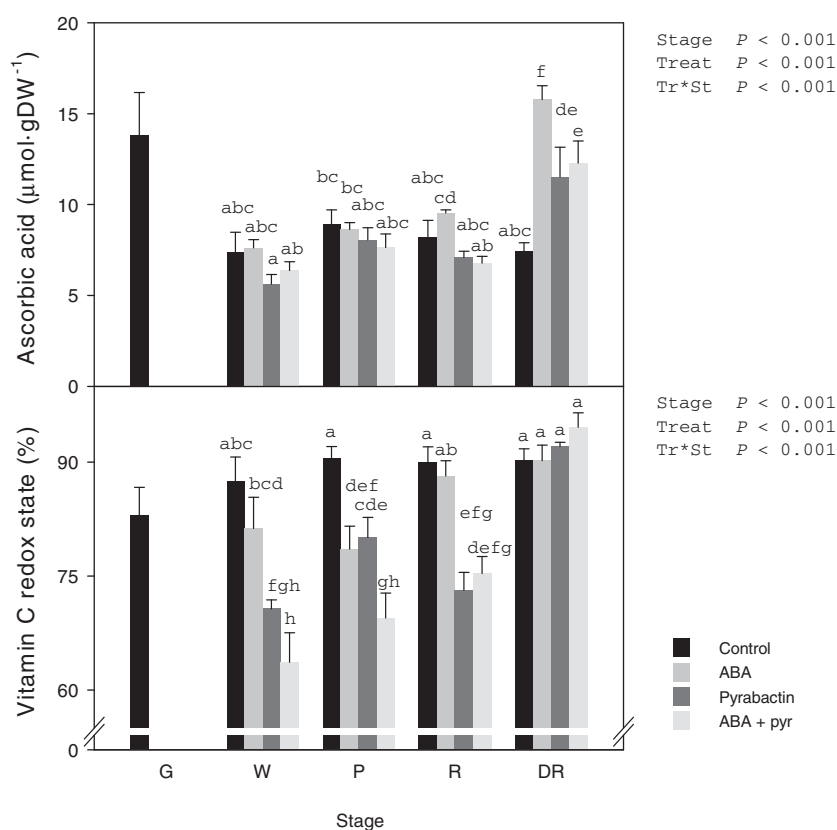


Fig. 2. Vitamin C contents of ripening raspberry treated with ABA and/or pyrabactin through development and ripening stages. Ascorbic acid and vitamin C pool redox state ($\text{AA}:(\text{AA} + \text{DHA})^{-1}$). Data represent the mean \pm SE of $n = 5$. Results of two-way ANOVA are shown in the inlets. Letters indicate differences between experimental conditions (Tukey-*b* test, $P < 0.05$). AA, ascorbic acid; ABA, abscisic acid; DHA, dehydroascorbate; pyr, pyrabactin. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red. NS, not significant.

semi-ripe, ripe and slightly over-ripe. No changes of ascorbic acid levels were observed and no information was reported on total ascorbate or its redox state.

While the role of ABA metabolism and signaling in non-climacteric fruit ripening (and its association with ripening traits) has been described in the literature, to the best of our knowledge there are no previous reports directly relating ABA and vitamin C contents in ripening fruits. There is scarce literature about the possible effects of plant growth regulators on vitamin C metabolism and ultimately its contents (Lee & Kader, 2000). Actually, the reverse relationship is well established, where vitamin C can become a limiting factor in ABA synthesis and, at the same time, modulate ABA signaling (Pastori et al., 2003). In most organs vitamin C is synthesized through the L -galactose pathway from D -glucose. However, during the development and ripening of fruits, there is evidence that the D -galacturonate pathway is the most relevant, using cell wall degradation products as substrate, with galacturonates released from pectin degradation (Cruz-Rus, Amaya, Sánchez-Sevilla, Botella, & Valpuesta, 2011; Gallie, 2013). ABA is a key regulator for color development in non-climacteric fruits but also is important for other ripening characteristics like the promotion of cell wall degradation and specifically pectin degradation associated fruit softening (Setha, 2012; Symons et al., 2012). While the underlying signaling mechanisms are not clear, ABA has also been involved in other major carbohydrate mobilizations in response to stresses and development (Gläßer et al., 2014; Kempa, Krasensky, Dal Santo, Kopka, & Jonak, 2008; Romero et al., 2012). It can be hypothesized that the alteration of ABA levels pattern, rising its levels through exogenous applications at early stages might have enhanced the degradation of pectin and thus potentially the accumulation of vitamin C in the ripe fruit.

The ascorbate pool and redox state has been reported to change during the fruit development and ripening, associated with changes in synthesis, oxidation and recycling of ascorbic acid (Alós, Rodrigo, & Zacañas, 2013, 2014). Enzymatic activity of ascorbic acid oxidizing and recycling enzymes may help explain the observed changes in redox state. Ascorbic acid can be oxidized to dehydroascorbate through a number of pathways: (i) direct scavenging of some reactive oxygen species (ROS), (ii) through an enzymatically catalyzed scavenging of ROS (like ascorbate peroxidase, APX), (iii) enzymatically coupled to oxygen reduction (e.g., ascorbate oxidase, AO), (iv) regenerating other oxidized compounds (like α -tocopherol), or (v) ascorbate can also be consumed as a substrate to generate oxalate and tartrate—the latter still not known if relevant in raspberry fruits—(Debolt, Melino, & Ford, 2007; Foyer & Noctor, 2011). Its recycling back to the reduced form is always enzymatically catalyzed by monodehydroascorbate and dehydroascorbate reductases (MDHAR, DHAR) through the ascorbate-glutathione cycle (Foyer & Noctor, 2011). Finally, if dehydroascorbate is accumulated, it is spontaneously hydrolyzed and irreversibly degraded. In raspberry, hydrogen peroxide contents presented a decline through fruit development and ripening, but were also higher during the onset of fruit ripening (pink stage) when treated with ABA or ABA + pyrabactin (Fig. 3); these changes were not associated with changes on APX activity (Fig. 2; expressed on a dry weight basis in Suppl. Fig. 7). The combination of higher oxidizing enzymatic activity (AO, APX) and lower reducing activity (DHAR, MDHAR) contributed to a more oxidized state of the ascorbate pool. Rises in ascorbate oxidase activity have been associated to the onset of ripening in non-climacteric fruits (Pilati et al., 2007), but this was not observed in raspberry. Changes in ascorbate synthesis and recycling enzymes (DHAR, MDHAR) are

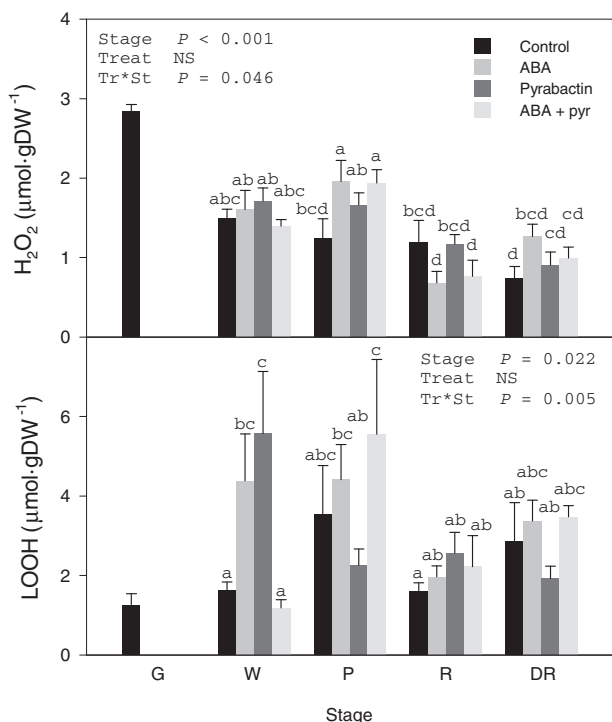


Fig. 3. Oxidative stress markers in raspberries treated with ABA and/or pyrabactin throughout development and ripening stages. Hydrogen peroxide (H_2O_2) and total lipid hydroperoxides (LOOH, as hydrogen peroxide equivalents). Data represent the mean \pm SE of $n = 5$. Results of two-way ANOVA are shown ($P \leq 0.05$; Tukey-*b* test). ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red. NS, not significant.

usually correlated to ascorbic acid content in ripening fruits (Alós et al., 2013, 2014). Nevertheless, the observed concurrent rise in APX, AO and MDHAR activities at the dark red stage might account for the recovery in vitamin C redox state at the end of fruit ripening after pyrabactin containing treatments.

3.3. Protein contents and other parameters

Total soluble phenols contents (Ainsworth & Gillespie, 2007) presented no clear trend through fruit development and ripening and no effect of ABA/pyrabactin was found (Suppl. Fig. 7). This might be counter intuitive as anthocyanin accumulation is visually apparent after the onset of ripening. The neutral change in total phenolics may result from the fact that ellagitannins (the other major polyphenol in raspberries) rise first, then decrease as anthocyanins increase with ripening, resulting in no net changes. Lipid hydroperoxide contents—a marker of oxidative damage—were low and presented high variability (Fig. 3), especially at the pink transition stage, with no evident correlation with hydrogen peroxide or vitamin E contents (Fig. 4).

Total soluble protein content rose throughout fruit ripening in untreated fruits. When treated with ABA, the fruits presented the same pattern of protein accumulation (Fig. 5, Suppl. Fig. 7). However, the fruits presented a sharp decrease on protein content at the dark red stage when treated with pyrabactin containing treatments—either separated or combined with ABA (pyrabactin and ABA + pyrabactin treatments). No significant effects on protein content were evident at previous stages. Although protein content is not a major quality concern in fruits, because of their low protein contents, raspberries are one of the commercial fleshy fruits with the highest protein content (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28 (2015): Fruits and Fruit Juice.

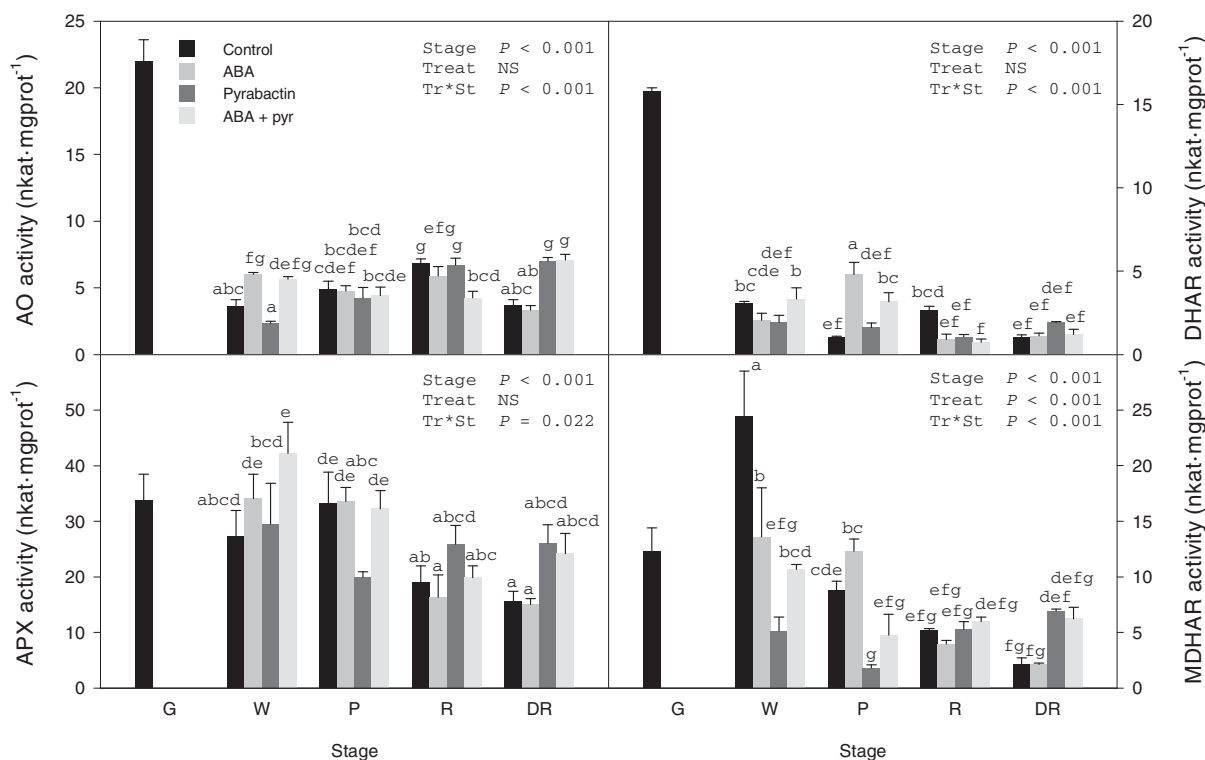


Fig. 4. Enzymatic activity of ascorbate consuming and recycling enzymes expressed as nanokatals $mg\ protein^{-1}$ of raspberries treated with ABA and/or pyrabactin throughout development and ripening stages. Data represent mean \pm SE of $n = 5$. Results of two-way ANOVA are shown ($P \leq 0.05$; Tukey-*b* test). AO, ascorbate oxidase; APX, ascorbate peroxidase; DHAR, dehydroascorbate reductase; MDHAR, monodehydroascorbate reductase. ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red. NS, not significant.

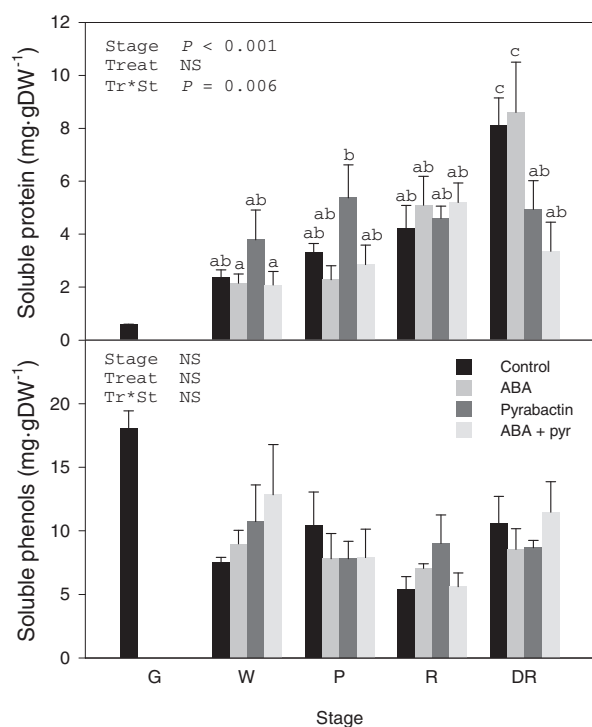


Fig. 5. Protein content and soluble phenols—Folin–Ciocalteu assay—of raspberries treated with ABA and/or pyrabactin throughout development and ripening stages. Results of two-way ANOVA are shown ($P < 0.05$; Tukey-*b* test). ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. AO, ascorbate oxidase; APX, ascorbate peroxidase; DHAR, dehydroascorbate reductase; MDHAR, monodehydroascorbate reductase. NS, not significant.

Retrieved from <http://ndb.nal.usda.gov/>), thus negative effects of pyrabactin on protein contents might limit its potential applicability in the market. In any case, it should be considered that fleshy fruits are never a major source of protein in most diets, with a typical serving size of raw raspberries containing less than 2% of the recommended protein dietary intake (median serving size 16 g [The Irish Food Portion Sizes Database, 1st edition. Retrieved from <http://www.iuna.net/>]). The effect of ABA applications to fleshy fruits depend, at least in part, on the stage of development at the time of treatments (Giribaldi, Hartung, & Schubert, 2009; Setha, 2012). ABA perception pathways—expression patterns of different ABA PYR/PYL receptors and the associated transduction pathways—dynamically change during fruit ripening and are strictly genetically regulated (Romero et al., 2012). In most cases, the studied applications take place just before or near the onset of fruit ripening and the observed impact is variable, usually reporting an enhanced accumulation of phenols (including anthocyanins) and soluble sugars, as well as enhanced antioxidant activity and fruit softening (Setha, 2012). When ABA is applied near fruit set the outcomes are variable. In climacteric fruits—like tomato and banana—exogenous ABA promoted ethylene and ABA production, accelerating ripening (Setha, 2012; Zhang et al., 2009). In non-climacteric fruits like grape, the application of ABA and other plant growth regulators near *veraison* (the onset of fruit ripening) is a widely studied strategy to modify the hormonal balance and thus impact quality traits, especially color through a promotion of anthocyanin metabolism. However, when applied at the green stage, tannins contents and metabolism are also affected (Lacampagne, Gagné, & Gény, 2010). In the present study, it is shown for the first time in a non-climacteric fruit that ABA and pyrabactin may have a large impact on fruit quality by modulating the vitamin C composition of raspberries.

However, when exogenous ABA and/or its agonists are directly applied to edible parts of the plant, such as developing fruits, consumer safety aspects should be considered. ABA is not only a plant growth regulator, but is also produced by a wide range of animals, from lower animals to many mammalian tissues, where it acts as a paracrine regulator involved in stress responses, immune regulation and insulin regulation (Tossi, Cassia, Bruzzone, Zocchi, & Lamattina, 2012). Furthermore, ABA commercial applications are limited by its photosensitivity and fast metabolism (Zaharia et al., 2005). In this respect, pyrabactin applications could be promising, although the minimal negative impact of a reduced protein content might limit its potential applicability.

In conclusion, the application of ABA and/or pyrabactin just after fruit set led to major changes in vitamin C accumulation in raspberry fruits. While the applications caused no changes in carotenoid or vitamin E contents, vitamin C levels and its redox state were modified. Major changes on total vitamin C occurred during the transition between red and dark red stage, when ascorbate levels sharply rose, especially when only ABA was applied, more than doubling ascorbate levels. Furthermore, treated fruits presented a more oxidized pool of ascorbate during most stages of development and ripening, with no differences at the end of ripening relative to controls. ABA is particularly sensitive to light, making potential non-photosensitive compounds like pyrabactin promising commercial alternatives. Although pyrabactin doubled vitamin C contents, it reduced protein content.

Acknowledgments

This study was funded by the prize ICREA Academia awarded to SM-B by the Generalitat de Catalunya. We are very grateful to Serveis de Camps Experimentals and Serveis Científico-Tècnics of the University of Barcelona for technical assistance. JAM holds a FPU predoctoral fellowship from the Spanish Government. The founding sources had no involvement in the conduct of this research and/or preparation of this article.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.046>.

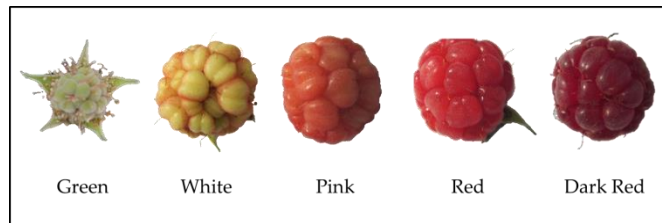
References

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877.
- Alós, E., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2013). Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 207, 2–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.007>.
- Alós, E., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2014). Differential transcriptional regulation of L-ascorbic acid content in peel and pulp of citrus fruits during development and maturation. *Planta*, 239(5), 1113–1128. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-014-2044-z>.
- Anttonen, M. J., & Karjalainen, R. O. (2005). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(8), 759–769. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2004.11.003>.
- Arrom, L., & Munné-Bosch, S. (2012a). Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*. *Planta*, 236(2), 343–354. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-012-1615-0>.
- Arrom, L., & Munné-Bosch, S. (2012b). Hormonal regulation of leaf senescence in *Lilium*. *Journal of Plant Physiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.012>.
- Beekwilder, J., Hall, R. D., & Ric Vos, C. H. D. (2005). Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. *BioFactors*, 23(4), 197–205. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520230404>.
- Beekwilder, J., van der Meer, I. M., Simic, A., Uitdewilligen, J., van Arkel, J., de Vos, R. C. H., ... Hall, R. D. (2008). Metabolism of carotenoids and apocarotenoids during ripening of raspberry fruit. *BioFactors*, 34(1), 57–66.
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. A., & Guardiola, F. (2008). Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–

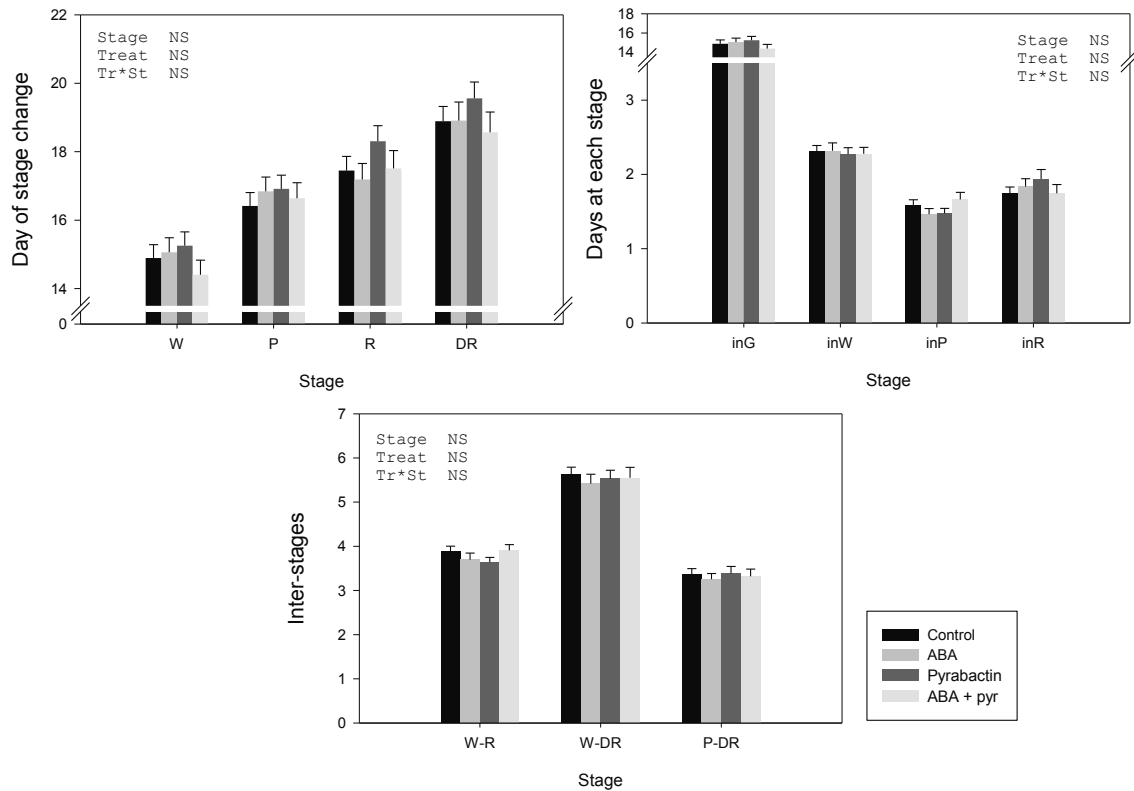
- xlenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry*, 377(1), 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.029>.
- Carvalho, E., Fraser, P. D., & Martens, S. (2013). Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chemistry*, 139(1–4), 744–752. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.047>.
- Chai, Y., Jia, H., Li, C., Dong, Q., & Shen, Y. (2011). FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 5079–5089. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err207>.
- Cruz-Rus, E., Amaya, I., Sánchez-Sevilla, J. F., Botella, M. A., & Valpuesta, V. (2011). Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4191–4201. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err122>.
- De Ancos, B., Gonzalez, E. M., & Cano, M. P. (2000). Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4565–4570.
- Debolt, S., Melino, V., & Ford, C. M. (2007). Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany*, 99(1), 3–8. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcl236>.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1), 2–18. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.167569>.
- Gallie, D. (2013). Increasing vitamin C content in plant foods to improve their nutritional value—successes and challenges. *Nutrients*, 5(9), 3424–3446. <http://dx.doi.org/10.3390/nu5093424>.
- Giribaldi, M., Hartung, W., & Schubert, A. (2009). The effects of abscisic acid on grape berry ripening are affected by the timing of treatment. *International Journal of Vine and Wine Science*, 43, 9–15.
- Gläser, C., Haberer, G., Finkemeier, I., Pfannschmidt, T., Kleine, T., Leister, D., ... Mayer, K. F. X. (2014). Meta-analysis of retrograde signaling in *Arabidopsis thaliana* reveals a core module of genes embedded in complex cellular signaling networks. *Molecular Plant*, 7(7), 1167–1190. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sss042>.
- Hossain, M. A., Nakano, Y., & Asada, K. (1984). Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology*, 25(3), 385–395.
- Jia, H.-F., Chai, Y.-M., Li, C.-L., Lu, D., Luo, J.-J., Qin, L., & Shen, Y.-Y. (2011). Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology*, 157(1), 188–199. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.177311>.
- Kempa, S., Krasensky, J., Dal Santo, S., Kopka, J., & Jonak, C. (2008). A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PLoS ONE*, 3(12), e3935. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003935>.
- Krüger, E., Dietrich, H., Schöppl, E., Rasim, S., & Kürbel, P. (2011). Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 31–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.12.001>.
- Lacampagne, S., Gagné, S., & Gény, L. (2010). Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: New elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(1), 81–90. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-009-9115-6>.
- Lee, S. K., & Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20(3), 207–220. [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00133-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00133-2).
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591–592.
- Mezzetti, B., Landi, L., Pandolfini, T., & Spena, A. (2004). The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnology*, 4(1), 4. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-4-4>.
- Miret, J. A., Cela, J., Bezerra, L. A., Arrom, L., Juvany, M., Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2014). Application of a rapid and sensitive method for hormonal and vitamin E profiling reveals crucial regulatory mechanisms in flower senescence and fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(1), 34–43. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-013-9375-z>.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867–880.
- Neocleous, D., & Vasilakakis, M. (2007). Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. "Autumn Bliss"). *Scientia Horticulturae*, 112(3), 282–289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.025>.
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2c protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324(5930), 1068–1071. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1173041>.
- Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P. J., ... Foyer, C. H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell*, 15(4), 939–951. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.010538>.
- Perkins-Veazie, P., & Nonnecke, G. (1992). Physiological changes during ripening of raspberry fruit. *HortScience*, 27(4), 331–333.
- Pilati, S., Perazzolli, M., Malossini, A., Cestaro, A., Demattè, L., Fontana, P., ... Moser, C. (2007). Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BMC Genomics*, 8(1), 428. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-428>.
- Puli, M. R., & Raghavendra, A. S. (2012). Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1349–1356. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err364>.
- Queval, G., Hager, J., Gakière, B., & Noctor, G. (2008). Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 135–146. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern193>.
- Queval, G., & Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical Biochemistry*, 363(1), 58–69.
- Rao, A. V., & Snyder, D. M. (2010). Raspberries and human health: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3871–3883. <http://dx.doi.org/10.1021/jf903484g>.
- Romero, P., Lafuente, M. T., & Rodrigo, M. J. (2012). The Citrus ABA signalosome: Identification and transcriptional regulation during sweet orange fruit ripening and leaf dehydration. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), 4931–4945. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers168>.
- Setha, S. (2012). Roles of abscisic acid in fruit ripening. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 9(4), 297–308. <http://dx.doi.org/10.2004/wjst.v9i4.386>.
- Seymour, G. B., Østergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., & Martin, C. (2013). Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 219–241. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>.
- Siegelman, H. W., & Hendricks, S. B. (1958). Photocontrol of alcohol, aldehyde, and anthocyanin production in apple skin. *Plant Physiology*, 33(6), 409–413.
- Symons, G. M., Chua, Y.-J., Ross, J. J., Quittenden, L. J., Davies, N. W., & Reid, J. B. (2012). Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), 4741–4750. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers147>.
- Tossi, V., Cassia, R., Bruzzone, S., Zocchi, E., & Lamattina, L. (2012). ABA says NO to UV-B: A universal response? *Trends in Plant Science*, 17(9), 510–517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.007>.
- Wang, S. Y., & Zheng, W. (2005). Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(2), 187–195. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00930.x>.
- Zaharia, L. I., Walker-Simmon, M. K., Rodríguez, C. N., & Abrams, S. R. (2005). Chemistry of abscisic acid, abscisic acid catabolites and analogs. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(4), 274–284. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-005-0066-2>.
- Zhang, M., Yuan, B., & Leng, P. (2009). The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1579–1588. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erp026>.
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302–308. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0171>.

Supplementary material

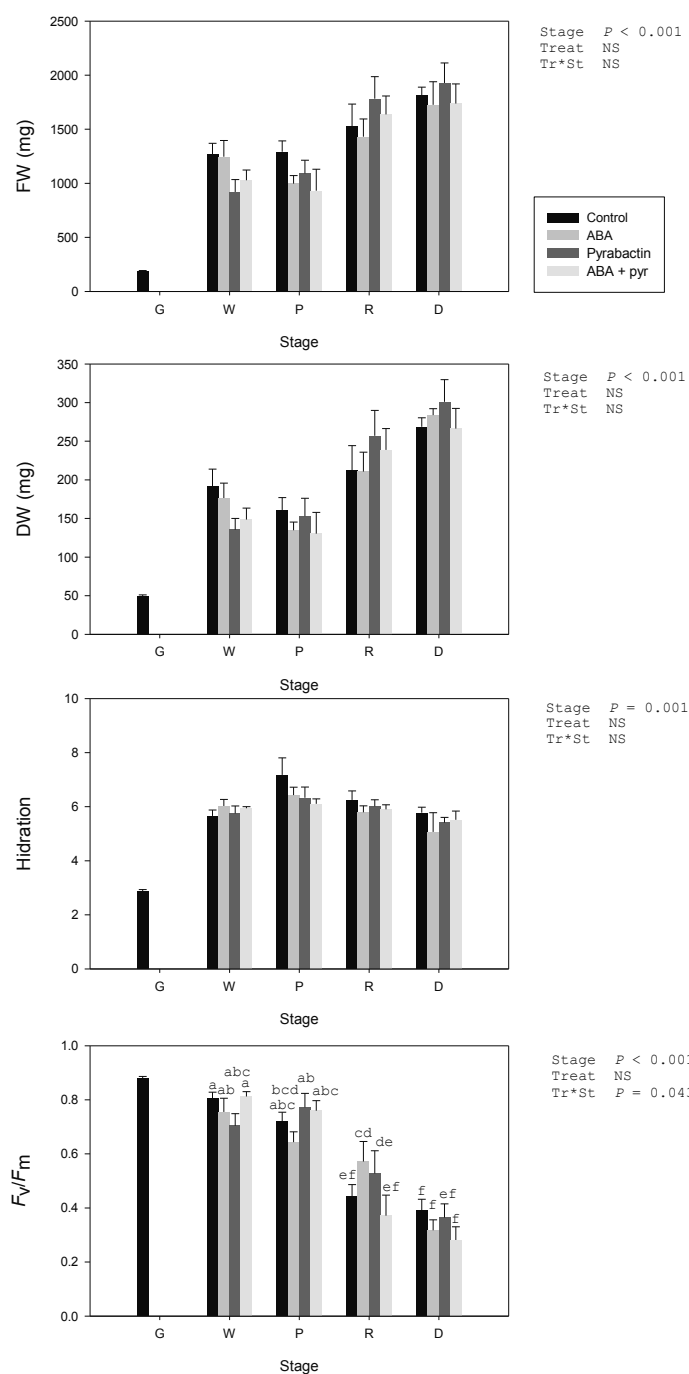
Supplementary Fig. 1. Ripening stages defined according to a subjective assessment of berry color, adapted from Penelope Perkins-Veazie & Nonnecke (1992). Composed image.



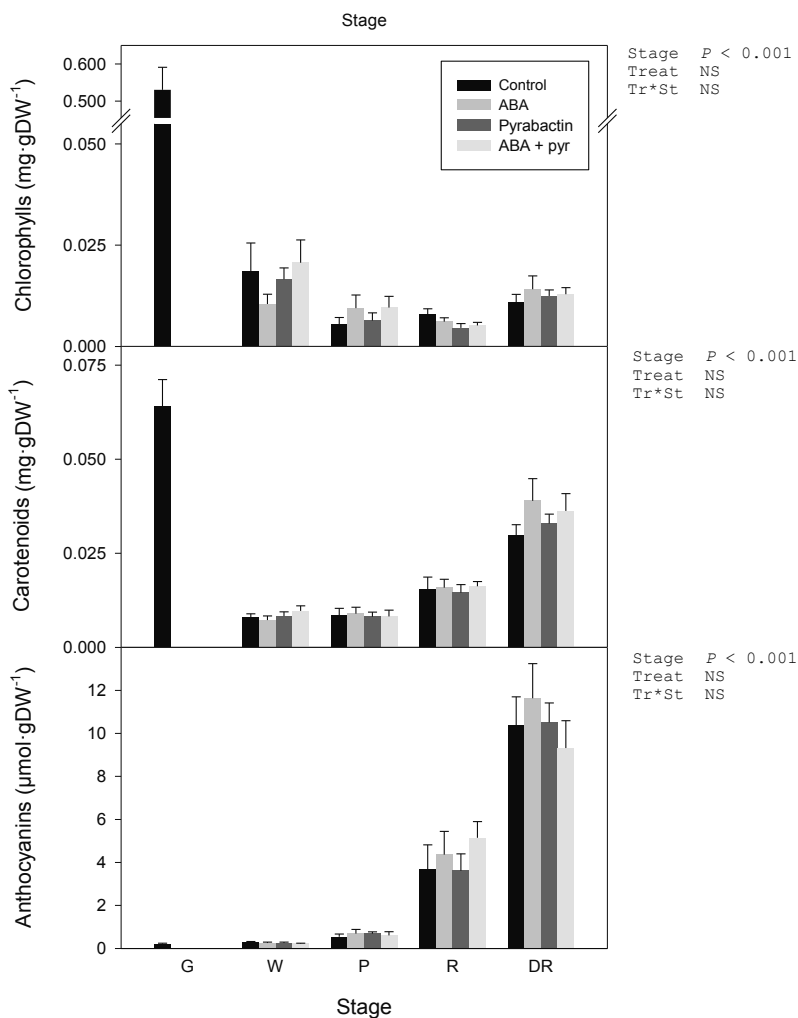
Supplementary Fig. 2. Detail of days elapsed between developmental and ripening stages and the time of application (after fruit set); days elapsed at each stage; and days elapsed between different stages one by one. mean \pm SE of $n = 85-100$. Two-way ANOVA P -values in the inlets, letters indicate differences between experimental conditions (Tukey- b test, $P \leq 0.05$). ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. NS, not significant. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red.



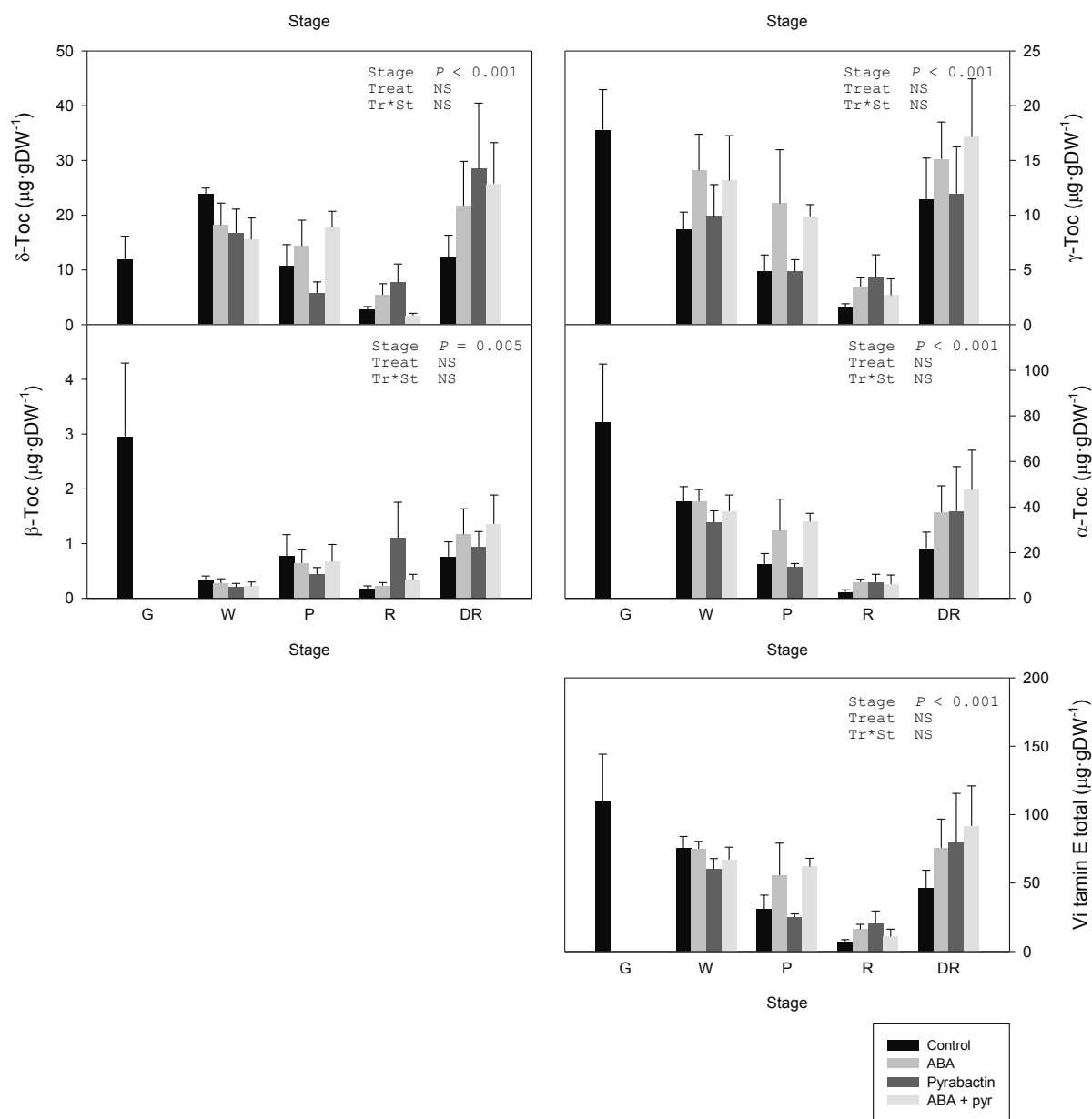
Supplementary Fig. 3. Whole fruit fresh (FW) and dry weight (DW; oven dried at 7°C until constant weight), whole fruit hydration ((FW-DW)·DW⁻¹) and F_v/F_m (maximum quantum yield of PSII) of raspberries treated with ABA and/or pyr throughout development and ripening stages. Data represent the mean ± SE of $n = 5$. Two-way ANOVA P -values in the inlets, letters indicate differences between experimental conditions (Tukey-b test, $P \leq 0.05$). ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. NS, not significant. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red.



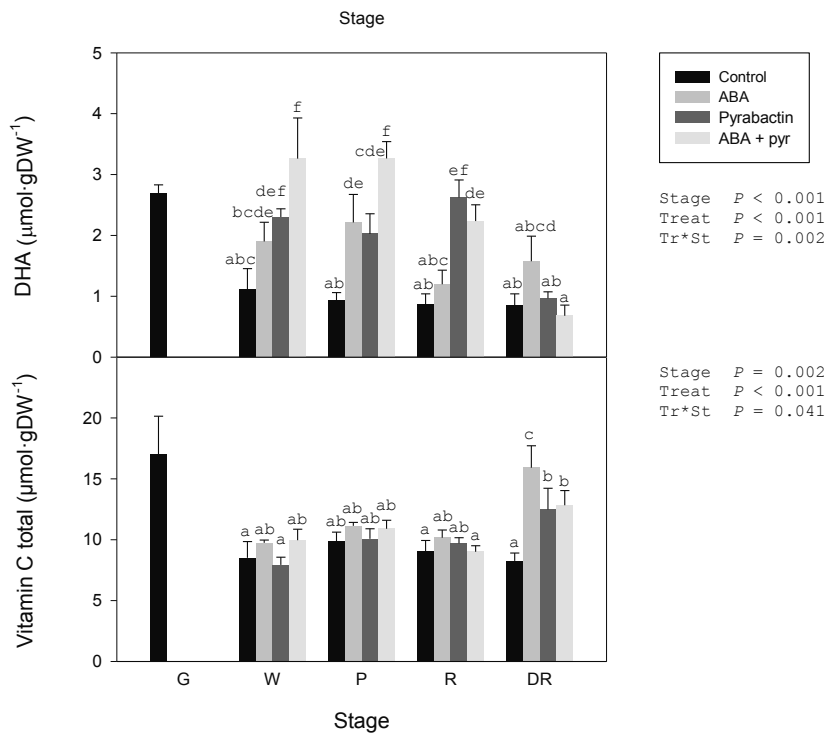
Supplementary Fig. 4. Pigments—chlorophylls, total carotenoids and anthocyanins—of ripening raspberry treated with ABA and/or pyr through development and ripening stages. mean \pm SE of $n = 5$. Two-way ANOVA P -values in the inlets ($P \leq 0.05$), letters indicate differences between experimental conditions (Tukey- b test, $P \leq 0.05$). ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. NS, not significant. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red.



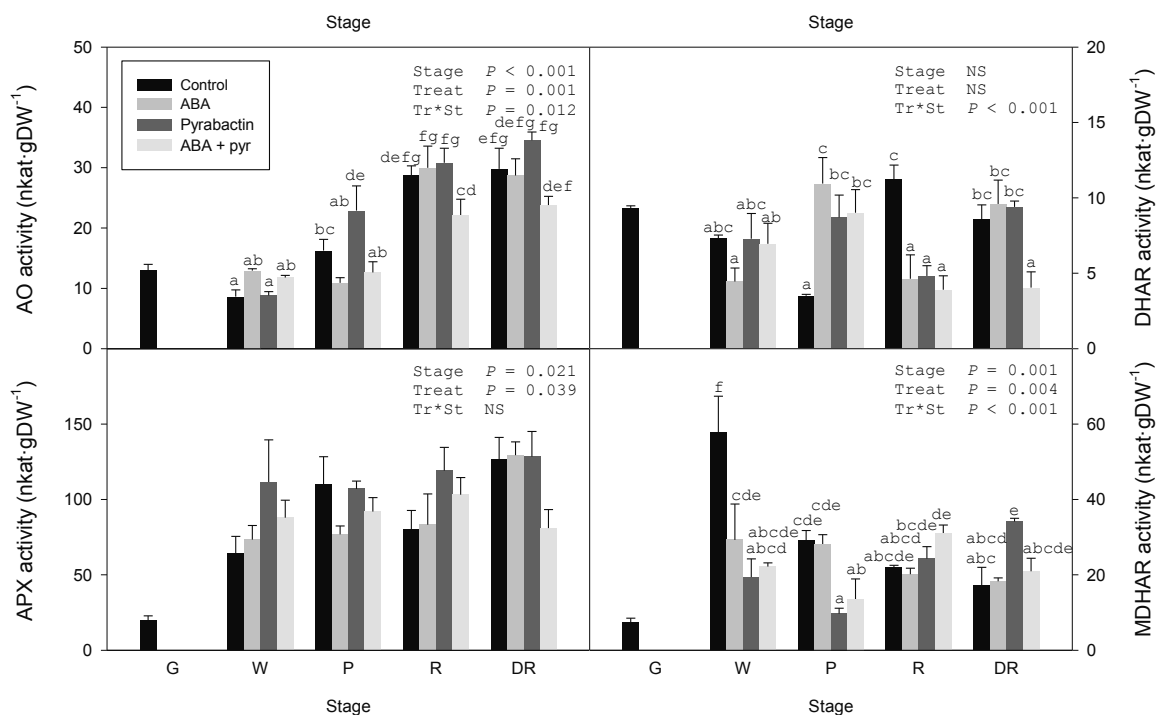
Supplementary Fig. 5. Evolution of the four homologues (α -, β -, γ - and δ -tocopherol) of vitamin E in raspberries treated with ABA and/or pyr throughout development and ripening stages. Data are the mean \pm SE of $n = 5$. Two-way ANOVA P -values in the inlets, letters indicate differences between experimental conditions (Tukey- b test, $P \leq 0.05$). ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. NS, not significant. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red.



Supplementary Fig. 6. Vitamin C total and dehydroascorbate (DHA) of raspberries treated with ABA and/or pyr throughout development and ripening stages. Data are the mean \pm SE of $n = 5$. Two-way ANOVA P -values in the inlets, letters indicate differences between experimental conditions (Tukey- b test, $P \leq 0.05$). ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. NS, not significant. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red.



Supplementary Fig. 7. Enzymatic activity of ascorbate consuming and recycling enzymes expressed as nanokatal·mg dry weight⁻¹ of ripening raspberry treated with ABA and/or pyr through development and ripening stages. Data are the mean ± SE of *n* = 5. Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inlets, letters indicate differences between experimental conditions (Tukey-*b* test, *P* ≤ 0.05). AO, ascorbate oxidase; APX, ascorbate peroxidase; DHAR, dehydroascorbate reductase; MDHAR, monodehydroascorbate reductase. ABA, abscisic acid; pyr, pyrabactin. NS, not significant. G, green; W, white; P, pink; R, red; DR, dark red.





CAPÍTOL 3

**LA MANIPULACIÓ DE LA SENYALITZACIÓ
D'ABA SUPRIMEIX LA SENESCÈNCIA D'UNA
HORTALISSA VERDA EMMAGATZEMADA A
TEMPERATURA AMBIENT**

CAPÍTOL 3: La manipulació de la senyalització d'ABA suprimeix la senescència d'una hortalissa verda emmagatzemada a temperatura ambient

Chapter 3. ABA signalling manipulation suppresses senescence of a leafy vegetable stored at room temperature.

Javier A Miret^{1,a}, Sergi Munné-Bosch¹, Paul P Dijkwel²

¹ Departament de Biologia Vegetal, Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

² Institute of Fundamental Sciences, Massey University, Palmerston North 4442, New Zealand

^a Correspondence to: Javier A Miret, email: javiermiret@ub.edu

Enviat per la seva publicació a Plant Biotechnology Journal (PBI-00199-2017).

RESUM DEL CAPÍTOL 3

La senescència post-collita i els estressos associats limiten la longevitat i valor nutricional de les hortalisses. Una major comprensió d'aquests processos crea opcions per un millor maneig. Després de la collita, l'exposició controlada a estressos abiòtics i/o hormones exògenes pot millorar trets nutricionals, organolèptics i de longevitat. Durant la senescència foliar, els nivells d'àcid abscísic (ABA) augmenten progressivament. Les funcions biològiques d'aquesta hormona durant el transcurs de la senescència encara necessiten ser aclarits. La senescència post-collita de fulles de col verda (*Brassica oleracea* L. var. capitata) va ser caracteritzada a dues condicions d'emmagatzemament: fred (4°C) i temperatura ambient (25°C). El perfil hormonal de regions del limbe foliar (apical, medial, basal) revelà una disminució dels nivells de citocinines durant els primers dies en ambdues condicions, mentre l'ABA només incrementà a 25°C. Tractaments amb ABA i un agonista parcial de l'ABA (pirabactina) durant 8 dies no van causar efectes significatius als continguts hídrics i de pigments, però incrementà la integritat cel·lular i alterà els continguts d'àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic (ACC) i citocinines. L'anàlisi transcriptòmic mostrà regulació transcripcional del metabolisme i les respostes d'ABA, citocinines i etilè; components del complex ubiquitina-ligasa; reguladors de la senescència; protecció de la funcionalitat del cloroplast i l'homeòstasi cel·lular; i supressió de respostes de defensa a estressos abiòtics (incloent-hi el metabolisme de glucosinolats i fenilpropanoïdes). D'aquesta manera, es conclou que l'augment dels nivells d'ABA (o del seu agonista parcial pirabactina) des del principi de la post-collita suprimeix la senescència de fulles emmagatzemades a temperatura ambient, modifica la regulació transcripcional del metabolisme dels glucosinolats i regula a la baixa els mecanismes de defensa contra estressos biòtics. Aquests resultats suggereixen la possibilitat de manipular la senyalització d'ABA per millorar la qualitat post-collita d'hortalisses verdes emmagatzemades a temperatura ambient.

ABA signalling manipulation suppresses senescence of a leafy vegetable stored at room temperature

Javier A. Miret^{1,a}, Sergi Munné-Bosch¹ and Paul P. Dijkwel²

1) Departament de Biologia Vegetal, Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

2) Institute of Fundamental Sciences, Massey University, Palmerston North 4442, New Zealand

^aCorrespondence to: Javier A Miret. javiermiret@ub.edu

Summary

Post-harvest senescence and associated stresses limit the shelf-life and nutritional value of vegetables. Improved understanding of these processes creates options for better management. After harvest, controlled exposure to abiotic stresses and/or exogenous phytohormones can enhance nutraceutical, organoleptic and commercial longevity traits. With leaf senescence, abscisic acid (ABA) levels progressively rise, but the actual biological functions of this hormone through senescence still needs to be clarified. Post-harvest senescence of detached green cabbage leaves (*Brassica oleracea* var. capitata) was characterised under cold (4°C) and room temperature (25°C) storage conditions. Hormonal profiling of regions of the leaf blade (apical, medial, basal) revealed a decrease in cytokinin contents during the first days under both conditions, while ABA only increased at 25°C. Treatments with ABA and a partial agonist of ABA (pyrabactin) for 8 days did not lead to significant effects on water and pigment contents, but increased cell integrity and altered 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and cytokinin contents. Transcriptome analysis showed transcriptional regulation of ABA, cytokinin and ethylene metabolism and signalling; proteasome components; senescence regulation; protection of chloroplast functionality and cell homeostasis; and suppression of defence responses (including glucosinolates and phenylpropanoids metabolism). It is concluded that increasing the concentration of ABA (or its partial agonist pyrabactin) from the start of post-harvest suppresses senescence of stored leaves, changes the transcriptional regulation of glucosinolates metabolism and downregulates biotic stress defence mechanisms. These results suggest a potential for manipulating ABA signalling for improving post-harvest quality of leafy vegetables stored at ambient temperature

Introduction

Food loss represents up to a third of worldwide production, but 45% of fruits and vegetables deteriorate before reaching the consumer (FAO, 2016). In developing countries, the post-harvest losses of vegetables may account for even a higher fraction of produce yield (FAO, 2016; Thongsavath *et al.*, 2012). Global change and the forecasted increase in the frequency of extreme weather events will further strain the production and logistic chain from the field to the consumer, especially in the developing world (Gustavsson *et al.*, 2011; Thongsavath *et al.*, 2012).

Post-harvest senescence and stresses limit the storage and shelf-life of vegetables; with an improved understanding of the perception of this environment and the subsequent physiological responses, options for better management become possible (Toivonen, 2004; Toivonen and Hodges, 2011). From the time of harvest, quality declines in vegetables, including visual symptoms, such as loss of turgor and yellowing, as well as loss of nutraceutical and organoleptic metabolites (Cantwell and Suslow, 2001). Low-temperature storage is the single most effective method for prolonging post-harvest life, reducing respiration rate, ethylene production and sensitivity, moisture loss, and growth of pathogens (Thompson *et al.*, 2002). However, cold post-harvest storage can have a negative impact on the organoleptic and nutraceutical traits of leafy vegetables (Cantwell and Suslow, 2001; Kramchote *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015), and not in all markets the cold chain can be properly maintained (Thongsavath *et al.*, 2012). Environmental factors can be leveraged to increase nutritional value, antioxidant content, organoleptic characteristics and eventually commercial

longevity; but storage at ambient conditions can hinder produce quality and value (Adams *et al.*, 2016; Toivonen and Hodges, 2011; Villarreal-García *et al.*, 2016). Therefore, methods to ensure the post-harvest quality of vegetables at room temperature should be improved.

Plant hormones are known to affect leaf senescence, but they also regulate plant development and stress responses (Bartoli *et al.*, 2013; Schippers *et al.*, 2007). For this reason, it has been difficult to unravel how different hormones regulate the onset and progression of leaf senescence; if acting directly on leaf senescence, or indirectly through altering the developmental programme or the response to stresses. Leaves are insensitive to senescence-inducing environment signals till they have reached a certain developmental stage (Jibrán *et al.*, 2013; Jing *et al.*, 2005). Depending on the previous occurrence of accumulated age-related changes the leaf can integrate environmental cues, which if adverse, will induce the onset of senescence. The role of the rise of ABA contents and ABA signalling changes during leaf senescence is less clear (Sun *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). ABA is involved in both developmental processes (Finkelstein, 2013) and stress responses (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013). In many processes, ABA promotes accumulation of antioxidants and protects chloroplast functionality (Ghassemian *et al.*, 2008; Ivanov *et al.*, 1995; Leng *et al.*, 2014). Therefore, manipulation of its levels or signalling offers potential for biotechnological applications, including the regulation of dormancy and germination (Rademacher, 2015), manipulation of fruit maturation (Ji *et al.*, 2012; Miret and Munné-Bosch, 2016; Setha, 2012), tissue culture systems (Rai *et al.*, 2011) and enhancing tolerance to abiotic

stresses (Blum, 2015; Travaglia *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2016). Further, ABA may control many of the developmental age-related changes associated with sensibility to senescence-inducing signals (Jibrán *et al.*, 2013), notably keeping redox and membrane homeostasis. These activities also play a role in protecting the cellular functions required for progression and completion of senescence (Jibrán *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2016). At the same time, ABA may promote senescence by promoting ethylene biosynthesis or through ethylene-independent pathways (Zhao *et al.*, 2016). Besides, the relationship between ABA and ethylene synthesis and signalling differs depending on organ type, age and physiological state (Ghassemian *et al.*, 2000). Thus, the potential effect of ABA on leaf senescence strikes as being strongly dependent on the developmental state of the leaf.

The discovery of the PYR/PYL/RCAR ABA receptor family (Park *et al.*, 2009) has accelerated the unravelling of ABA signal transduction and its interaction with ABA response modulators and effectors. In the presence of ABA, a complex is formed between ABA, PYR/PYL/RCAR receptors and PP2Cs, releasing SnRK2 from PP2Cs inhibition. SnRK2s, then activate effectors and regulators of ABA response. Free PP2Cs can also interact with other effectors and regulators (Laporte *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2009; Umezawa *et al.*, 2010). Further, ubiquitin-ligases and phosphatases act as a layer of post-translational regulation of most elements of this system whose biological function we are only starting to decipher (Mazzucotelli *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2017).

Green cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) is an economically important crop, widely consumed either fresh, steamed or cooked (Chiang *et al.*, 1993). Cabbage is rich in health beneficial secondary metabolites that

prevent chronic degenerative diseases, such as antioxidants, glucosinolates, phenylpropanoids and other bioactive compounds (Manchali *et al.*, 2012; Podsedek, 2007; Traka and Mithen, 2009). These compounds not only present nutraceutical and organoleptic interest, but also have been associated with increased abiotic and biotic stress tolerance in crops (Ishida *et al.*, 2014). *Brassica oleracea* breeding has generated a wide diversity of varieties, with different morphology and edible parts (Liu *et al.*, 2014). Research into post-harvest senescence has focussed on broccoli florets, while leafy *B. oleracea*, such as pak choy, brussels sprouts, kale and cabbage, is less well studied. Broccoli post-harvest senescence is marked by a decline in carbohydrates, proteins and antioxidants leading to pigment deterioration, lipid peroxidation and eventual necrosis (Coupe *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2011). These results may partially extend to leafy *Brassica*; however, while they belong to the same species, comparisons should be cautious as broccoli comprises immature inflorescences while cabbage represents leaves.

The post-harvest senescence of detached green cabbage leaves was characterised in a first experiment, mimicking typical storage conditions. After purchase, leaves were stored either in a cold room (Cold treatment; emulating a fridge); or in a laboratory growth chamber (Room Temperature; cupboard). Over 9 days of storage, a physiological and hormonal profile of different regions of the leaf (apical, medial and basal strips) was obtained, identifying ABA at the start of post-harvest as a possible target for manipulation. Biochemical and transcriptomic tools were applied to study the effects of ABA/Pyr treatments to hormonal regulation, leaf function homeostasis, and the regulation of relevant nutraceutical and organoleptic compounds during post-harvest under Room Temperature storage conditions.

Results

Characterization of green cabbage post-harvest senescence under contrasting storage conditions

First, cabbage post-harvest senescence under Cold and Room Temperature conditions was studied. Whole leaf biomass decreased under Room Temperature conditions (RT, 25°C), losing half its initial weight after 10 days (Figure S2) even under high relative humidity (75%). In contrast, after storage at 4°C, leaves lost just 20%. All other physiological and biochemical analyses were performed independently for apical, medial and basal strips of the leaf, separated at sampling (Figures 1, S1-S8). Apical strips from leaves kept at 4°C showed less water loss

than those kept at RT, while only slight differences appeared in the basal strip. After four days of storage, the maximum efficiency of the photosystem II (F_v/F_m) dramatically decreased in all strips at RT, with no changes under Cold conditions. Likewise, decreases in chlorophyll levels depended on storage temperature, with carotenoids following similar patterns in the medial and basal strips, and no changes in the apical strip. These changes were manifested as a progressive yellowing and an appreciable water loss, starting in the apex and margins of the leaf blade (Figure 1). Leaves maintained at 4°C remained green, with a certain water loss only appearing after more than 8 days.

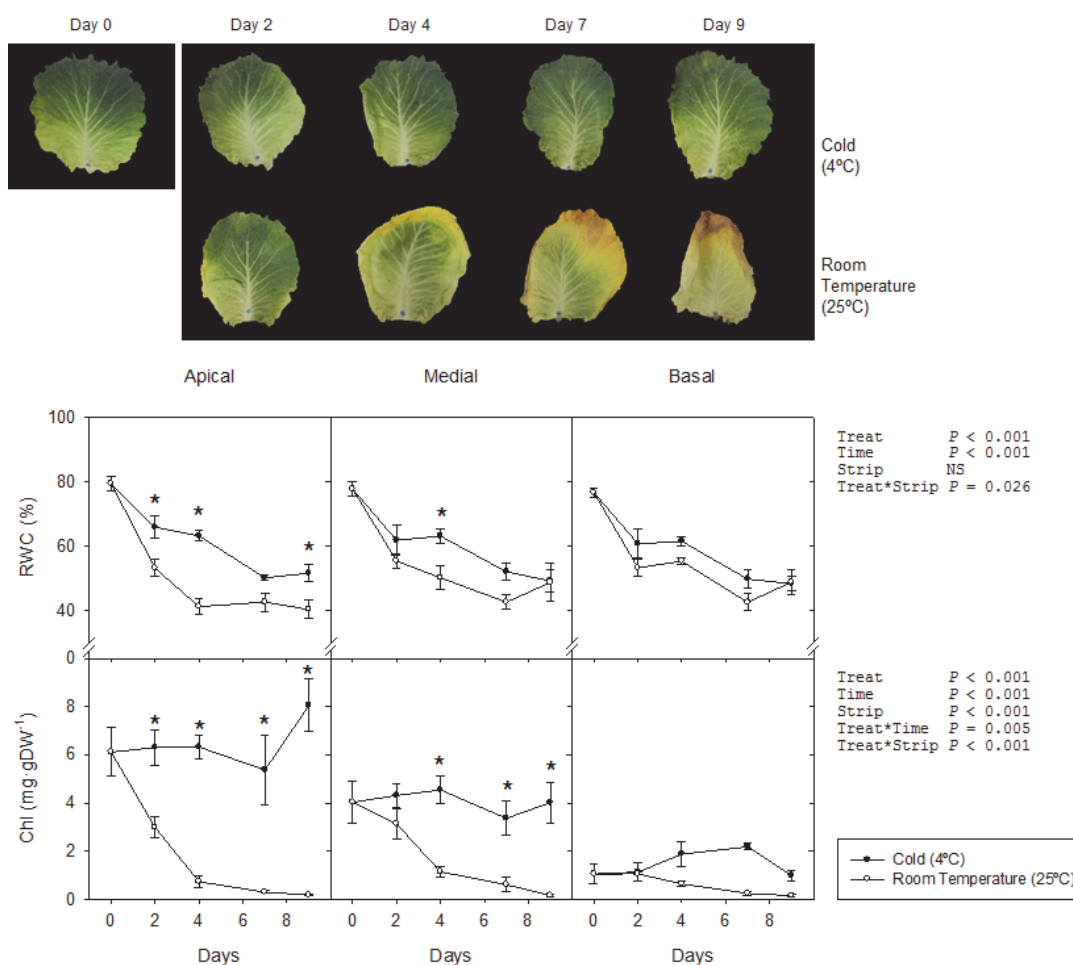


Figure 1. (up) Visual effects of Cold and Room Temperature storage conditions on green cabbage leaves. (down) Relative Water Content (RWC) and chlorophyll (Chl) of three strips of green cabbage leaves under Cold and RT storage conditions. mean±SE of five replicates. Three-way ANOVA *p*-values, asterisks indicate differences between experimental conditions.

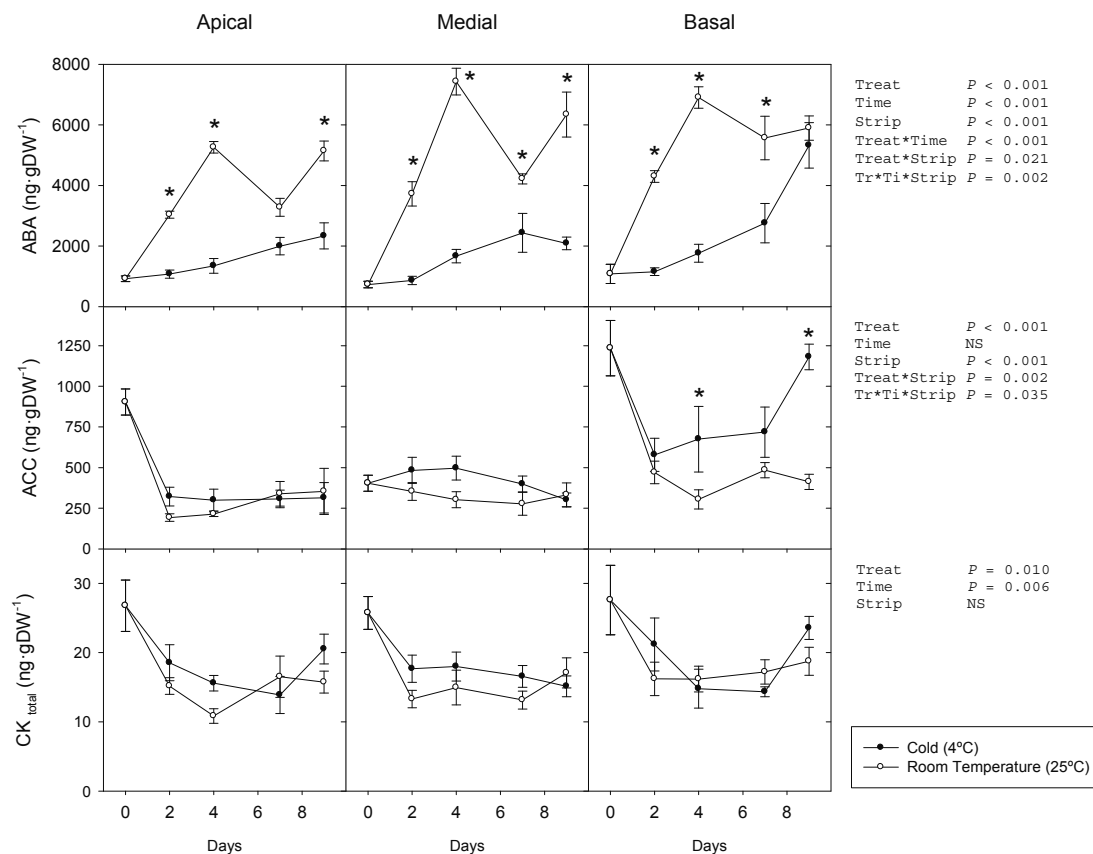


Figure 2. Abscisic acid (ABA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and CKtotal (analysed cytokinins sum) of three strips of green cabbage leaves under Cold and RT storage conditions. mean±SE of five replicates. Three-way ANOVA *p*-values, asterisks indicate differences between experimental conditions.

The storage conditions caused major changes in the hormonal profile (Figure 2, S5-8). After an initial decrease in cytokinins contents, no differences appeared in CK_{total} levels between strips. Only in the basal strip of the RT leaves, *t*-zeatin remained at the initial levels but decreased when kept at 4°C. Dehydrozeatin, the most abundant cytokinin, decreased during the first 4 days across all strips without differences by storage condition. ABA contents increased considerably in leaves stored at RT, following a similar pattern in the three analysed strips—up to 6-9-fold of initial levels. Cold-stored leaves showed a smaller rise in apical and medial strips (3-fold), while the basal strip presented a later but major increase. At the same time, ACC contents (immediate precursor of ethylene) showed distinct patterns in the different strips under each storage condition.

Characterization of cabbage post-harvest physiology after ABA signal manipulation by ABA/Pyr

ABA levels increased over 6-fold in tissue stored at RT. Therefore, in a subsequent experiment, ABA and/or pyrabactin (ABA/Pyr) were applied exogenously to leaves stored at RT every other day, for 8 days. These treatments did not significantly affect pigments levels (Chl, carotenoids; Figures 3, S9), but increased apical strip hydration, as compared to untreated leaves. The application of ABA, Pyr or the combined ABA+Pyr treatment increased membrane stability (MSI). Meanwhile, F_v/F_m , dependent on membrane integrity, showed no significant difference between treatments. MDA levels, a product of lipid peroxidation, also did not present significant differences. Neither hydrosoluble (ascorbic acid, ascorbate redox

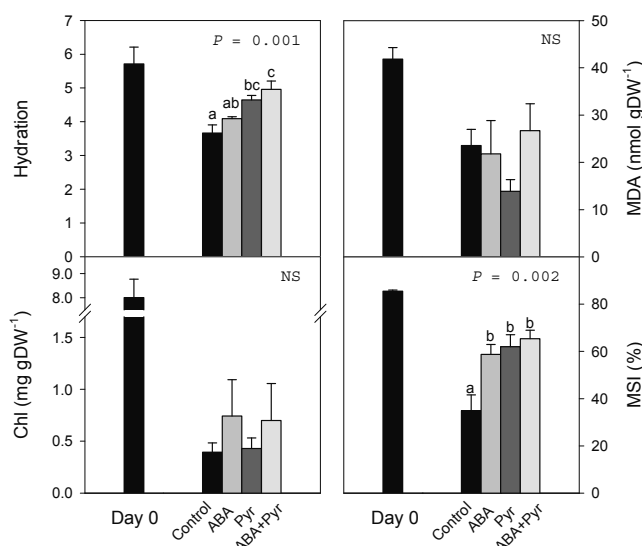


Figure 3. Hydration, chlorophyll (Chl), malondialdehyde (MDA) and membrane stability index (MSI) of the apical strip before and after 8 days of ABA/Pyr treatment under RT storage conditions. mean \pm SE of five replicates. ANOVA p -values, letters indicate differences between experimental conditions.

state) nor liposoluble (total carotenoids, α -tocopherol) antioxidants levels were different between treatments. Another measure of membrane and cell wall integrity, and cell homeostasis is the main soluble cations content. Pyrabactin treatment increased soluble cations, especially K^+ ; but no further differences as compared to untreated control leaves were found (Figure S10).

The manipulation of ABA signalling through storage with the repeated application of ABA/Pyr represented great changes to the hormonal profile (Figure 4). Application of ABA every other day caused a more than doubling of endogenous ABA contents, either when ABA was applied alone or combined with pyrabactin. No treatment showed significant changes in total cytokinins levels but several analysed cytokinins showed different responses to ABA/Pyr. Cytokinin

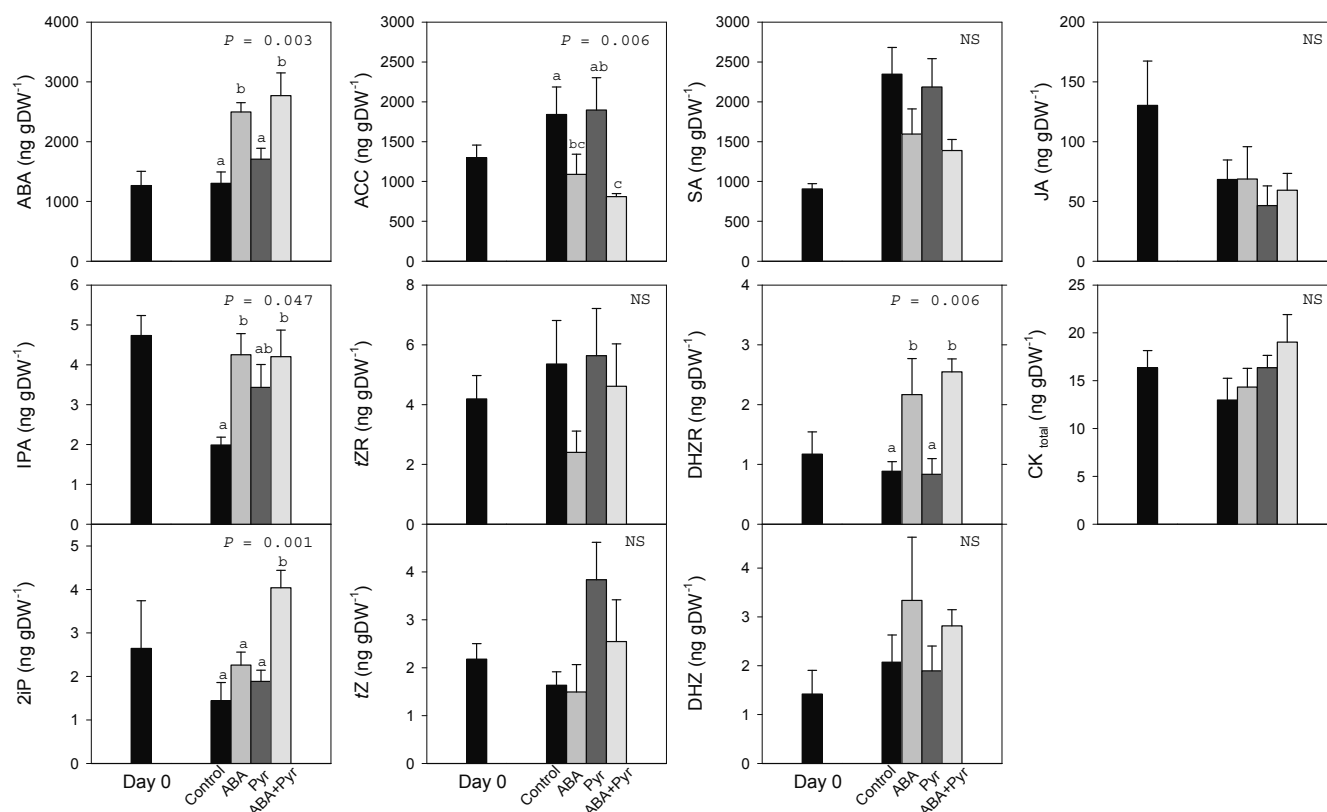


Figure 4. Effects of ABA application on endogenous hormonal balance. Abscisic acid (ABA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), total cytokinins (CKtotal), trans-zeatin (tZ), dihydrozeatin (DHZ), 2-isopentenyladenine (2iP), trans-zeatin riboside (tZR), dihydrozeatin riboside (DHZR) and isopentenyladenosine (IPA) of the apical strip of green cabbage leaves before and after 8 days of ABA/Pyr treatment under RT storage conditions. mean \pm SE of five replicates. ANOVA p -values, letters indicate differences between experimental conditions.

nucleosides IPA and DHZR contents rose with ABA treatments (alone or combined with Pyr). Only the combined ABA+Pyr treatment increased 2iP levels, while Pyr alone had no significant effect on cytokinins profile. After 8 days, ACC levels in Pyr treated leaves remained at the same level of the control, but were halved after ABA and the ABA+Pyr combined treatment.

Thus, ABA and ABA+Pyr treatments raised ABA levels, impacting water content and membrane integrity, but also representing notable effects on ACC levels and individual CKs nucleosides and free bases.

Transcriptomic analysis of ABA/Pyr treatment effects

In order to better understand the effects of storage and ABA signalling manipulation through ABA/Pyr treatment, we performed a transcriptomic analysis of its effects on the apical strip. After 8 days at RT conditions, total RNA was extracted from the apical strip of three biological replicates for each treatment (control, ABA, Pyr, ABA+Pyr). The HiSeq2000 sequencing platform generated 21.8-30.2 million 100-bases paired-end reads for each of the twelve libraries (4 conditions x 3 biological replicates, Table S1) for a total 306,200,398 raw reads. Quality and rRNA content was assessed with FastQC (Andrews, 2010) and ribopicker (Schmieder *et al.*, 2012). Low quality reads and reads mapped to rRNA were removed for downstream analyses, resulting in 21.5-29.9 million high quality reads (Table S1).

Since no comprehensive transcriptome was available for *Brassica oleracea*, we aligned the high quality reads to *Brassica oleracea* v1.0 reference genome (Liu *et al.*,

2014). For this study, the sequencing depth was at least 40.5X per biological replicate (for 630Mb genome size (Liu *et al.*, 2014)), which is sufficient coverage for differential expression analyses (Sims *et al.*, 2014). 44-47% reads mapped to the reference genome (36-38% concordant read pairs, 3-5% multiple alignment), generating 37963 unique assembled transcripts (of 45758 predicted protein-coding genes in the reference genome). We checked the completeness of our assembled *B. oleracea* transcriptome by comparing their sequences to a core set of embryophyta genes using BUSCO (Simão *et al.*, 2015). The results revealed that 22.5% of BUSCO genes were “complete”, 17.3% “fragmented”, and the remaining 60.2% “missing” out of 1440 BUSCO genes. By this assessment, the quality and representability of our assembled transcriptome in relation with an expected comprehensive transcriptome were limited, probably due to the intrinsic limitations of this benchmark with species with complex polyploidy (Simão *et al.*, 2015) and the senescent nature of the material, representing very specific tissue and conditions. TRAPID (Van Bel *et al.*, 2013) provided an assessment of transcripts structure and completeness, by comparing transcript length to the lengths of its associated gene family. With an average sequence length of 1126 bases, 59.9% presented starting codons and 78.4% stop codons. 89% were ascribed to a gene family, with 37.1% of the transcripts classified by TRAPID as full-length or quasi full-length, and 50.3% as partial. 79.4 and 79.8% presented GO functional annotation and identified protein domains, inferring function of most reconstructed transcripts. This indicates that the transcriptome is of sufficient quality to be used to quantify gene expression data from the 4 treatments.

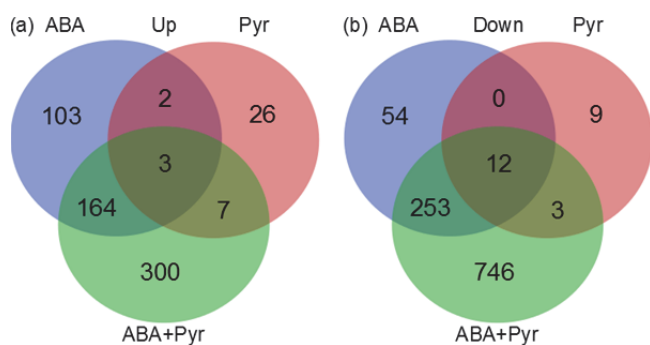


Figure 5. Number of differentially expressed transcripts between every two treatments and the number of joint differentially expressed transcripts.

Therefore, the data was used for differential expression analysis. There were 592, 62 and 1488 differentially expressed transcripts (ABA, Pyr and ABA+Pyr, respectively). Containing 1676 unique differentially expressed transcripts between ABA/Pyr and control conditions with a false discovery rate (FDR) < 0.05 (Figure 5, Table S2). After blastx versus the Viridiplantae nr database, and GO (Gene Ontology) mapping, GO enrichment analyses of differently up-regulated and down-regulated genes were performed to evaluate the impacts of ABA/Pyr treatment (Table S3).

ABA metabolism and signalling responses to ABA/Pyr treatment

Application of ABA every other day more than doubled endogenous ABA contents (Figure 4), either when ABA was applied alone or combined with pyrabactin (ABA+Pyr). We hypothesised that the increased ABA contents may affect ABA metabolism, transport and signalling. ABA and/or Pyr (ABA/Pyr) treatments represented no marked changes in the transcriptional regulation of ABA biosynthesis. However, ABA catabolism and ABA release from reversible conjugation were down-regulated by ABA+Pyr (Figure 6). ABA transporters are a regulation point for the modulation of development and physiological ABA responses. Genes encoding those located in the cytosolic membrane were expressed

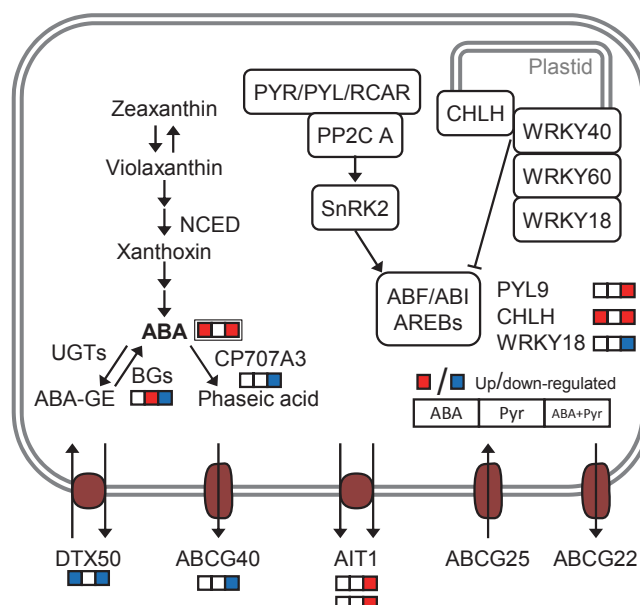


Figure 6. ABA metabolism and signalling. DE transcripts, single border; metabolites, double border. Proteins: ABF, ABA-responsive elements-binding factor; ABI, ABA-insensitive; BG, beta-1,3-glucanase; CHLH, magnesium chelatase subunit H; NCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; PYL, PYR1-like; PYR, pyrabactin resistance; RCAR, regulatory component of ABA receptor; SnRK, SNF1-related protein kinase; UGTs, UDP-glucosyl transferase; WRKY, WRKY DNA-binding protein. Metabolites: ABA-Glc, ABA-glycose ester conjugates.

(*ABCG22*, *ABCG25*, *ABCG40*, *DTX50*, *AIT1*), but not those in the vacuole (*ABCC1/MRP1*, *ABCC2/MRP2*). The continuous rise of ABA levels, caused a transcriptional down-regulation of transporters associated with ABA sensitivity (*DTX50*, *ABCG40*), while the vascular ABA importer *AIT1/NRT1.2* was up-regulated.

Two of the three putative ABA receptor families presented transcriptional changes after ABA/Pyr treatments. *PYR1* and *PYL1,5,6,7,8,9* transcripts were detected while *PYL9* was up-regulated by ABA+Pyr. Downstream the core ABA signalling pathway, targets of SnRK2 kinases activated by ABA perception were also up-regulated by ABA+Pyr. Notably genes encoding bZIP transcription factors: *AREB1/ABF2* (ABA+Pyr up-regulated promoter of ABA signal); and *AFP3* and *AFP4/TMAC2* (ABA+Pyr down-regulated inhibitor of ABA signal). The potassium

channel KAT1 (regulated by SnRK2) was transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr, like SYNTAXIN121 (SYR1/PEN1) that positions KAT1 in different compartments, thus regulating fast responses to ABA. The plastidic ABA signal pathway was also transcriptionally responsive to ABA/Pyr. While *CHLH* was up-regulated after ABA and ABA+Pyr, *WRKY18*—modulating plastidic ABA signal transduction—was down-regulated by ABA+Pyr. Meanwhile, many ABA-responsive transcription factors involved in abiotic and biotic stress cross-talk were transcriptionally down-regulated, but only by ABA+Pyr (*CBF4/DREB1D/ERF028*, *DREB19/ERF046*, *DREB2C*, *ABR1/ERF111*, *ERF1*, *MYB102*, *MYB108*, *AIB*, *CAF1b*, *ZFHD1*).

ABA/pyr did not affect the transcriptional regulation of ABA synthesis, while down-regulating its catabolism. Thus, the continuous rise of ABA levels coincided with a down-regulation of ABA transporters. ABA

receptors *PYL9* and *CHLH* were up-regulated by ABA or ABA+Pyr, while a number of ABA-responsive transcription factors and effectors were deregulated only by ABA+Pyr (Figure 10a).

Ethylene metabolism and response

The treatment with ABA and ABA+Pyr, and the consequent rise in ABA levels resulted in major changes to ethylene metabolism and its regulation. After 8 days, ACC (immediate precursor of ethylene) levels in Pyr treated leaves remained at the same level of the control, but were halved after ABA or the ABA+Pyr combined treatment (Figure 4). In plants, ethylene is synthesised from methionine through the intermediates S-adenosyl-methionine (SAM) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) by the successive action of SAM synthetases, ACC synthases and ACC oxidases (Wang *et al.*, 2002). After 8 days, genes encoding SAM synthetases (*MTO3*, *MAT3*) were down-

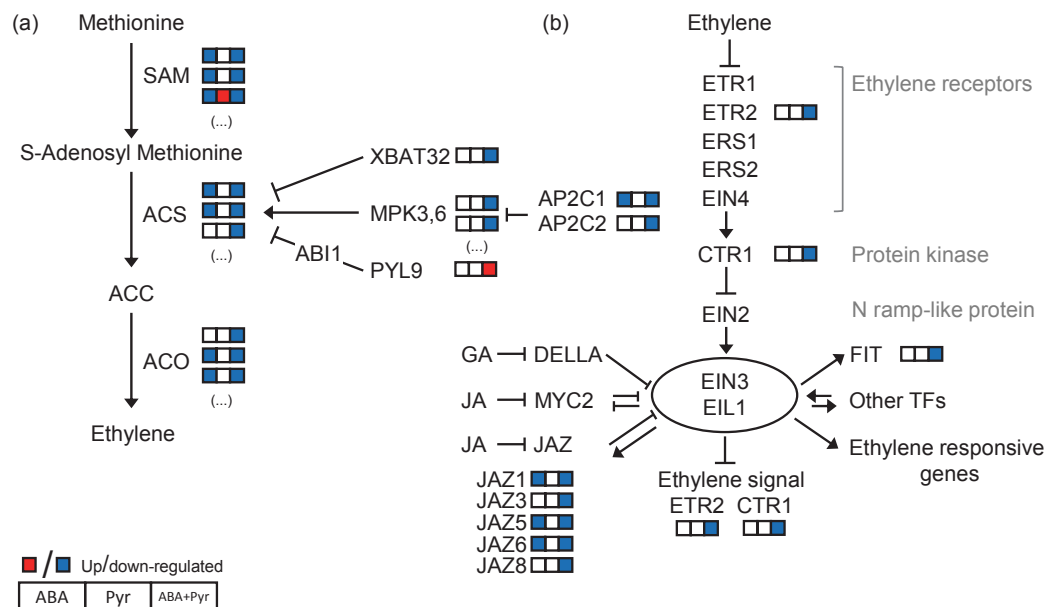


Figure 7. (a) Ethylene metabolism and (b) signalling. DE transcripts, single border; metabolites, double border. Proteins: ABI1, ABSCISIC ACID-INSENSITIVE1; ACO, ACC oxidase; ACS, ACC synthase; AP2C, probable protein phosphatase 2C; CTR, constitutive triple response; EIL, EIN3-like; EIN, ethylene-insensitive; ETR/ERS, ethylene response; FIT, FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR; JAZ, jasmonate ZIM domain-containing protein; MPK, mitogen-activated protein kinase; PYL9, PYR1-like 9; SAM, S-adenosylmethionine synthetase; XBAT32, E3 ubiquitin-protein ligase XBAT32.

regulated by ABA and ABA+Pyr, but up-regulated by Pyr (Figure 7a). In the next step of ethylene synthesis, putative ACC synthase transcripts (*ACS2,6,7*) were also down-regulated by ABA and ABA+Pyr. As a key regulator of ACC and ethylene levels, ACS activity is strictly regulated. Different activation and inhibition elements were transcriptionally affected by ABA/Pyr treatment (Fig 7b). Finally, homologous to *Arabidopsis ACO1,2* were down-regulated by ABA and ABA+Pyr.

The manipulation of ABA levels and signalling also represented changes in ethylene response pathways (Figure 7b). The ethylene receptor ETR2 and the protein kinase CTR1—negative regulators of ethylene signal transduction—were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr. Downstream, transcription factors EIN3 and EIL1 promote the expression of ethylene-responsive genes and are modulated by other regulators and transcription factors. First, EIN3/EIL1 modulate ethylene signalling by targeting CTR1 and ETR2 in a negative feedback loop and we found that both were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr. Second, EIN3/EIL1 interact with other hormonal pathways as a point of co-regulation, as revealed by a recent ChiP-seq analysis (Chang *et al.*, 2013). This is the case for the jasmonate-responsive repressors JAZ and many *JAZ* homologs were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr, or by both ABA and ABA+Pyr. Targets of EIN3/EIL1, like many ethylene-responsive transcription factors (ERFs), were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr treatment. Notably, between the transcriptionally regulated *ERFs* were genes encoding transcription factors involved in the regulation of stress signal pathways and redox homeostasis (*ERF1*, *ERF2*, *ERF072/RAP2.3*, *ERF113/RAP2.6L*), but also regulators of hormonal biosynthesis and responses, like ABA

(*ERF028/CBF4/DREB1D*, *ERF111/ABR1*, *ERF113/RAP2.6L*), CKs (*ERF066/CRF4*), gibberellins (*ERF032/DDF1*), and jasmonates and auxins (*ERF109*).

In summary, the manipulation of ABA levels and signalling represented changes in the regulation of ethylene biosynthesis, perception, signalling and responses (Figure 10a). Ethylene biosynthesis genes and elements required for its perception and response were generally down-regulated by ABA and ABA+Pyr, while limited effects of Pyr alone were observed.

Cytokinins metabolism and response

ABA/Pyr application caused changes in CKs profile (Figure 4). However, transcriptional regulation of genes encoding CKs biosynthesis or catabolism was not observed (Figure 8). Nevertheless, the effects of ABA/Pyr on cytokinin nucleosides IPA and DHZR, and the free base 2iP correlated with regulation of CKs metabolism. Genes encoding adenine phosphoribosyl transferases (APRTs) and adenosine kinases (ADKs)—generating CKs nucleotides from different CK

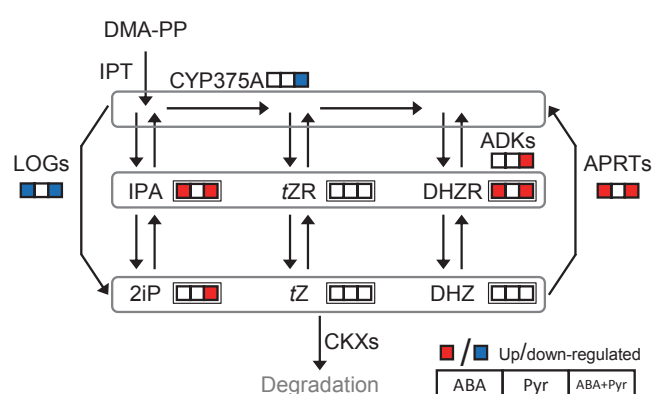


Figure 8. Cytokinins metabolism. Transcripts, single border; metabolites, double border. Proteins: ADKs, adenosine kinase; APRT, adenine phosphoribosyltransferase; IPT, isopentenyltransferase; LOG, LONELY GUY; CKX, cytokinin oxidase/dehydrogenase. Metabolites: DHZR, dihydrozeatin riboside; DHZ, dihydrozeatin; DMA-PP, dimethylallyl pyrophosphate; 2iP, isopentenyladenine; IPA, isopentenyladenosine; tZR, trans-zeatin riboside; tZ, trans-zeatin.

forms—were up-regulated by ABA and ABA+Pyr, while genes encoding antagonistic LOG7 isoforms, producing 2iP, Z and DHZ, were down-regulated by ABA and ABA+Pyr. The cytokinin hydroxylase encoding gene *CYP735A2* which transforms iP-type to Z-type CKs was down-regulated by ABA+Pyr. Meanwhile, the positive regulator of cytokinin levels *SOFL1* was up-regulated after ABA+Pyr treatment. No transcriptional regulation of CKs signal pathway was observed, while CKs-responsive elements were generally up-regulated (Figure 10a). Yet, the negative regulator of CKs signalling ubiquitin-ligase *KISS ME DEADLY 3 (KMD3)*, targeting type-B ARRs, was up-regulated by Pyr and ABA+Pyr.

Thus, ABA/Pyr treatment transcriptionally modified CK interconversion and the associated individual CKs levels. Moreover, it should be noted that genes encoding many enzymatic activities responsible of CKs interconversion have not been identified yet (Zhang *et al.*, 2013), limiting the predictive value of the gene expression data.

ABA signalling manipulation affects hallmarks of senescence

ABA/Pyr treatments altered key senescence hormones levels (ABA, CKs, ACC/ethylene) and the transcriptional regulation of the underlying signal and response pathways, suggesting a delay in leaf senescence. Hence, we examined several traits associated with the onset of senescence and its progression (Figure 10c).

Regulators of senescence—in the crosstalk between redox homeostasis and senescence progression—were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr. Notably, the negative regulators of senescence *VNI2/ANAC083* and *JUNGBRUNNEN1 (JUB1/ANAC042)*; and the positive regulator *ATAF2/ANAC081*. *JUB1* has

also been classified as a leaf longevity regulator. Meanwhile, *GOLDEN2-LIKE2 (GLK2)*, a major negative regulator of senescence, was transcriptionally up-regulated by ABA and ABA+Pyr.

ABA and ABA+Pyr, but not Pyr, transcriptionally up-regulated photosynthesis positive transcriptional regulators (*GLK2*), but also regulators of the photosynthesis machinery and metabolic flux (*RUBISCO ACTIVASE (RCA)*, *FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE1,2 (FBA1,2)*, *SEDOHEPTULOSE-1,7-BISPHOSPHATASE (SBPase)*). Thus, maintaining chloroplast function and allowing its adaptation to environmental and redox changes. In addition to *GLK2* transcriptional up-regulation, we observed the subsequent up-regulation of genes involved in chloroplast function maintenance. Other positive plastid regulators were also transcriptionally up-regulated, including *PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE6,16 (PTAC6,16)* and *CHLOROPLAST SENSOR KINASE (CSK)*. Furthermore, numerous components of the plastidic translation machinery were up-regulated.

Genes involved in the maintenance of photosynthesis machinery were also up-regulated (Figure 10c): from chlorophyll biosynthesis to many elements of the photosynthetic membrane (including subunits of photosystems I and II, Light Harvesting Complexes, ATP synthase, plastocyanin, and NAD(P)H dehydrogenases). Calvin cycle enzymes were also transcriptionally up-regulated, notably *FBA1,2*, *PHOSPHORIBULOKINASE (PRK)*, *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A (GAPA)*, *FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE (FBP)* and *SBPase*. These included elements required for redox regulation, but other genes associated with redox homeostasis were also

affected. *ROTAMASE CYP4 (ROC4)*, required for thiol accumulation for the build-up of cellular reduction potential was transcriptionally up-regulated by ABA and ABA+Pyr.

Cell wall and membrane biogenesis and remodelling are essential for cell homeostasis. The biosynthesis of precursors of primary and secondary cell wall polymers and its assembly and remodelling pathways were transcriptionally regulated by ABA and ABA+Pyr (Figure 10c, Table S3). General phenylpropanoids biosynthesis, transcriptionally down-regulated by ABA and ABA+Pyr, provides precursors for lignin, lignans, cutin, and suberin. Downstream, the biosynthesis of lignin and lignans precursors was also transcriptionally down-regulated by ABA and ABA+Pyr. On the other hand, many genes involved in membrane and cell wall remodelling were up-regulated by ABA/Pyr. Notably, glycosyl hydrolases, xyloglucan transglycosylases and cell wall modification regulators like expansins, peroxidases, subtilisins, and *WALLS ARE THIN1*.

ABA/Pyr treatments promoted changes in the contents of key senescence hormones (ABA, CKs, ACC/ethylene) and in the regulation of underlying signal and response pathways, suggesting a delay in leaf senescence. We found transcriptional changes of genes involved in chloroplast function maintenance, redox homeostasis, membrane and cell wall homeostasis; as well as major regulators of senescence. Hence, we observed physiological and transcriptional changes consistent with a delayed onset of senescence.

Post-translational regulation through ubiquitin-ligases

RNA-seq data provides high-throughput and systematic information about transcriptional regulation, but in addition can give insights into another major regulatory

point: the post-translational regulation by ubiquitin ligases-targeted proteasomal degradation. For example, many proteins involved in ABA signalling and response are subject to regulation by ubiquitination (Yang *et al.*, 2017). The ubiquitin-ligases AIP2 and RGLG1 were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr; AIP2 is a negative regulator of ABA response, while RGLG1 is a positive regulator of ABA signalling, targeting ABA-dependent degradation of PP2CA (Wu *et al.*, 2016). RDUF1 and 2, positive regulators of ABA responses with not yet identified targets, were transcriptionally down-regulated by ABA or ABA+Pyr. Contrarily, RGLG2, transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr, is a cross-talk point between growth and stress responses, while modulating hormonal metabolism and response (Cheng *et al.*, 2012). Both the ubiquitin-ligase PUB23 and a proteasome regulatory subunit (RPN1A) —required for stress responses and innate immunity in a reportedly ABA-independent way (Seo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2012) —were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr. Meanwhile, transcriptionally up-regulated by Pyr and ABA+Pyr, KISS ME DEADLY3 (KMD3) targets phenylpropanoids biosynthetic enzymes (Zhang *et al.*, 2015) and type-B ARR cytokinins signal elements (Kim *et al.*, 2013). The results therefore suggest that ABA/Pyr treatments cause changes in protein contents through altering ubiquitination.

Biotic resistance trade-offs

Neither jasmonic acid (JA) nor salicylic acid (SA) levels were affected by ABA/Pyr treatments for 8 days. But JA and SA metabolism and response pathways presented transcriptional regulation in response to ABA/Pyr. 19S- and 13S-LIPOXYGENASE isoforms (*LOX3,4,5*) involved in oxylipins metabolism (including jasmonates) were down-regulated by all ABA/Pyr applications.

Other steps of JA metabolism were also transcriptionally down-regulated by ABA and/or ABA+Pyr, but not by Pyr alone. Genes encoding JA signal and response elements were down-regulated by ABA and ABA+Pyr, particularly several JAZ isoforms. Salicylates biosynthesis was also transcriptionally down-regulated with two isoforms of *PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE1 (PAL1)* 10-times less expressed after ABA and ABA+Pyr treatment. At the same time, *KMD3*, targeting PAL for proteasomal degradation, was transcriptionally up-regulated by Pyr and ABA+Pyr. Genes encoding salicylate O-methyltransferases responsible of methyl-jasmonate formation were down-regulated by ABA and ABA+Pyr, while acetone-cyanohydrin lyases involved in salicylic hydrolysis were transcriptionally up-regulated. Genes encoding regulators of salicylic acid-related defence responses were down-regulated by ABA and/or ABA+Pyr, but not by Pyr. The biosynthesis of defence phenylpropanoids (phytoalexins) was also transcriptionally down-regulated by ABA and ABA+Pyr. Generally, many effectors and

regulators required for defence responses were transcriptionally down-regulated by ABA and ABA+Pyr (Figure 10b, Table S4).

Impact on glucosinolates and defence phenylpropanoids signatures

Glucosinolates (GSLs) are sulphur-rich secondary metabolites divided according to their amino acid precursors: aliphatic GSLs (derived from methionine, alanine, valine, leucine, or isoleucine), aromatic GSLs (from phenylalanine or tyrosine) and indole GSLs (from tryptophan). With these starting substrates, GSLs biosynthesis comprises three independent steps: chain elongation, formation of the core GSL structure, and secondary modifications (Figure 9).

First, sulphur assimilation key enzymes (ATP-SULFURYLASE3, ADENYLYL-SULFATE KINASE1,2, SERINE ACETYLTRANSFERASE2-1) were transcriptionally down-regulated by ABA and ABA+Pyr; while the sulphur metabolism activator *ROC4* was up-regulated by the same treatments. The biosynthesis of multiple amino

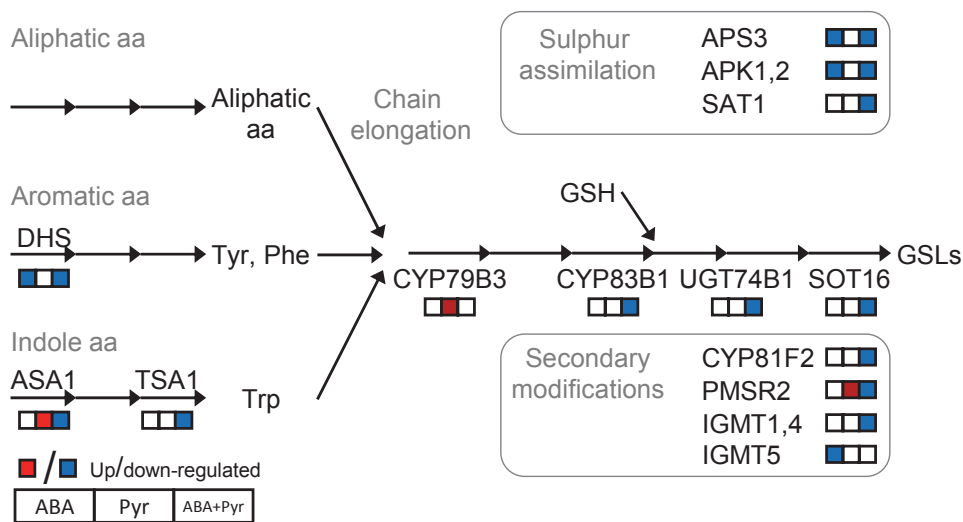


Figure 9. Glucosinolates (GSLs) metabolism. Transcripts, single border; metabolites, double border. Metabolites: aa, amino acid; GSH, glutathione; Phe, phenylalanine; Trp, tryptophane; Tyr, tyrosine. Proteins: APK1,2, APS-kinase; APS3, ATP-sulfurylase3; ASA1, anthranilate synthase1; DHS, DAHP synthase1; IGMT, Indole glucosinolate O-methyltransferase; PMSR2, peptidemethionine sulfoxide reductase2; SAT1, serine O-acetyltransferase; SOT16, sulfotransferase16; TSA1, tryptophan synthase1; UGT, UDP-glucosyl transferase.

acid precursors was also deregulated. Aromatic amino acids biosynthesis—precursors of aromatic GSLs and phenylpropanoids—was transcriptionally down-regulated by ABA and ABA+Pyr, including the first committed step (*2-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE, DHS*). The limiting step for tryptophan synthesis, precursor of auxins, melatonin and indole GSLs, *ANTHRANILATE SYNTHASE1 (ASA1)* was transcriptionally up-regulated by Pyr but down-regulated by ABA+Pyr. Downstream, tryptophan synthase was transcriptionally down-regulated by ABA.

Genes encoding all described steps of the GSL core formation were down-regulated by ABA+Pyr: *CYP79B3, CYP83B1, UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 74B1*, and several *SULFOTRANSFERASE16* homologues. *CYP79B3* was uniquely up-regulated by Pyr. Further, genes involved in GSLs modification pathways were down-regulated by ABA and ABA+Pyr, encoding a number of indole glucosinolate O-methyltransferases, *CYP81F2* and *PEPTIDEMETHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE2*. Meanwhile, Pyr up-regulated and ABA+Pyr down-regulated *CYP71A12*, involved in the degradation of indole GSLs but also in the synthesis of the defence phenylpropanoid camalexin.

Phenylpropanoids are a family of metabolites with the aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine as precursors, contributing to responses to abiotic stress and defence responses. ABA, and further ABA+Pyr, transcriptionally down-regulated the biosynthesis of these precursor amino acids (discussed above), but relevant downstream enzymes were also deregulated. ABA and ABA+Pyr down-regulated the expression of isoforms of all the steps of the general phenylpropanoids pathway

(*PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE, CINNAMATE-4-HYDROXYLASE, 4-CUMARATE-COA-LIGASE*), generating *p*-coumoyl-CoA. This is a shared precursor of flavonoids, anthocyanins, and other soluble phenylpropanoids, but also of cell wall polymers (lignin, lignans, cutin and suberin). Genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of lignin, lignans, and anthocyanins were also down-regulated by ABA and ABA+Pyr. Meanwhile, a number of benzoyltransferases, aminotransferases, and γ -glutamyl peptidases required for defence phenylpropanoids (phytoalexins) biosynthesis were also transcriptionally down-regulated by ABA and ABA+Pyr. Finally, transcriptionally up-regulated by Pyr and ABA+Pyr, the ubiquitin-ligase *KMD3* targets multiple phenylpropanoids biosynthetic enzymes, negatively regulating these pathways.

ABA/Pyr treatment caused transcriptional deregulation of genes involved in the metabolism of GSLs, phenylpropanoids and precursor amino acids, likely changing its metabolic signatures. ABA and further ABA+Pyr transcriptionally down-regulated sulphur assimilation, aromatic and indole amino acids biosynthesis, the GSLs core formation, several enzymes involved in GSLs secondary modifications and phenylpropanoids biosynthesis. Meanwhile, Pyr uniquely upregulated steps of the biosynthesis of indole amino acids, and steps of the GSLs core formation and side-chain conversion of aliphatic GSLs. Thus, ABA and/or Pyr treatment generated unique expression signatures of genes involved in biosynthesis of GSLs and phenylpropanoids.

Discussion

ABA signal modification suppresses senescence

We observed how the application of ABA but not Pyr impacted ABA signalling, up-

regulating *PYL9* expression, reducing water loss and keeping membrane integrity after 8 days at room temperature storage conditions. Further, we observed effects on the metabolism, signalling and actual levels of cytokinins and ACC/ethylene, two sets of phytohormones involved in senescence regulation. At the same time, ABA/Pyr treatments manipulated the expression of major senescence regulators and did not promote senescence, but stimulated redox homeostasis, chloroplast function and cell wall remodelling. *PYL9/RCAR1* has recently been related to leaf senescence regulation. ABA acts through *PYL9* to limit transpirational water loss in young leaves, while promoting leaf senescence in an ethylene-independent manner through *SnRK2s* (Zhao *et al.*, 2016). Further, an *Arabidopsis* *PYL9* overexpressor showed reduced electrolyte leakage (Zhao *et al.*, 2016).

Two major negative regulators of senescence were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr, *VNI2/ANAC083* and *JUNGBRUNNENI (JUB1/ANAC042)*. These two genes reportedly integrate ABA signalling and stress responses to leaf senescence progression (Wu *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011). Otherwise, positive regulators of senescence were ABA+Pyr down-regulated, like *ATAF2/ANAC081*, a stress-responsive transcription factor involved in ABA-inducible leaf senescence but also in the regulation of basal defence responses (Delessert *et al.*, 2005; Takasaki *et al.*, 2015). At the same time, the negative regulator of senescence *GOLDEN2-LIKE2 (GLK2)* was transcriptionally up-regulated by both ABA and ABA+Pyr. *GLK2* is a key nuclear transcription factor that regulates chloroplast development (Waters *et al.*, 2008) and is a positive regulator of the photosynthetic apparatus—including chlorophyll biosynthesis, light and dark photosynthesis reactions (Waters *et al.*, 2009) —, integrating responses to the environment

and endogenous cues to keep redox homeostasis while preventing senescence (Rauf *et al.*, 2013). Indeed, ABA and ABA+Pyr promoted genes involved in chloroplast function, up-regulating plastid translation machinery, chlorophyll biosynthesis, and components of the photosynthetic membrane and Calvin cycle.

Enzymes controlling metabolic fluxes, and thus chloroplast function, were also induced by ABA and ABA+Pyr. A good example are chloroplastic fructose-bisphosphate aldolases (FBAs), regulating fluxes in many central metabolism pathways. Changes in FBA activity are required for photosynthesis acclimation in response to abiotic stressors (Lu *et al.*, 2012). Further, FBAs are phosphorylated in response to ABA, diminishing its abundance (Ghelis *et al.*, 2008).

The discussed positive regulation of photosynthetic machinery may provide enhanced redox homeostasis, which may impact leaf senescence as a result of an increased capability to cope with redox changes. Further, *ROC4* was also transcriptionally up-regulated and is required for thiol accumulation for the regulation of stress-responsive redox homeostasis and build-up of cellular reduction potential (Park *et al.*, 2013). Genes encoding ABA-responsive effectors relevant for cellular homeostasis—e.g. *GLUTATHIONE PEROXIDASE 7* (Chang *et al.*, 2009), *TOUCH 2* (Delk, 2005) *CPK32* (Choi *et al.*, 2005) — were also up-regulated by ABA+Pyr. Redox signalling is essential for the adaptation of metabolism in response to environmental and endogenous cues in order to maintain cellular function. Further, ABA and ABA+Pyr up-regulated the expression of *CHLOROPLAST SENSOR KINASE (CSK)*, encoding a regulator of chloroplast transcription responsive to plastoquinone redox state (Puthiyaveetil *et al.*, 2008).

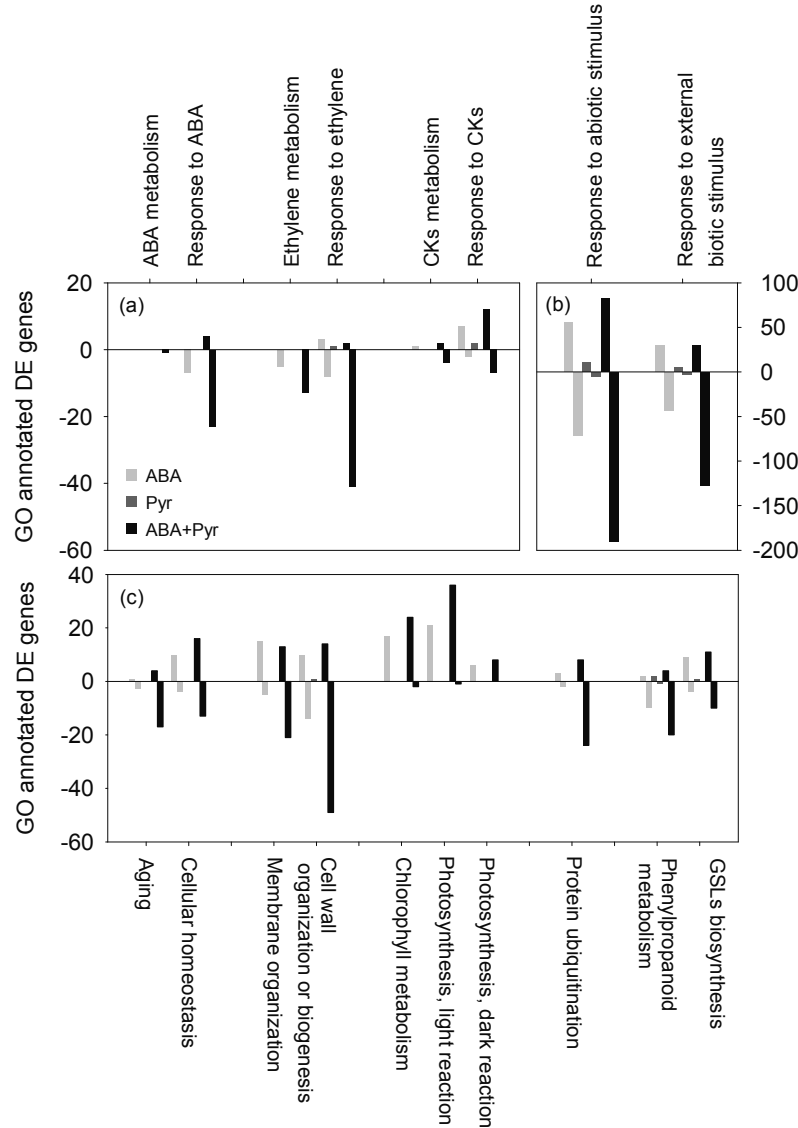


Figure 10. Differentially expressed transcripts annotated by certain GO terms. From left to right: (a) GO:0009687 abscisic acid metabolic process; GO:0071215 cellular response to abscisic acid stimulus; GO:0009692 ethylene metabolic process; GO:0009723 response to ethylene; GO:0009690 cytokinin metabolic process; GO:0009735 response to cytokinin. (b) GO:0009628 response to abiotic stimulus; GO:0043207 response to external biotic stimulus. (c) GO:0007568 aging; GO:0019725 cellular homeostasis; GO:0061024 membrane organization; GO:0071554 cell wall organization or biogenesis; GO:0015994 chlorophyll metabolic process; GO:0019684 photosynthesis, light reaction; GO:0019685 photosynthesis, dark reaction; GO:0016567 protein ubiquitination; GO:0009698 phenylpropanoid metabolic process; GO:0019761 glucosinolate biosynthetic process.

ABA and ABA+Pyr up-regulated the expression of *MAGNESIUM CHELATASE SUBUNIT H (CHLH)* and *GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4)*, necessary for coupling the expression of nuclear genes to the functional state of the chloroplast (Pfannschmidt, 2010). However, other retrograde signalling elements were transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr, like *ROC4* and the chloroplastic oxygen singlet-responsive AAA-ATPase (Simkova *et al.*, 2012). Outside the chloroplast, the mitochondrial alternative oxidase, involved in redox homeostasis and

retrograde signalling (Konert *et al.*, 2015), was transcriptionally down-regulated by ABA+Pyr. Nevertheless, the results are consistent with observations that nuclear transcription is coordinated with the functional state of the chloroplast through retrograde signalling mechanisms to maintain redox homeostasis in a changing environment.

ABA deregulated major senescence and cell homeostasis regulators, suppressing senescence and maintaining chloroplast functionality in challenging storage conditions. The joint treatment with both ABA and Pyr at the same concentration generally promoted

further the effects shown by ABA only treatment.

ABA/Pyr decreases biotic stress resistance

The metabolism of salicylates and jasmonates, with its main role in defence against biotrophs and necrotrophs, is influenced by both biotic and abiotic stress factors (Xia *et al.*, 2015) and can be affected by temperature (Miura and Tada, 2014). ABA has positive or negative effects on defence responses depending on the nature (necrotrophic or biotrophic) of the infection (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011) through enhanced redox buffering capacity and ABA signalling that affects signalling and defence mechanisms (Bartoli *et al.*, 2013; Ton *et al.*, 2009). ABA/Pyr treatment represented a significant transcriptional down-regulation of JA and SA metabolism, and of effectors and modulators of responses to external biotic stimulus. This therefore suggest a reduction of the capacity of the leaf to resist biotic stress.

ABA/Pyr may affect glucosinolates and phenylpropanoids profile

Glucosinolates accumulation is a desired trait associated with organoleptic and nutraceutical characteristics. Li *et al.* (2014) systematically identified transcription factors regulating glucosinolates profile. ABA signalling modification by treatments with ABA and/or Pyr affected the transcription of several of these. Including transcription factors that also regulate hormonal balance and growth like *DWARF AND DELAYED FLOWERING1 (DDF1)*; ABA down-regulated, ABA+Pyr up-regulated (Magome *et al.*, 2004)), or associated with abiotic stress responses and down-regulated by ABA+Pyr—*RELATED TO AP2.6L (RAP2.6L/ERF113)*; (Krishnaswamy *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012)) and *CBF4/DREB1D* (Haake *et al.*, 2002).

In addition, many genes involved GSLs biosynthesis *per se* where transcriptionally regulated. ABA/Pyr treatment down-regulated sulphur assimilation, aromatic amino acids and defence compounds synthesis. Treatments containing only pyrabactin enhanced the expression of key tryptophan and indole glucosinolates biosynthetic genes. GSLs levels are usually maximum at harvest but dependent on preharvest biotic and abiotic stressors (Velasco *et al.*, 2007). GSLs content not only depends on preharvest contents and enzymatic activity, but *de novo* biosynthesis of GSLs is more likely to occur during post-harvest storage (Villarreal-García *et al.*, 2016), and the manipulation of the environment including abiotic stressors and exogenous hormones has proven to modify GSLs content in fresh produce (Cisneros-Zevallos, 2003; Jones *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). There are previous reports of effects of ABA treatment on young leafy *Brassica*, including increased GSLs content in 5-day-old cabbage sprouts (Wang *et al.*, 2015), and in pak choy shoots (Hu and Zhu, 2013). Thus, in our study ABA/Pyr treatment potentially changed the cabbage glucosinolates profile and resulting organoleptic and nutraceutical traits.

Conclusions

ABA plays a major role in stress responses. Leaf harvest, or detachment, followed by RT storage induces severe drought stress and senescence. Therefore, a role for ABA in regulating post-harvest senescence is perhaps not surprising. Nevertheless, ABA's role in the regulation of senescence seems to depend on the age of the affected leaf (Jibrán *et al.*, 2013). While ABA stimulates senescence in old leaves it may suppress senescence in young tissue (Lee *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012), suggesting that the ABA's role depends on leaves to acquire the competence to senescence. This is perhaps best illustrated by recent work done by Zhao *et*

al., (2016) who showed that increased ABA signalling under severe drought stress accelerated senescence in older leaves, but induced drought resistance, and thus survival, in the younger leaves. We observed that ABA treatment through leaf post-harvest storage at room temperature affected major senescence hallmarks, including maintenance of chloroplast function, increased turgor and membrane integrity. This then suggests that the green cabbage leaves did not yet acquire the competence to senesce at the start of the experiment and that the induced early rise on ABA contents promoted homeostasis responses resulting in the suppression of senescence. Perhaps as a trade-off, ABA and pyrabactin application also down-regulated biotic stress regulators, likely making the leaf more susceptible to disease. At the same time, the application caused major changes to phenylpropanoids and glucosinolates metabolism transcriptional regulation, probably changing phenylpropanoids and glucosinolates signatures. These results pave the way for manipulating ABA signalling for improving the post-harvest quality of leafy vegetables stored at ambient temperature.

Experimental procedures

Plant material and experimental treatments

Green cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) from the same origin, selected for uniform size and colour, were purchased from a local supplier and transported to our laboratory at 4°C, 75% relative humidity (RH). Exterior leaves (with a dark green apex) were detached with a sharp scalpel, washed with running water and gently dried with absorbent paper. Only healthy heads were selected, with no signs of damage by manipulation or stress.

In experiment I, the post-harvest senescence of green cabbage leaves was studied under two storage conditions: Cold (4°C) and Room Temperature (RT, 25°C). The

leaves were stored in a cold room (4-5°C, 75±2% RH, darkness) for the Cold treatment, or in a plant growth chamber (Sanyo MLR 350H, Japan) at 25°C (RT), under the same conditions of humidity and darkness. In experiment II, the leaves were treated with ABA and/or pyrabactin, under the RT condition of experiment I. In experiment II, leaves were treated every other day with a uniform spray of different treatments over both sides of the leaf blade. Treatments with ABA 10⁻⁵M, Pyr 10⁻⁵M and ABA 10⁻⁵M + Pyr 10⁻⁵M were compared with a control treatment with the application solution, miliQ water with 0.5% dimethyl sulfoxide 0.1% Tween-20. Due to ABA light-sensitivity, all manipulations were done under minimal light. Unless stated otherwise, all chemicals were of HPLC grade or higher and purchased from Sigma-Aldrich (Spain).

As part of sampling, the leaf was transversally cut with a sharp scalpel with the help of a metallic rule in three strips by equal lengths of the baso-apical axis: apical, medial and basal (Figure S1). A longitudinal cut was performed through the three strips for the cutting of leaf discs for turgor and ion leakage determinations. The different strips were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. The strong midrib and major veins were discarded. All physiological and biochemical measures represent the average±SE of five biological replicates.

Physiological parameters

Relative water content (RWC) was determined as $(FW-DW) \times (TW-DW)^{-1}$ and hydration as $(FW-DW) \times DW^{-1}$; where FW is fresh weight; TW, turgid weight after imbibition with distilled water for 24h at 4°C in darkness; and DW, dry weight after oven-drying at 70°C until constant weight. Whole leaf biomass loss was measured as $[1 - (FW_{final} \times FW_{initial}^{-1})] \times 100$, where $FW_{initial}$ is

the fresh weight at the start of the experiment and FW_{final} at sampling. Measurements of the maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) were performed with a pulse-modulated fluorimeter mini-PAM (Walz, Germany). To assess membrane integrity, three discs of each sample were imbibed in miliQ-water sealed tubes at 25°C for 2 hours before a first measure of electric conductivity (EC_1). A second measure (EC_2)—to determine maximum leakage—was performed after 10min at 100°C. Membrane stability index (MSI, %) was calculated as $[1-(EC_2 \times EC_1^{-1})]^{-1} \times 100$. Lipid peroxidation was estimated by the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay, measuring the amount of malondialdehyde (MDA) after Hodges *et al.* (1999), taking into account the influence of interfering compounds.

Hormonal profiling

The extraction and profiling of phytohormones by UPLC-MSMS was performed as previously described (Müller and Munné-Bosch, 2011). Quantification considered recovery rates for each sample by using deuterated IS and authentic standards.

Pigments, vitamin C and vitamin E determination

For the determination of pigments and vitamin E, *ca.* 50mg of frozen tissue was ground and repeatedly extracted with ice-cold methanol and ultrasonication. Chlorophyll and carotenoid levels were measured spectrophotometrically (Lichtenthaler and Wellburn, 1983). Vitamin E determination was carried out by HPLC-DAD as described by Munné-Bosch and Alegre (2003).

For vitamin C analyses, *ca.* 60mg of tissue was ground and extracted with ice-cold 6% (w/v) meta-phosphoric acid 0.2mM diethylene triamine pentaacetic acid using ultrasonication. Ascorbic acid and dehydroascorbate were

analysed by the enzymatic assay as described by Queval and Noctor (2007).

Soluble ions by ICP-OES

Soluble cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+) were extracted from ground tissue with miliQ water in an orbital shaker (150rpm) for 1 hour and determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES; Optima 3200RL, Perkin-Elmer, CT, USA).

Statistical analyses of physiological and biochemical parameters

Analysis of variance ANOVA was performed to examine statistical differences across strips, treatments and time-points (when applicable), using the Tukey-*b* post-hoc test. Differences were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. All analyses were conducted using SPSS 20 (IBM, IL, USA).

Sequencing and differential expression analysis

RNA was extracted with the hot borate method (Wan and Wilkins, 1994) from 3 independent biological replicates of apical strip after 8 days of treatment with control solution, ABA and/or Pyr. RNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (ND1000; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and RNA quality examined using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). High-quality RNA samples for library construction were selected based on the 260/280nm ratio and RNA integrity number above 2.1 and 6.5, respectively. New Zealand Genomics Limited (NZGL) RNA-sequencing services (New Zealand) prepared Illumina libraries and sequenced on an Illumina HiSeq platform (100 bases paired-end reads; Illumina, CA, USA). Quality control and rRNA content were assessed and masked for further analyses with FastQC (Andrews, 2010) and ribopicker (rrnadb_2012-01-17, Schmieder *et al.* (2012)).

No comprehensive reference transcriptome was available for *Brassica oleracea*. Recently published *B. oleracea* genome v1.0 (Liu *et al.*, 2014) was used as reference for differential expression analysis with the Tuxedo suite (Trapnell *et al.*, 2012). First, reads of each biological replicate were independently mapped to the reference genome with the splice-aware aligner TopHat 2.0.9 (--b2-very-sensitive parameters set) and individually assembled transcripts were merged (Cufflinks 2.1.1 cuffmerge tool) to generate a unified transcriptome reconstruction for further analyses. The completeness and quality of the assembled transcriptome was assessed with BUSCO and TRAPID (Simão *et al.*, 2015; Van Bel *et al.*, 2013). Differentially expressed transcripts between treatments were identified with cuffdiff 2.1.1 (default parameters plus --multi-read-correct and --frag-bias-correct, applying multiple biases corrections and thresholds to improve the accuracy of transcript abundance estimates; see Trapnell *et al.*, (2012)) at a false discovery rate (FDR) of 0.05.

Annotation and GO enrichment analysis

The nonredundant (nr) Viridiplantae ncbi protein database was interrogated to blastx the assembled transcripts with blast+ (Camacho *et al.*, 2009) with a cut-off E-value of 10^{-5} . BLAST results imported to Blast2GO 4.0 were used for Gene Ontology (GO) mapping and annotation, enriched by interPro scan and Annex annotation augmentation (Conesa and Gotz, 2008; Finn *et al.*, 2017). To identify overrepresented GO annotations in the differentially expressed gene sets, compared with the broader own reference assembly, GO enrichment analysis was performed with Ontologizer 2.0 implementation of the Parent-Child-Union method (Bauer *et al.*, 2008) — taking into account the annotation of terms to the current term's parents, reducing false positives due to the inheritance problem—with

Benjamini-Hochberg multiple test correction (Benjamini and Hochberg, 1995) at a FDR of 0.05.

Accession numbers

The reads related to this article have been deposited in the Sequence Read Archives (SRXXXXX).

Acknowledgments

We are grateful to Serveis Científico-Tècnics of the Universitat de Barcelona for technical assistance, Dr Maren Müller (Universitat de Barcelona) for her assistance in phytohormone analyses, and Jay Jayaraman (Massey University) for his assistance in RNA extraction and purification. This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad of the Spanish Government (PRI-AIBNZ-2011-0833) and the prize ICREA Academia given to SM-B (Generalitat de Catalunya). JAM holds an FPU fellowship from the Spanish Government. The RNA sequencing was done by New Zealand Genomics Limited (NZGL) and was subsidized by the New Zealand Ministry for Business Innovation and Employment. The authors declare no conflict of interests.

References

- Adams, M.S. *et al.* (2016) Nutritional cues tie living organisms to their environment and its sustainability. *Front. Nutr.*, **3**, 1–28.
- Andrews, S. (2010) FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Bartoli, C.G. *et al.* (2013) Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ. Exp. Bot.*, **94**, 73–88.
- Bauer, S. *et al.* (2008) Ontologizer 2.0—a multifunctional tool for GO term enrichment

analysis and data exploration. *Bioinformatics*, **24**, 1650–1651.

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.*, **57**, 289–300.

Blum, A. (2015) Towards a conceptual ABA ideotype in plant breeding for water limited environments. *Funct. Plant Biol.*, **42**, 502–513.

Camacho, C. *et al.* (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, **10**, 421.

Cantwell, M. and Suslow, T. (2001) Cabbage (round & chinese types): Recommendations for maintaining postharvest quality. *Perish. Handl. 107 UC Davis Postharvest Technol.*

Chang, C.C.C. *et al.* (2009) Arabidopsis chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. *Plant Physiol.*, **150**, 670–683.

Chang, K.N. *et al.* (2013) Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in *Arabidopsis*. *eLife*, **2**, e00675.

Cheng, M.-C. *et al.* (2012) Arabidopsis RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and negatively regulates the plant drought stress response. *Plant Physiol.*, **158**, 363–375.

Chiang, M.S. *et al.* (1993) Cabbage: *Brassica oleracea* subsp. *capitata* L. In: Kalloo, G. and Bergh, B.O. (eds), *Genetic improvement of vegetable crops*. Pergamon, Amsterdam, pp. 113–155.

Choi, H. *et al.* (2005) Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol.*, **139**, 1750–1761.

Cisneros-Zevallos, L. (2003) The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *J. Food Sci.*, **68**, 1560–1565.

Conesa, A. and Gotz, S. (2008) Blast2go: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int. J. Plant Genomics*, **2008**, 619832.

Coupe, S.A. *et al.* (2003) Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *J. Exp. Bot.*, **54**, 1045–1056.

Delessert, C. *et al.* (2005) The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **43**, 745–757.

Delk, N.A. (2005) *CML24*, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca²⁺ sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiol.*, **139**, 240–253.

FAO (2016) Food loss and waste accounting and reporting standard. Executive summary Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Finkelstein, R. (2013) Abscisic acid synthesis and response. *Arab. Book*, e0166.

Finn, R.D. *et al.* (2017) InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.*, **45**, D190–D199.

Ghassemian, M. *et al.* (2008) Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **69**, 2899–2911.

Ghassemian, M. *et al.* (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 1117–1126.

Ghelis, T. *et al.* (2008) Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells. *Plant Physiol.*, **148**, 1668–1680.

Guo, R. *et al.* (2011) Sucrose enhances the accumulation of anthocyanins and glucosinolates in broccoli sprouts. *Food Chem.*, **129**, 1080–1087.

Gustavsson, J. *et al.* (2011) Global food losses and food waste: extent, causes and

prevention Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Haake, V. *et al.* (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **130**, 639–648.

Hodges, D.M. *et al.* (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, **207**, 604–611.

Hu, K. and Zhu, Z. (2013) Effects of different concentrations of abscisic acid on glucosinolates contents in pakchoi. *J. South China Agric. Univ.*, **34**, 366–371.

Ishida, M. *et al.* (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed. Sci.*, **64**, 48–59.

Ivanov, A.G. *et al.* (1995) Abscisic acid induced protection against photoinhibition of PSII correlates with enhanced activity of the xanthophyll cycle. *FEBS Lett.*, **371**, 61–64.

Ji, K. *et al.* (2012) Non-climacteric ripening in strawberry fruit is linked to ABA, *FaNCED2* and *FaCYP707A1*. *Funct. Plant Biol.*, **39**, 351–357.

Jibrán, R. *et al.* (2013) Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Mol. Biol.*, **82**, 547–561.

Jing, H.-C. *et al.* (2005) Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and old genes in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, **56**, 2915–2923.

Jones, R.B. *et al.* (2006) A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biol. Technol.*, **41**, 1–8.

Kim, H.J. *et al.* (2013) SCF(KMD) controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 10028–10033.

Konert, G. *et al.* (2015) Protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunit B γ

interacts with cytoplasmic ACONITASE 3 and modulates the abundance of AOX1A and AOX1D in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, **205**, 1250–1263.

Kramchote, S. *et al.* (2012) Low temperature storage maintains postharvest quality of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) in supply chain. *Int. Food Res. J.*, **19**, 759–763.

Krishnaswamy, S. *et al.* (2011) Functional characterization of four APETALA2-family genes (*RAP2.6*, *RAP2.6L*, *DREB19* and *DREB26*) in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, **75**, 107–127.

Laporte, D. *et al.* (2012) Glutaredoxin GRXS13 plays a key role in protection against photooxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, **63**, 503–515.

Lee, I.C. *et al.* (2011) Age-dependent action of an ABA-inducible receptor kinase, RPK1, as a positive regulator of senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol.*, **52**, 651–662.

Leng, P. *et al.* (2014) The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *J. Exp. Bot.*, **65**, 4577–4588.

Li, B. *et al.* (2014) Promoter-based integration in plant defense regulation. *Plant Physiol.*, **166**, 1803–1820.

Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 591–592.

Lim, P.O. *et al.* (2007) Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **58**, 115–136.

Liu, J.D. *et al.* (2015) Keeping the rhythm: light/dark cycles during postharvest storage preserve the tissue integrity and nutritional content of leafy plants. *BMC Plant Biol.*, **15**, 92.

Liu, P. *et al.* (2012) *RAP2.6L* overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity. *Plant Mol. Biol.*, **79**, 609–622.

- Liu, S. *et al.* (2014) The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nat. Commun.*, **5**, 3930.
- Lu, W. *et al.* (2012) Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene*, **503**, 65–74.
- Magome, H. *et al.* (2004) *dwarf and delayed-flowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J.*, **37**, 720–729.
- Manchali, S. *et al.* (2012) Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *J. Funct. Foods*, **4**, 94–106.
- Mazzucotelli, E. *et al.* (2008) Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Sci.*, **174**, 420–431.
- Miret, J.A. and Munné-Bosch, S. (2016) Abscisic acid and pyrabactin improve vitamin C contents in raspberries. *Food Chem.*, **203**, 216–223.
- Miura, K. and Tada, Y. (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.*, **5**, 4.
- Müller, M. and Munné-Bosch, S. (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods*, **7**, 37.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L. (2003) Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiol.*, **131**, 1816–1825.
- Nakashima, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep.*, **32**, 959–970.
- Park, S.-W. *et al.* (2013) Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 9559–9564.
- Park, S.-Y. *et al.* (2009) Abscisic acid inhibits type 2c protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, **324**, 1068–1071.
- Pfannschmidt, T. (2010) Plastidial retrograde signalling – a true ‘plastid factor’ or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci.*, **15**, 427–435.
- Podsdek, A. (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT - Food Sci. Technol.*, **40**, 1–11.
- Puthiyaveetil, S. *et al.* (2008) The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 10061–10066.
- Queval, G. and Noctor, G. (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal. Biochem.*, **363**, 58–69.
- Rademacher, W. (2015) Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *J. Plant Growth Regul.*, **34**, 845–872.
- Rai, M.K. *et al.* (2011) The role of abscisic acid in plant tissue culture: A review of recent progress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **106**, 179–190.
- Rauf, M. *et al.* (2013) ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. *EMBO Rep.*, **14**, 382–388.
- Robert-Seilaniantz, A. *et al.* (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **49**, 317–343.
- Schippers, J.H.M. *et al.* (2007) Developmental and hormonal control of leaf senescence. In, Gan, S. (ed), *Senescence processes in plants*. Blackwell Publishing, pp. 145–170.

- Schmieder, R. *et al.* (2012) Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics*, **28**, 433–435.
- Seo, D.H. *et al.* (2012) Roles of four Arabidopsis U-box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of abscisic acid-mediated drought stress responses. *Plant Physiol.*, **160**, 556–568.
- Setha, S. (2012) Roles of abscisic acid in fruit ripening. *Walailak J. Sci. Technol. WJST*, **9**, 297–308.
- Simão, F.A. *et al.* (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, **31**, 3210–3212.
- Simkova, K. *et al.* (2012) Integration of stress-related and reactive oxygen species-mediated signals by Topoisomerase VI in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 16360–16365.
- Sims, D. *et al.* (2014) Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 121–132.
- Sun, S. *et al.* (2016) The spatio-temporal specificity of PYR1/PYL/RCAR ABA receptors in response to developmental and environmental cues. *Plant Signal. Behav.*, **In Press**.
- Takasaki, H. *et al.* (2015) SNAC-As, stress-responsive NAC transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence. *Plant J.*, **84**, 1114–1123.
- Thompson, J.F. *et al.* (2002) Cooling horticultural commodities. In, Kader, A.A. (ed), *Postharvest technology for horticultural crops*. UCANR Publications, Davis, USA, pp. 97–112.
- Thongsavath, C. *et al.* (2012) Cabbage supply chain mapping and postharvest loss in the domestic and export trade in Lao PDR. *Int. Food Res. J.*, **19**, 1615–1620.
- Toivonen, P.M.A. (2004) Postharvest storage procedures and oxidative stress. *HortScience*, **39**, 938–942.
- Toivonen, P.M.A. and Hodges, D.M. (2011) Abiotic stress in harvested fruits and vegetables. In, Shanker, A. (ed), *Abiotic stress in plants—Mechanisms and adaptations*. InTech, pp. 39–58.
- Ton, J. *et al.* (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.*, **14**, 310–317.
- Traka, M. and Mithen, R. (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem. Rev.*, **8**, 269–282.
- Trapnell, C. *et al.* (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.*, **7**, 562–578.
- Travaglia, C. *et al.* (2010) Exogenous ABA increases yield in field-grown wheat with moderate water restriction. *J. Plant Growth Regul.*, **29**, 366–374.
- Umezawa, T. *et al.* (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 1821–1839.
- Van Bel, M. *et al.* (2013) TRAPID: an efficient online tool for the functional and comparative analysis of *de novo* RNA-Seq transcriptomes. *Genome Biol.*, **14**, R134.
- Velasco, P. *et al.* (2007) Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 955–962.
- Villarreal-García, D. *et al.* (2016) Plants as biofactories: postharvest stress-induced accumulation of phenolic compounds and glucosinolates in broccoli subjected to wounding stress and exogenous phytohormones. *Front. Plant Sci.*, **7**, 45.
- Wan, C.Y. and Wilkins, T.A. (1994) A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal. Biochem.*, **223**, 7–12.
- Wang, K.L.-C. *et al.* (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S131–151.
- Wang, S. *et al.* (2009) The Arabidopsis 26S proteasome subunit RPN1a is required for optimal plant growth and stress responses. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1721–1725.

- Wang, Z. *et al.* (2015) Effects of abscisic acid on glucosinolate content, isothiocyanate formation and myrosinase activity in cabbage sprouts. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **50**, 1839–1846.
- Waters, M.T. *et al.* (2009) GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in arabidopsis. *Plant Cell*, **21**, 1109–1128.
- Waters, M.T. *et al.* (2008) GLK transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. *Plant J.*, **56**, 432–444.
- Wu, A. *et al.* (2012) *JUNGBRUNNEN1*, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 482–506.
- Wu, Q. *et al.* (2016) Ubiquitin ligases RGLG1 and RGLG5 regulate abscisic acid signaling by controlling the turnover of phosphatase PP2CA. *Plant Cell*, **28**, 2178–2196.
- Xia, X.-J. *et al.* (2015) Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.*, **66**, 2839–2856.
- Yang, S.-D. *et al.* (2011) The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the *COR/RD* genes. *Plant Cell*, **23**, 2155–2168.
- Yang, W. *et al.* (2017) Post-translational control of ABA signalling: the roles of protein phosphorylation and ubiquitination. *Plant Biotechnol. J.*, **15**, 4–14.
- Yao, C. *et al.* (2012) RPN1a, a 26S proteasome subunit, is required for innate immunity in Arabidopsis. *Plant J.*, **71**, 1015–1028.
- Zhang, K. *et al.* (2012) An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant J.*, **69**, 667–678.
- Zhang, X. *et al.* (2013) Adenine Phosphoribosyl Transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*, **6**, 1661–1672.
- Zhang, X. *et al.* (2015) Down-regulation of Kelch domain-containing F-box protein in *Arabidopsis* enhances the production of (poly)phenols and tolerance to ultraviolet radiation. *Plant Physiol.*, **167**, 337–350.
- Zhao, Y. *et al.* (2016) ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, 1949–1954.

Supporting information

- Figure S1. Division of the leaf blade in three strips at sampling.
- Figure S2-4. Physiological and biochemical parameters through experiment I.
- Figure S5-8. Endogenous hormonal contents through experiment I.
- Figure S9. Antioxidant contents after application of ABA/Pyr (experiment II).
- Figure S10. Soluble ions contents after application of ABA/Pyr (experiment II).
- Table S1. Quality control of RNA-seq reads and assembly.
- Table S2. DE transcripts up-regulated or down-regulated per each treatment.
- Table S3. GO enrichment within the gene set up-regulated or down-regulated per each treatment.
- Table S4. List of DE transcripts annotated with the GO term “GO:0043207 Response to external biotic stimulus”.

Physiological and biochemical analyses of experiment I and II

Figure S1. Division of the leaf blade in three strips at sampling. Most of the material was immediately frozen in liquid nitrogen. After freezing the material for biochemical and RNA-seq analyses, disks were cut from the reminding material.

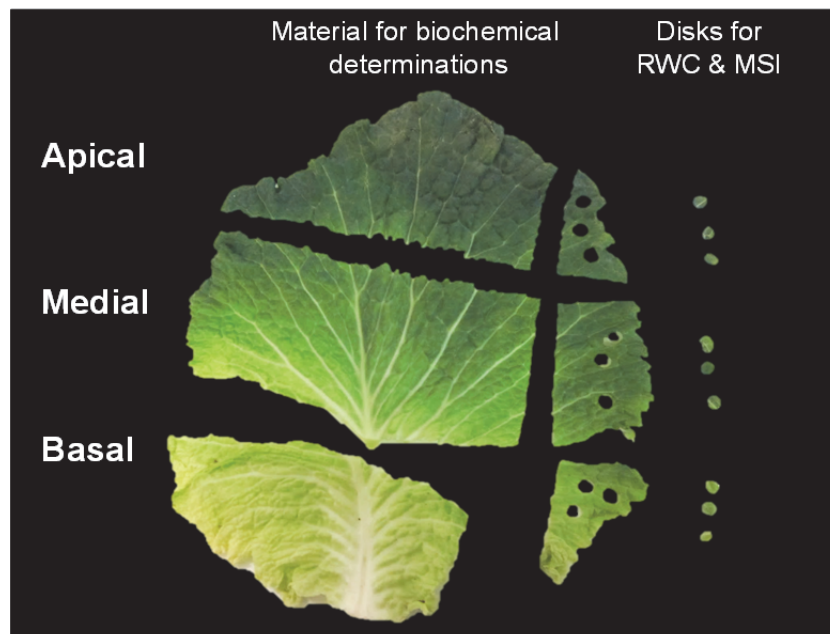


Figure S2. Whole leaf biomass loss at experiment I.

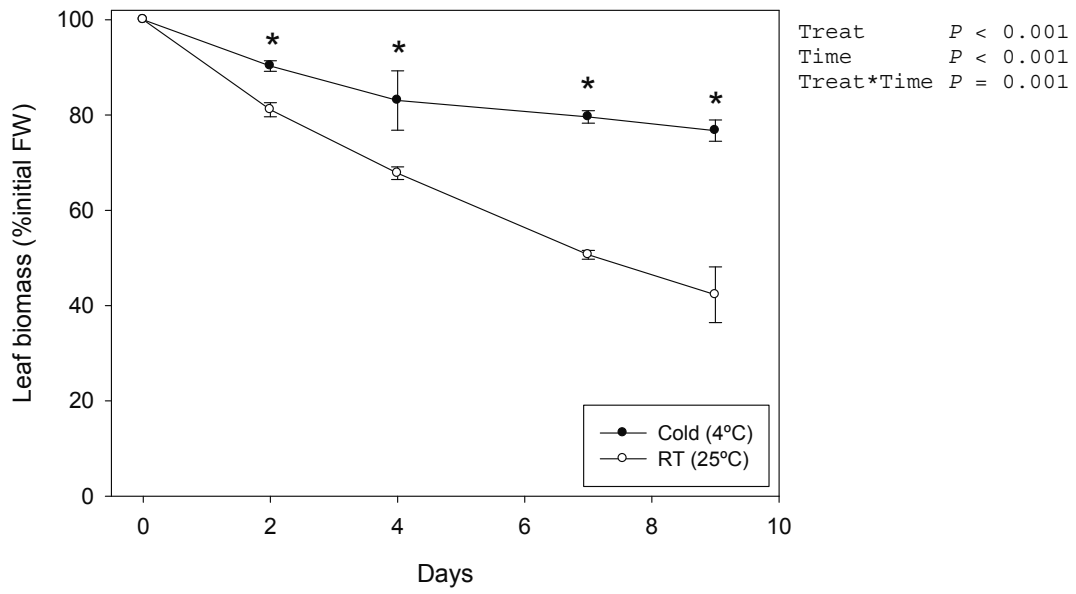


Figure S3. Pigments contents and ratio at experiment I. Chl, total chlorophyll; Chl a/b, ratio between chlorophyll *a* and chlorophyll *b* (g/g); Car, total carotenoids.

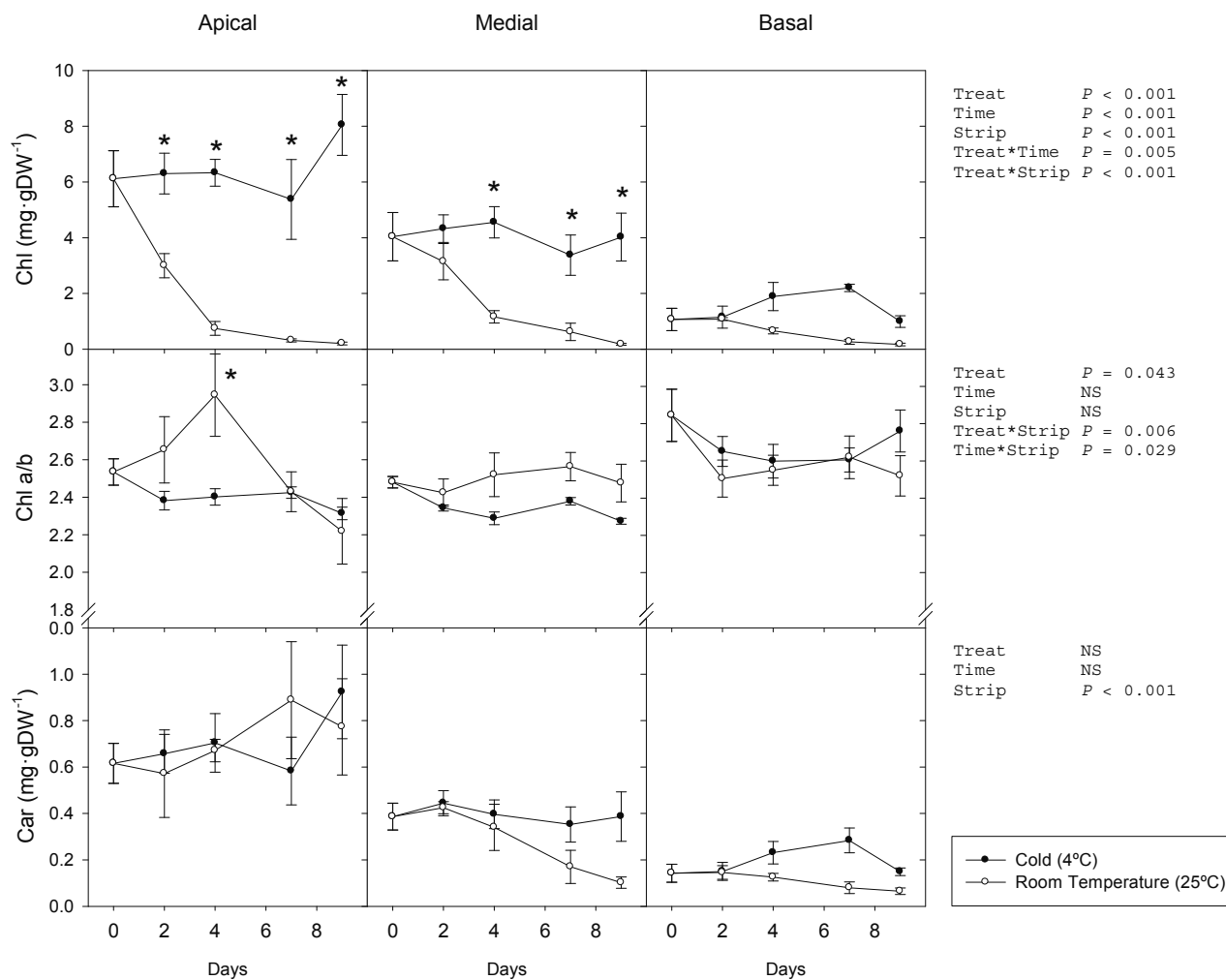


Figure S4. Relative Water Content (RWC) and maximum photosystem II efficiency (F_v/F_m) through experiment I.

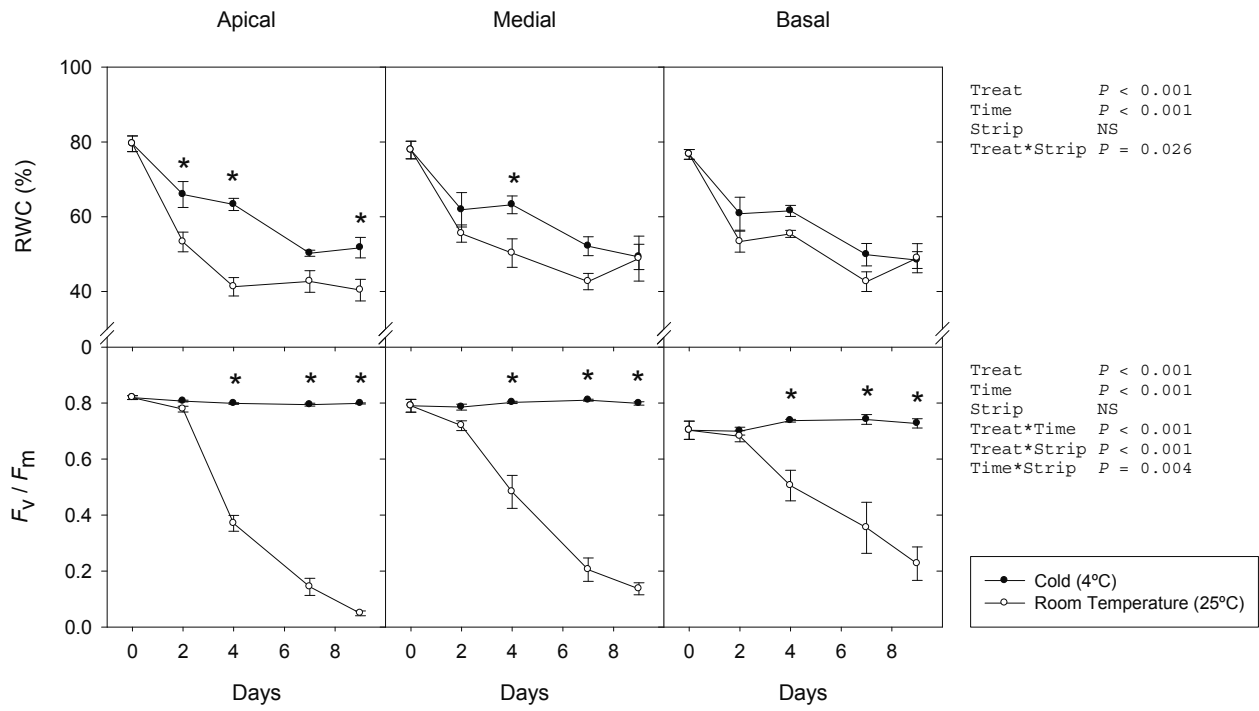


Figure S5. Endogenous hormonal contents through experiment I. ABA, abscisic acid; JA, jasmonic acid; SA, salicylic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid.

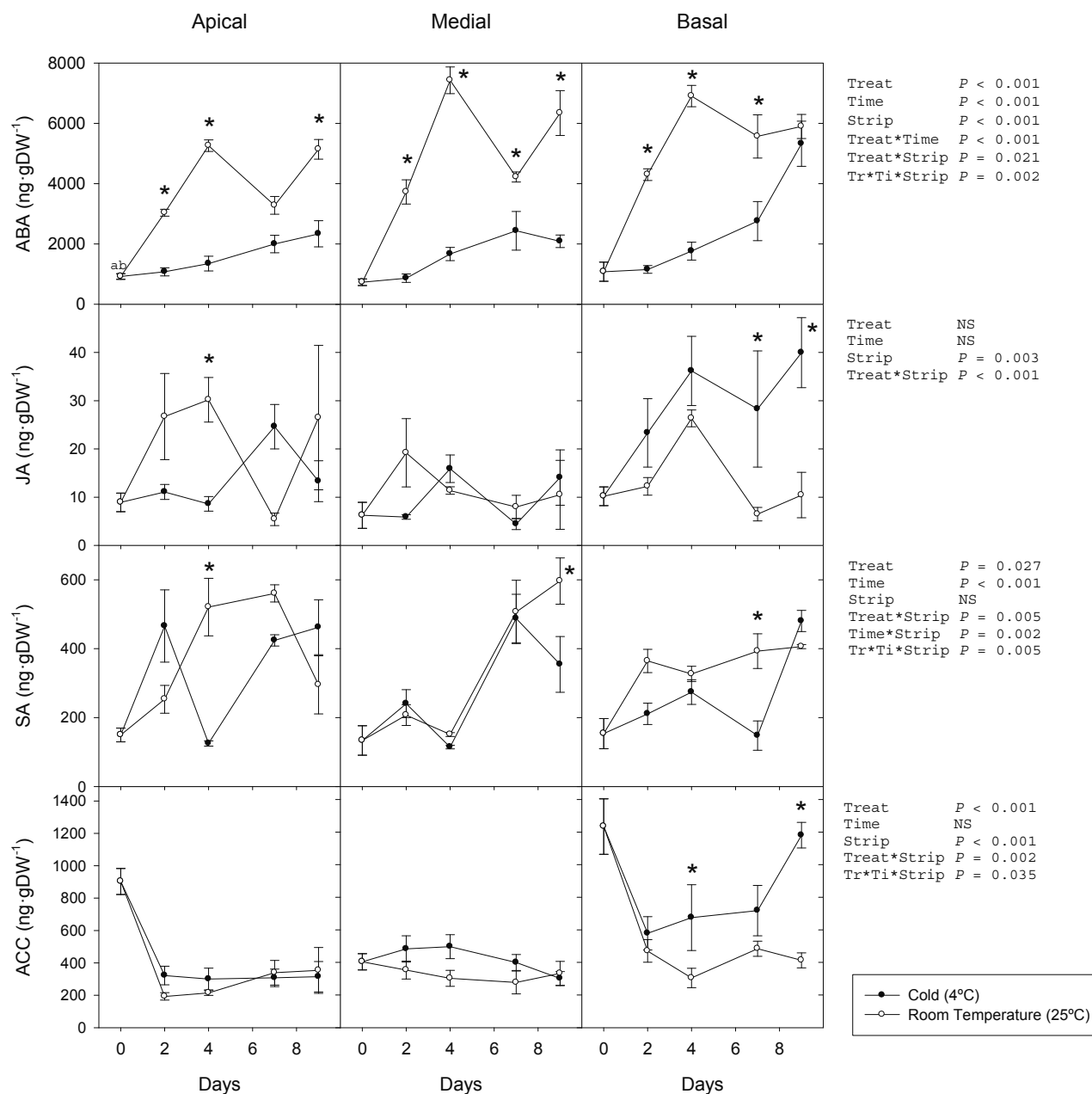


Figure S6. Endogenous hormonal contents through experiment I. Total cytokinins (CK total), *trans*-zeatin (*tZ*), *trans*-zeatin riboside (*tZR*), and isopentenyladenosine (IPA).

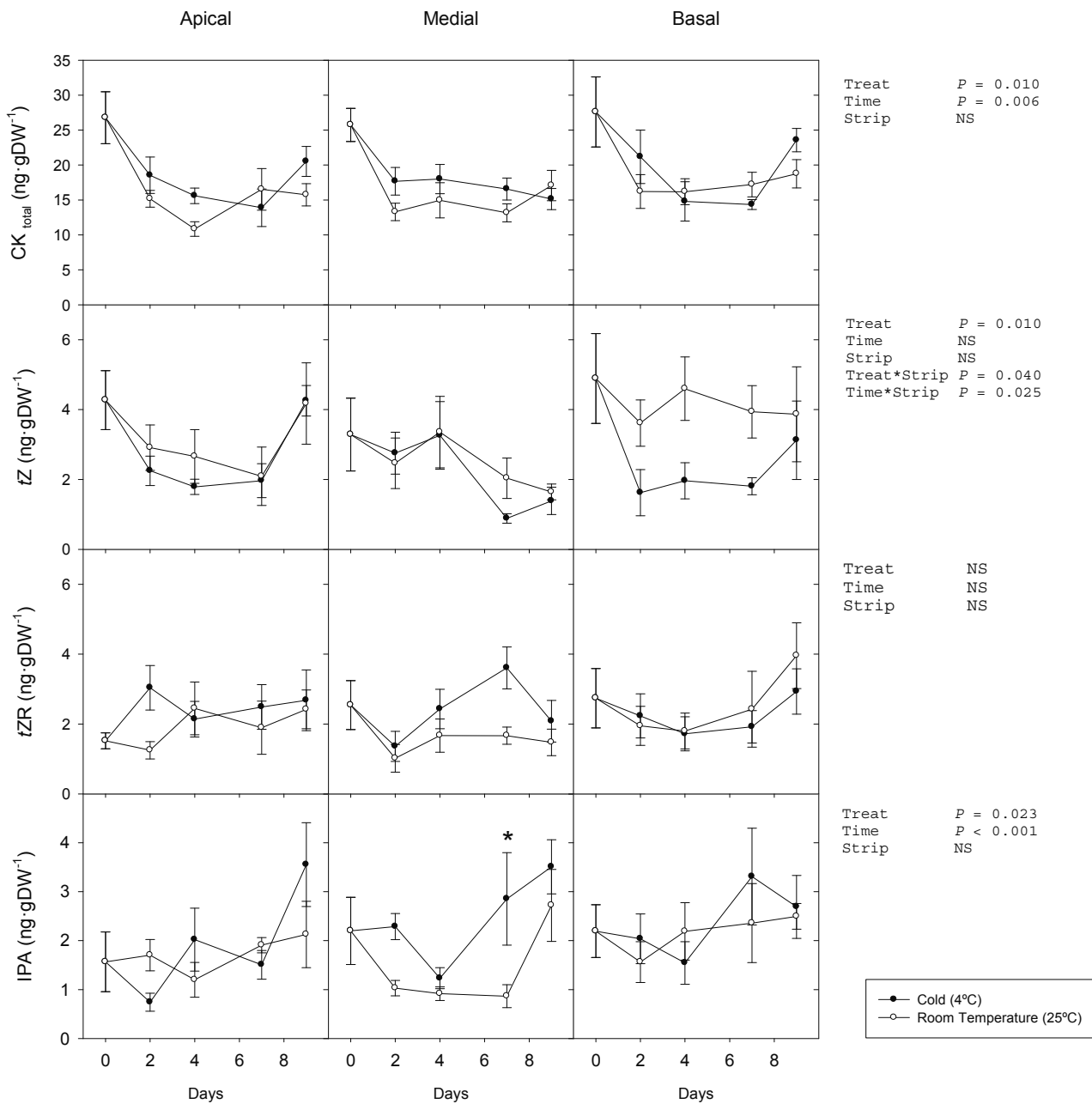
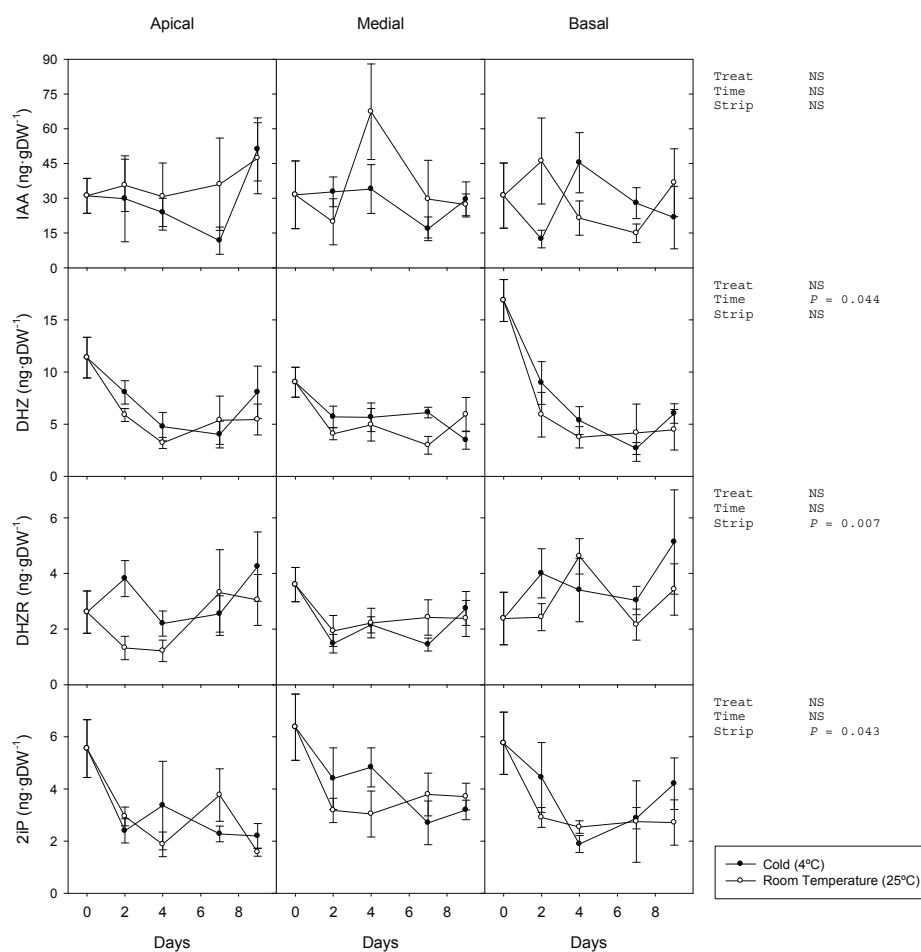


Figure S7. Endogenous hormonal contents through experiment I. Indolacetic acid (IAA), dehydrozeatin (DHZ), dehydrozeatin riboside (DHZR), *trans*-zeatin riboside (*t*ZR), and 2-isopentenyladenine (2iP).



Capítol 3

Figure S8. Vitamin E contents through experiment I. α -Toc, α -tocopherol; γ -Toc, γ -tocopherol; Total toc, total tocopherol (sum of the two detected tocopherols, α - and γ -tocopherol).

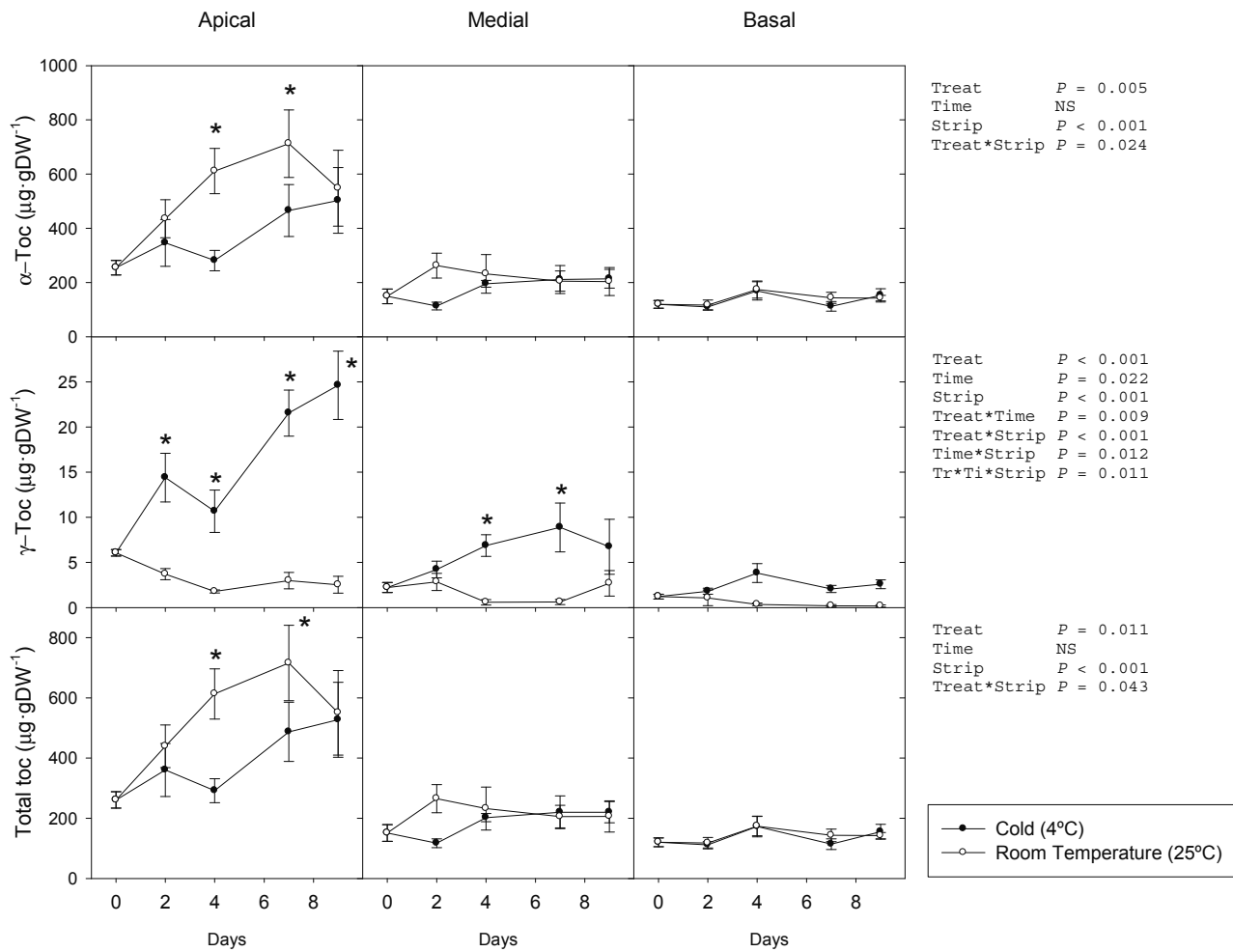


Figure S9. Antioxidant contents in the apical strip after 8 days of every other day application of ABA/Pyr (experiment II). Total Car, total carotenoids; α -Toc, α -tocopherol; AA, ascorbic acid; redox state, vitamin C redox state.

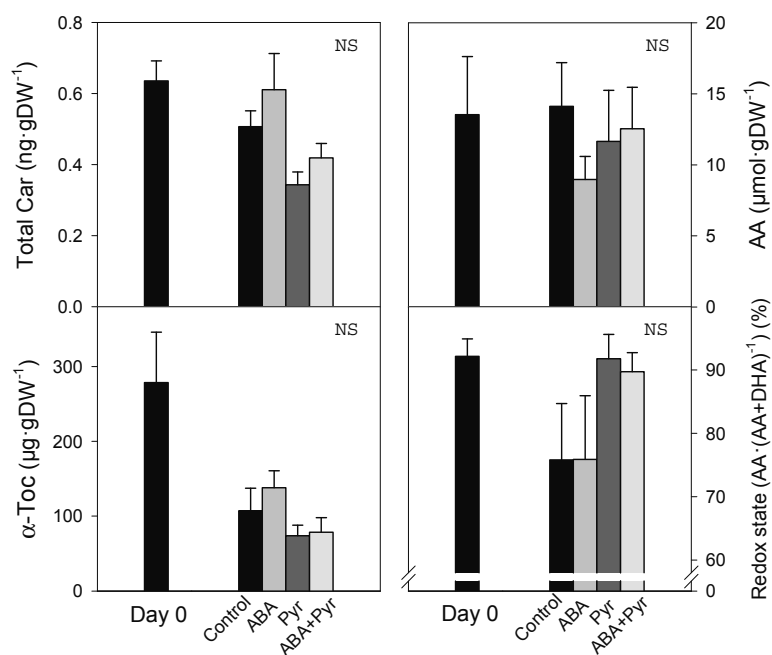


Figure S10. Soluble ion contents in the apical strip after 8 days of every other day application of ABA/Pyr (experiment II). Quantified by ICP-OES.

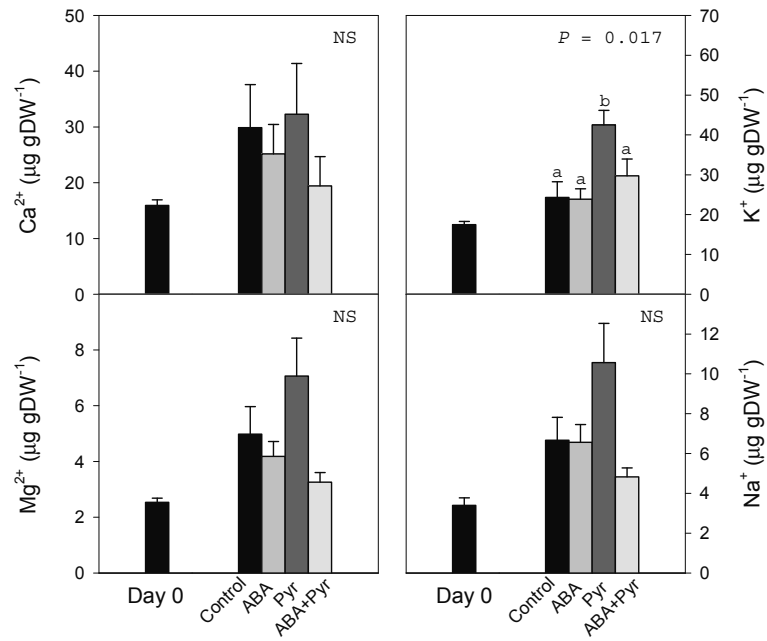


Table S1. Quality control of RNA-seq reads and assembly. rRNA mapping reads (%), rate of rRNA mapping reads per ribopicker; Q20, reads with an average Phred score above 20; High quality reads, reads used for assembly and differential expression after masking rRNA and low quality reads (average <20 Phred score); Genome mapping (%), ratio of reads mapped to *B. oleracea* reference genome; Conconrdant pair alignment (%), ratio of aligned concordant paired reads; Multiple aligments (%), ratio of reads aligned to multiple locus.

Condition	Biological replicate	Total raw reads	rRNA mapping reads (%)	Q20 (%)	High quality reads	Genome mapping (%)	Conconrdant pair alignment (%)	Multiple aligments (%)
Control	1	30212286	0.50	99.42	29884978	45.7	36.3	4.0
	2	28831788	0.34	99.43	28570074	47.3	38.4	3.2
	3	25248168	0.34	99.39	25009044	46.6	37.8	3.4
ABA	1	25840650	0.48	99.32	25541102	45.3	36.7	4.2
	2	24461962	0.24	99.35	24245404	45.0	36.2	3.3
	3	25634420	0.79	99.41	25282650	44.2	36.1	4.3
Pyr	1	23192794	0.42	99.41	22960210	45.6	36.4	3.8
	2	28479392	0.33	99.35	28202322	46.1	37.8	3.1
	3	21770736	0.31	99.35	21563118	46.5	37.9	3.5
ABA+Pyr	1	22819486	0.52	98.79	22426164	45.5	36.4	5.5
	2	26100180	0.40	99.40	25839476	45.0	35.8	3.8
	3	23608536	0.29	99.29	23372984	45.2	35.8	3.5

DISCUSSIÓ GENERAL



DISCUSSIÓ GENERAL

La senescència d'òrgans té una funció biològica vital pel *fitness* i la producció de la planta sencera. La senescència d'òrgans ha evolucionat com un procés de reciclatge de nutrients destinats a la producció de nous teixits fotosintètics, òrgans reproductius o maduració de fruits. En el producte fresc—hortalisses, flor tallada—la senescència determina la longevitat comercial i de consum. Esdevenint doncs, una etapa clau per la qualitat organolèptica i nutricional del producte, i d'aquesta manera del seu valor. La maduració de fruits presenta molts processos fisiològics comuns amb la senescència, així com una subjacent regulació hormonal i transcripcional que presenta moltes similituds.

El sector hortícola, i en menor mesura la floricultura, presenten grans pèrdues entre la planta i el consumidor que poden representar més d'un 50% de la producció (FAO, 2016). La senescència és un dels principals factors limitants de la longevitat del producte fresc, especialment en societats en que la cadena logística no permet mantenir les condicions ideals de conservació, especialment el fred (Toivonen, 1997; Thongsavath et al., 2012). Degut a la reducció en el contingut de carbohidrats, proteïnes, vitamines, compostos antioxidants, i pèrdua de textura i altres qualitats organolèptiques i nutricionals el producte fresc es deteriora i la seva longevitat és limitada. Millorar el coneixement sobre la fisiologia de la senescència i com és condicionada per l'ambient estricte de la post-collita en el major nombre possible d'espècies diferents, permet obrir oportunitats d'aplicació biotecnològica. Ja sigui generant opcions per manipular al procés, millorant la longevitat i qualitat del producte fresc, i/o reduint la inversió econòmica i energètica necessària per assolir un producte de qualitat. O per la identificació de trets fisiològics que puguin ser incorporats a programes de millora i selecció de noves varietats.

1. Senescència post-collita de fulla i flor

Per tal de tenir èxit en la seva funció, les fulles passen d'embornal a font de fotoassimilats i han de mantenir una maquinària fotosintètica madura i funcional fins que el cost del seu manteniment (per l'envelliment del mateix òrgan, canvis en el desenvolupament de la planta o canvis de l'ambient) sigui major que el benefici que se n'obté. És conegut que les hormones tenen un rol en la inducció i la progressió de la senescència, però també en la percepció i resposta a canvis en el desenvolupament i a estressos ambientals (Jibrán et al., 2013). Aquests són processos fisiològics que afecten i poden desencadenar la senescència, i per tant la dificultat de dirimir els mecanismes pels quals una hormona actua sobre la regulació de la senescència. Per tal de tenir èxit en la seva funció, les flors s'han de mantenir obertes fins que els objectius de fertilització de l'ovari i dispersió del pol·len han estat assolits. Un cop és pol·linitzada, l'objectiu esdevé el desenvolupament i dispersió de les llavors produïdes. Així, amb la pol·linització els pètals/tèpals assoleixen la seva funció i es perden òrgans florals per romandre només l'ovari fertilitzat (Stead & van Doorn, 1994). Encara que la flor no sigui pol·linitzada o la fulla no pateixi un estrès sever, la longevitat d'un òrgan és finita i es veu afectada per l'ambient. Quan la inversió per mantenir un òrgan viu—creixent amb l'edat—supera el cost de generar un de nou, la planta se'n desfà (Ashman & Schoen, 1994). Així, factors endògens i exògens poden modular la inducció i progressió de la senescència foliar i floral, tot i esdevenir un procés inevitable a partir de certs esdeveniments del desenvolupament (van Doorn & Woltering, 2008; Jibrán et al., 2013).

En el Capítol 3, s'observaren els efectes de l'aplicació d'ABA i/o del seu agonista parcial pirabactina des del principi de la post-collita de fulles de col. Després de 8 dies, el tractament causà canvis importants en els nivells de citocinines, ACC i el mateix ABA; així com canvis en la regulació transcripcional del seu metabolisme, senyalització i respostes promogudes per aquestes hormones.

L'aplicació continuada d'ABA va doblar el seu contingut endogen al final del tractament i va causar canvis en el contingut de citocinines individuals i ACC.

Més enllà del seu possible paper regulador positiu o negatiu de la senescència d'òrgans (Lim et al., 2007), la funció de les hormones ha de ser interpretada en funció de sobre quina part del procés actua: sobre la percepció de l'ambient, l'estat del desenvolupament i la seva integració, o els processos de senescència en si (Schippers et al., 2007; Jibrán et al., 2013). L'etilè, ABA, jasmonats i salicilats modulen la senescència foliar en resposta a factors ambientals, però la sensibilitat de la fulla a aquests dependrà del seu estat de desenvolupament. L'etilè, auxines i brassinoesteroïdes poden alterar el programa del desenvolupament, canviant la seva progressió. En canvi, salicilats i citocinines poden actuar directament en diferents etapes del procés de senescència. A més, algunes hormones poden actuar antagonitzant la regulació d'altres hormones com les gibberel·lines, que antagonitzen els efectes de l'ABA en fulles, però també durant la maduració de fruits i la senescència floral (Schippers et al., 2007; Jibrán et al., 2013; Kumar et al., 2014).

L'ABA està involucrat tant en la regulació del desenvolupament (Finkelstein, 2013) com en la resposta a estressos (Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2013). En molts processos l'ABA promou l'acumulació d'antioxidants i protegeix la funcionalitat del cloroplast (Ivanov et al., 1995; Ghassemian et al., 2008; Leng et al., 2014). A més, l'ABA pot participar en el control dels trets associats al desenvolupament que fan que una fulla sigui sensible a factors externs promotors de la senescència (*age-related changes*), com el manteniment de l'homeòstasi redox i de les membranes (Jibrán et al., 2013). Aquests trets també protegeixen les funcions cel·lulars durant la progressió i finalització de la senescència per una òptima remobilització (Lim et al., 2007; Jibrán et al., 2013; Zhao et al., 2016). A la vegada, l'ABA pot promoure la senescència promovent la síntesi i sensibilitat a etilè, o per mitjà de mecanismes independents a l'etilè (Zhao et al., 2016). La relació entre l'ABA, i la síntesi i senyalització d'etilè depèn de l'òrgan, l'edat

d'aquest i el seu estat fisiològic (Ghassemian et al., 2000). Així, l'ABA inhibeix la síntesi d'etilè durant el creixement vegetatiu o l'estrès en teixits en creixement (Spollen et al., 2000; Sharp, 2002), mentre promou la seva producció en òrgans en la senescència foliar (Riov et al., 1990) o a la maduració del fruit (Zhang et al., 2009). D'aquesta manera, l'efecte potencial de manipular els nivells d'ABA, o la seva senyalització, sobre la senescència foliar, depèn de l'estat de desenvolupament de la fulla. A més, cal recordar la importància de l'ABA en les respostes a estressos abiòtics durant la post-collita, possibilitant l'adaptació a un entorn canviant d'aquests d'òrgans especialment vulnerables (Toivonen, 2004; Toivonen & Hodges, 2011; Mittler & Blumwald, 2015).

De forma natural, amb la progressió de la senescència foliar l'expressió dels enzims biosintètics d'ABA és promoguda, i per tant els nivells d'ABA incrementen (Lim et al., 2007). Al capítol 3 l'augment dels nivells endògens d'ABA no causà canvis en la regulació transcripcional de la biosíntesi d'ABA, mentre el seu catabolisme va ser transcripcionalment regulat a la baixa. Diversos transportadors d'ABA, associats a la sensibilitat de diferents teixits a aquest (Boursiac et al., 2013; Zhang et al., 2014), també varen ser transcripcionalment regulats a la baixa. Els receptors d'ABA i la seva diferent localització i afinitat permeten integrar diferents respostes transcripcionals i post-traduccionals per transduir respostes en un gran rang de concentracions d'ABA i tipus cel·lulars (Sun et al., 2016). Al Capítol 3 s'observà com en resposta a l'augment dels nivells d'ABA des del principi de la post-collita s'incrementà l'expressió dels receptors PYL9 i CHLH, associats a la regulació de la senescència i la resposta a estressos (Du et al., 2012; Zhao et al., 2016). Així l'aplicació d'ABA generà canvis al metabolisme d'ABA, i a transportadors i receptors claus per la seva percepció. Els conseqüents canvis en la senyalització d'ABA van causar canvis en reguladors clau de la senescència i l'homeòstasi cel·lular.

Després de 8 dies les fulles emmagatzemades a temperatura ambient i tractades amb solucions que contenien ABA reduïren el contingut d'ACC a la meitat. Així,

el metabolisme de l'etilè presentà regulació transcripcional en resposta a l'augment dels nivells d'ABA. La senyalització i resposta per etilè presentà grans canvis, essent generalment regulada transcripcionalment a la baixa. També cal considerar que l'ACC per si mateix també podria tenir funcions reguladores, independentment de l'etilè, però per mecanismes encara desconeguts (Van de Poel & Van Der Straeten, 2014).

La família d'hormones de les citocinines, un inhibidor clau de la senescència, presentà canvis en els nivells de compostos individuals en resposta als tractaments amb ABA i ABA+Pyr. Augmentaren els nivells de nucleòsids (IPA i DHZR) i bases lliures (2iP) en resposta a la regulació transcripcional d'enzims d'interconversió entre les diferents citocinines (veure Figura 8 del Capítol 3). Aquesta associació és limitada pel fet que molts dels enzims que catalitzen les reaccions d'interconversió no han estat identificats (Zhang et al., 2013). La possible funció biològica d'un perfil de citocinines alterat en respostes a l'estrès no està resolta, però les citocinines antagonitzen les respostes per ABA en molts processos, incloent-hi la regulació de la senescència d'òrgans i la fotosíntesi (Pinheiro & Chaves, 2011). Per exemple, *Arabidopsis* amb nivells molts reduïts de citocinines presenten un fenotip resistent a estressos amb una major integritat de les membranes i hipersensibilitat a ABA (Nishiyama et al., 2011), mentre la sobreexpressió de gens de biosíntesi de citocinines confereix insensibilitat a ABA (Wang et al., 2011). Així, l'augment observat en els nivells de citocinines en resposta al tractament amb ABA i/o Pyr no només podia actuar sobre la regulació de la senescència en si sinó també podria haver reduït la sensibilitat a ABA com a un possible mecanisme compensatori.

Els tractaments amb ABA i ABA+Pyr (però no només amb pirabactina) promogueren la transcripció de promotors claus de la funció del cloroplast, incloent-hi reguladors i components de la maquinària de transcripció i traducció al cloroplast. A la vegada, mantingué la turgència i la integritat de la membrana, i causà canvis en la regulació transcripcional de la biogènesi i remodelació de la

membrana i la paret cel·lular. Tots ells trets associats amb el manteniment de la funció i l'homeòstasi, i per tant associats a una supressió de la senescència. En molts altres processos del desenvolupament i respostes a estressos l'ABA promou l'acumulació d'antioxidants i protegeix la funcionalitat del cloroplast (Ivanov et al., 1995; Ghassemian et al., 2008; Leng et al., 2014).

En flors, l'increment de la producció d'etilè, associat a un augment en la sensibilitat a aquest i un pic respiratori, també indueix la senescència floral (van Doorn & Woltering, 2008). Però moltes espècies de gran interès comercial són insensibles a l'etilè, especialment moltes monocotiledònies, com per exemple: *Lilium spp.*, *Iris spp.*, *Narcissus spp.*, *Tulipa spp* (van Doorn, 2001; Rogers, 2012). En aquestes últimes, la inducció de la senescència i la regulació de la seva progressió no s'ha resolt. Sembla que els reguladors hormonals més importants en la senescència de flors insensibles a l'etilè és el balanç entre citocinines i ABA (van Doorn & Woltering, 2008). Recents revisions destaquen la manca d'un bon model de flor insensible a l'etilè en la que es puguin concentrar els esforços i recursos de l'acadèmia i l'empresa (van Doorn & Han, 2011; Rogers, 2013). Entre altres dificultats està la diversitat fisiològica i metabòlica de la multitud d'espècies i varietats que mostren trets que puguin ser d'interès per la recerca bàsica o el mercat de la flor. A més, en molts casos la identificació i generalització dels mecanismes subjacents no és necessàriament l'objectiu de molta de la inversió i recerca en aquest camp.

En quasi totes les espècies estudiades hi ha canvis en les concentracions de ROS i els nivells de mecanismes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics (Rogers, 2012). En fulles, un balanç redox més oxidat actua com a senyal d'inducció de respostes a estressos abiòtics i biòtics (Bartoli et al., 2013; Braun et al., 2013; Munné-Bosch et al., 2013), però també de regulació de la inducció i/o progressió de la senescència foliar (Zimmermann & Zentgraf, 2005). En el desenvolupament de la flor, generalment s'identifiquen dos pics en els nivells de ROS: un primer associat amb l'obertura de la flor i un segon associat a l'aparició dels primers

signes visibles de senescència. Aquests pics són associats a una disminució dels mecanismes antioxidants (Rogers, 2012). Tot i que el nombre d'estudis que intenten discernir els mecanismes subjacents a la regulació redox de la senescència floral és reduït, i a més aquests estudien models molt diversos, una recent revisió (Rogers, 2012) intentà identificar 2 candidats amb potencial regulador: l'estat d'oxidació de l'ascorbat com a senyal primària de senescència, i els hidroperòxids generats tan enzimàticament com no enzimàticament en estadis tardans de senescència.

A l'Apèndix 1 s'observà la prolongació de la vida comercial de la flor tallada i dels darreres estadis de senescència per l'aplicació de melatonina, amb efectes sobre el contingut hídric. Els efectes observats depengueren de la concentració de melatonina a la solució del vas, i de la duració i el moment de l'aplicació. Pocs estudis han explorat els possibles rols de la melatonina en les diferents fases de desenvolupament de la flor. Els nivells de melatonina de la planta sencera poden afectar la inducció fotoperiòdica de la floració (Kolář et al., 2003; Byeon et al., 2014). Un cop formada la gemma floral, hi ha evidències de la regulació transcripcional de certa acumulació de melatonina durant el desenvolupament en panícules senceres d'arròs (Park et al., 2013). En canvi, en flors senceres de *Datura mentel* (Cucurbitaceae) s'observa una ràpida disminució dels continguts de melatonina i serotonina (Murch et al., 2009). Aquests estudis, al considerar la flor sencera, i representar els pètals només una part reduïda de la biomassa total de la flor o panícula, canvis en altres òrgans florals que presenten estats fisiològics molt diferents (i.e., l'ovari fecundat) poden ser determinants per explicar les tendències descrites. Per exemple, s'han descrit canvis dinàmics en els nivells de melatonina en l'ovari durant la microesporogènesis en *Hypericum perforatum* (Murch & Saxena, 2002).

La literatura que relaciona melatonina i desenvolupament de flors és limitada, i en cap cas analitza el seu paper en la senescència floral *in planta* o post-collita. Més enllà del que succeeix durant la microesporogènesis en ovaris, les diferències

entre òrgans florals durant el desenvolupament i senescència són desconegudes. Els efectes de les aplicacions de melatonina sobre altres processos de senescència, com la inhibició de la senescència foliar induïda per estressos abiòtics, també depenen del mètode d'aplicació i de la dosi (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015). Ja sigui per la seva funció antioxidant o per la seva funció reguladora, la melatonina ha estat descrita com un compost capaç d'alleugerir els efectes d'estressos abiòtics i la consegüent inducció de la senescència sobre la planta sencera i fulles individuals. L'aplicació de melatonina abans d'exposar fulles a estressos abiòtics afecta el metabolisme i la percepció d'ABA, reduint-ne els nivells (Weeda et al., 2014; Li et al., 2015). La resposta a l'estrès hídric sever que suposa la postcollita per mantenir l'homeòstasi hídrica ha estat normalment associada als nivells d'ABA. Però aquests estudis on la melatonina redueix els nivells d'ABA observen un manteniment de l'homeostasi de les membranes i la fotosíntesi durant l'estrès independent dels nivells d'ABA. A l'Apèndix 1 també s'observaren efectes de l'aplicació de melatonina sobre el contingut hídric associats al retard en l'abscisió.

Al Capítol 3 i l'Apèndix 1 s'observà com l'efecte dels canvis en els nivells d'ABA i/o melatonina depèn tant en fulles com en pètals de l'estat del desenvolupament que presenti l'òrgan tractat. I per tant que l'efecte serà molt diferent si l'òrgan és “jove”, o insensible a estímuls promotors de la senescència; seràn molt diferents a si és “madur” i per tant sensible; o “vell” i pot entrar per si sol en senescència, modulada per estímuls interns i externs.

2. Maduració de fruits

Els fruits carnosos han evolucionat per esdevenir més atractius als dispersors per mitjà del color i aroma (acumulant pigments i volàtils), estovament (degradació de la paret), i valor organolèptic i nutricional per dispersor (aroma, sabor, sucres, àcids orgànics, antioxidants, vitamines, etc.) (Gómez et al., 2014). Després de completar el seu desenvolupament, el fruit madura en un complex i estrictament regulat procés fisiològic per desenvolupar aquests trets. Els fruits poden continuar desenvolupant aquests trets (estovament, color, aromes) conduint a la

sobremaduració (*over-ripening*), en el que el fruit declina com a òrgan i perd el seu valor comercial. Les analogies entre els processos i els trets que es desenvolupen en la maduració de fruits i la senescència d'òrgans *sensu stricto* (representada en aquesta tesi per la senescència foliar i floral), i la seva regulació, són evidents. Diferents treballs han explorat aquestes analogies, comparant els canvis histològics, metabòlics i transcripcionals que caracteritzen aquests processos (Matas et al., 2009; Wagstaff et al., 2009; Gapper et al., 2013; Gómez et al., 2014). I tot que amb aquests estudis els autors confirmen aquestes similituds visuals i bioquímiques, la seva regulació transcripcional i metabòlica presenta característiques úniques de cada procés. Tot i que la literatura sobre postcollita fa servir el terme “senescència” per referir-se a la sobremaduració (Xi et al., 2016), els autors generalment arriben a la conclusió de què la sobremaduració és una extensió de la maduració, i la maduració en si un procés anàleg a la senescència d'òrgans (Gómez et al., 2014). És per això que aquesta tesi estudia aquests processos anàlegs i té l'atreviment d'englobar-los en el terme “processos de senescència d'òrgans”.

Els fruits són dividits en climatèrics o no climatèrics basant-se en diferències clau en la regulació hormonal de la seva maduració. Els fruits climatèrics presenten un pic en la producció d'etilè i la seva percepció associat a un pic en la respiració a l'inici de la maduració (Adams-Phillips et al., 2004). En els fruits no climatèrics—com els *Citrus*, el raïm, la maduixa—en canvi, no es produeix aquest pic d'etilè i respiratori que marca aquesta fase de la maduració. Encara que en alguns casos hi ha un augment de l'etilè sense el subseqüent pic respiratori que pot trobar-se associat a alguns paràmetres de maduració del fruit (Jiang & Joyce, 2003; Chervin et al., 2004), com en el cas dels gerds (Perkins-Veazie & Nonnecke, 1992). Sense l'etilè com a principal promotor de la maduració, la literatura recull evidències de què en fruits no climatèrics l'ABA o el balanç entre l'ABA i IAA podrien assumir aquest rol (Archbold & Dennis, 1984; Perkins-Veazie, 1995; Jia et al., 2011; Seymour et al., 2013b). Els nivells de IAA són elevats en les fases inicials de creixement i expansió del fruit en desenvolupament, per disminuir en els estadis

posteriors de maduració; mentre l'ABA presenta un patró antagonista, essent acumulat a partir de l'inici de la maduració (Symons et al., 2012; Seymour et al., 2013b). La regulació hormonal del desenvolupament i maduració del fruit és complexa, amb patrons comuns a la majoria de fruits estudiats que associen més hormones amb els diferents estadis del desenvolupament i maduració dels fruits (Cherian et al., 2014; Kumar et al., 2014).

Els continguts d'ABA són molt baixos durant les primeres fases del desenvolupament del fruit, però augmenten a mesura que el fruit madura, augmentant dràsticament amb l'inici de la maduració. Per això, generalment es considera que l'ABA té un important rol en la regulació de la inducció i progressió de la maduració del fruit i de les característiques del fruit associades a la maduració (Seymour et al., 2013b). S'han acumulat múltiples evidències per considerar l'ABA com a regulador clau de la maduració tant en fruits climatèrics com no climatèrics (revisat recentment per Leng et al. (2014)): (i) hi ha una dràstica acumulació de ABA durant l'inici de la maduració i/o durant tot el procés de maduració del fruit; (ii) aquesta acumulació d'ABA precedeix l'emissió d'etilè i el climateri en la majoria de fruits climatèrics (Zhang et al., 2009), però també en fruits no climatèrics però sensibles a l'etilè (Jiang & Joyce, 2003); (iii) a més, aplicacions exògenes d'ABA promouen l'acumulació de metabòlits associats amb la maduració i en molts casos també canvis en la textura del fruit (Setha, 2012); (iv) fruits als quals deficients en la síntesi i/o percepció d'ABA presenten un desenvolupament anormal i retarden molt o redueixen dràsticament l'acumulació de metabòlits associats amb la maduració com antocianines o sucres solubles (Taylor et al., 2000; Rodrigo et al., 2003; Jia et al., 2011; Romero et al., 2012; Ji et al., 2014). D'aquesta manera una disrupció total de la senyalització per ABA pot aturar la maduració del fruit (Chai et al., 2011).

L'expressió dels elements de les vies de percepció d'ABA canvien dinàmicament durant el desenvolupament i la maduració del fruit (Romero et al., 2012; Sun et al., 2016), per tant l'efecte de les aplicacions d'ABA depèn de l'estat

de desenvolupament del fruit. En fruits climatèrics l'ABA exogen promou el metabolisme i la senyalització d'ABA i etilè, accelerant la maduració (Jiang et al., 2000b; Zhang et al., 2009). En fruits no climatèrics, l'aplicació d'ABA—combinat amb altres reguladors del creixement (PGRs, *plant growth regulators*)—a la planta sencera abans o durant el quallat del fruit ha estat explorat com agent d'aclarida, amb efectes variables sobre la producció i qualitat del fruit (Greene & Costa, 2013). Pocs estudis exploren l'aplicació biotecnològica de l'ABA i els seus anàlegs (Setha, 2012; Rademacher, 2015). Així, la recerca de compostos que puguin activar selectivament els receptors d'ABA (agonistes d'ABA) i puguin ser aplicats sense restriccions al camp és un camp molt actiu, inclús manipulant receptors d'ABA perquè siguin sensibles a compostos ja aprovats i en ús en la producció (Park et al., 2015). Quan l'ABA és aplicat a l'estadi verd (entre el quallat i l'inici de la maduració del fruit) el contingut i el metabolisme d'altres fenilpropanoïdes com els tanins són afectats (Lacampagne et al., 2010). La literatura que explora els possibles efectes d'aplicacions d'ABA just després de la formació del fruit (*fruit set*) és escassa i presenta resultats molt variables (Setha, 2012; McAtee et al., 2013). En la majoria dels casos, l'aplicació d'ABA té lloc abans o durant l'inici de la maduració i els efectes estudiats són limitats als principals marcadors de maduració de cada fruit. En aquestes condicions, la literatura generalment observa l'augment de l'acumulació de fenols (incloent-hi antocianines) i sucres solubles, augment de l'activitat antioxidant, i en alguns casos estovament del fruit (Ma et al., 2008; Giribaldi et al., 2010; Setha, 2012; Leng et al., 2014). Aplicacions repetides durant el desenvolupament i la maduració poden retardar la maduració sense efectes en el contingut d'antioxidants (Buran et al., 2012). Per tant una aplicació durant el quallat del fruit podria tenir efectes limitats a un increment en el contingut d'antioxidants com s'observà al Capítol 2.

L'aplicació d'ABA i/o pirabactina va suposar un augment important del contingut de vitamina C a fruits madurs de gerdera (Capítol 2). Un augment del contingut d'ascorbat en plantes, òrgans i productes frescs millora la tolerància a estressos abiòtics (Hemavathi et al., 2009; Gallie, 2013). I els estressos abiòtics són

un dels principals factors que determinen la longevitat post-collita (Toivonen & Hodges, 2011). Per tant, és especialment rellevant la comprensió de la fisiologia i el metabolisme dels antioxidants per optimitzar el valor nutricional i la longevitat del producte fresc. Les condicions ambientals, el genotip, l'estadi de maduració del fruit i l'impacte de les pràctiques de maneig del cultiu i de processament del producte fresc afecten el contingut de vitamina E als fruits carnosos (Raiola et al., 2015). En un primer estudi (Capítol 1) es va descriure l'efecte de l'aplicació d'ABA al quallat del fruit sobre la vitamina E del fruit madur. El tractament amb ABA causà un efecte limitat sobre els nivells de δ -tocoferol en el fruit madur aparegut a la segona fructificació de la temporada, a la tardor. Aquest efecte no s'observa en els fruits tractats amb ABA i/o pirabactina durant la principal fructificació a la primavera (Capítol 2).

El metabolisme de la vitamina C durant la maduració dels fruits carnosos està lligada a la resistència a estressos abiòtics i biòtics, tant a la planta com a la post-collita (Kalt et al., 1999). Durant la maduració l'ascorbat generalment s'acumula, tant per l'augment de la seva biosíntesi a partir de sucres solubles com a partir de la degradació de polisacàrids de la paret (Bartoli et al., 2016). Durant la maduració els enzims que consumeixen la forma reduïda i, especialment, els implicats en el seu reciclatge són claus pel contingut final d'ascorbat (Bartoli et al., 2016). Al Capítol 2 es mostrà com el tractament amb ABA i/o pirabactina afectava l'estat redox de la vitamina C i l'activitat enzimàtica d'enzims del seu metabolisme i reciclatge durant la maduració per augmentar el contingut de vitamina C total a l'estadi Dark Red.

Encara que aplicacions d'ABA han demostrat el seu potencial per millorar la qualitat d'alguns fruits (Setha, 2012), la comercialització d'aquestes és limitada per la seva sensibilitat a la llum i el seu ràpid catabolisme a la planta (Zaharia et al., 2005). Els nivells d'ABA i els seus metabòlits són dinàmics i estan estrictament regulats; així és possible que l'ABA aplicat sigui degradat per la llum o el metabolisme abans que el producte sigui collit o arribi al consumidor. En canvi, les

dinàmiques de la pirabactina no han estat descrites per la literatura científica ni les fitxes tècniques. Aquesta potencial diferència en les dinàmiques de degradació dels diferents tractaments pot representar diferències en la dosi efectiva, l'extensió en el temps i l'impacte del tractament. Les aplicacions de pirabactina s'han demostrat efectives en reduir lleugerament la longevitat comercial de flors de *Lilium* (Arrom & Munné-Bosch, 2012a) o reduint l'efecte d'inhibidors de la senescència en el cas de la senescència de fulles en vares florals de *Lilium* (Arrom & Munné-Bosch, 2012b). Aquests estudis només descriuen canvis visuals i del contingut de clorofil·les, però no els efectes dels tractaments als continguts de vitamina C (o el seu estat redox) o el contingut de proteïnes. Els capítols 2 i 3 són les primeres descripcions publicades a la literatura científica dels efectes d'aplicacions de pirabactina i els subseqüents canvis bioquímics i moleculars en espècies d'interès hortícola.

Aquestes interpretacions són condicionades pel fet que tant les mesures de les formes de vitamina C com les determinacions d'activitat enzimàtica varen ser determinades a partir d'extractes de tot l'òrgan. Diferents compartiments cel·lulars presenten diferents estats redox i diferents isoformes d'enzims que participen en la funció i reciclatge de l'ascorbat. Aquesta activitat enzimàtica té funcions biològiques molt diferents en els diferents compartiments cel·lulars (Foyer & Noctor, 2009; Xia et al., 2015). L'apoplast, que generalment és un dels principals *pools* d'ascorbat està especialment oxidat. Les diferències entre compartiments tenen una important funció en la regulació de processos del desenvolupament (inclosa la maduració de fruits), i la percepció i resposta a estressos (Foyer & Noctor, 2011; Rogers, 2012; Munné-Bosch et al., 2013; Palma et al., 2015).

D'aquesta manera, als Capítols 1 i 2 es mostrarà l'efecte de l'increment dels nivells d'ABA o la manipulació de la seva senyalització per l'aplicació de pirabactina durant el quallat del fruit. S'observaren efectes sobre el contingut d'antioxidants d'interès nutricional com les vitamines C i E, i el seu metabolisme i estat redox.

3. Metodologia: avantatges i dificultats de plantes no model i diferents aproximacions analítiques

Precisament amb tots els canvis que tenen lloc a nivell bioquímic i histològic, els teixits senescents són teixits amb els que és difícil treballar. Aquests requereixen força temps, recursos i experiència per adaptar qualsevol metodologia que generalment ha estat desenvolupada per a teixits joves o madurs, però presenten un gran interès.

L'estudi de plantes no model

Moltes plantes no model són recursos indispensables per alimentació humana i animal, fibres o com a font d'energia. I precisament ho són perquè presenten característiques úniques en la seva estructura, metabolisme o la seva regulació. Això dificulta el trasllat dels resultats dels estudis en plantes model a aplicacions biotecnològiques o programes de millora en plantes d'interès agronòmic (Carpentier et al., 2008)

Com recentment Blum (2015) discuteix, molta precaució és necessària per intentar predir els beneficis en la producció agrícola extrapolant les respostes i la magnitud dels efectes observats en plàntules d'*Arabidopsis* i altres espècies a estressos i pertorbacions curts i intensos en plantes de cultiu. Aquesta és una debilitat de la recerca amb models i protocols d'estrès i processos del desenvolupament poc realistes. Ampliar els models utilitzats i apropar els protocols de tractament i condicions ambientals a la realitat de la producció és necessari. Per exemple, el paper de l'ABA en la resposta a estressos abiòtics és àmpliament estudiat a nivell fisiològic, bioquímic i molecular; però ha tingut un impacte molt limitat en els resultats als programes de millora (Blum, 2015). Tot i això, en altres processos biològics en què els models emprats en recerca bàsica són més propers a aquells emprats en la producció hortícola i de flors existeixen tractaments exògens d'ús comercial que utilitzen ABA, i antagonistes del seu

metabolisme (Rademacher, 2015). En són exemples la millora del color del raïm, i el control de la dormició de bulbs i gemmes (Rademacher, 2015).

A l'hora de valorar el potencial biotecnològic d'una aplicació exògena, i la validesa d'un experiment que inclou tractaments químics, s'han de tenir en compte moltes característiques fisicoquímiques, com la solubilitat en les diferents solucions; adherència o adsorció a materials usats durant la manipulació i aplicació; sensibilitat a llum, temperatura, pH; reaccions amb altres compostos d'altres tractaments emprats habitualment en el cultiu, etc. Però també els efectes de la seva metabolització per la planta, l'ambient, i pels operaris i consumidors.

La millora del contingut de vitamines i altres compostos d'interès organolèptic o nutricional per programes de millora o pràctiques de maneig pre- i post-collita pot generar rendiments tant a nivell de nutrició humana i animal, com de millora de la resistència a l'estrès. Aquest benefici s'aplica tant a vitamines (Fitzpatrick et al., 2012; Hanson et al., 2016) com a glucosinolats (Ishida et al., 2014). Ja als anys 1950 es parlava de la rellevància de les vitamines per les plantes. A 'The chemical cure of climatic lesions' (Bonner, 1957) ja es recollí la importància que tindria el potencial de control dels efectes dels estressos abiòtics en els cultius mitjançant 'compostos químics', vitamines i altres metabòlits. Temperatures extremes, alta intensitat de llum, canvis de pH, i l'acumulació de ROS promoguda per molts estressos consumeixen els *pools* de vitamines i antioxidants. La capacitat antioxidant total dels fruits carnosos pot ser millorada per moltes estratègies de millora o de maneig, però la resistència a diferents estressos depèn de l'acumulació d'antioxidants específics (Zhang et al., 2015c).

L'estudi de plantes no model en recerca bàsica presenta dificultats, però l'esforç per adequar les tècniques i els conceptes desenvolupats en plantes models posa a prova la robustesa d'aquests davant la diversitat de les plantes. Entendre i poder manipular aquesta diversitat morfològica, fisiològica i metabòlica és un gran recurs per explotar.

Limitacions dels estudis de senescència

L'heterogeneïtat dins dels òrgans no és normalment considerada a l'hora d'estudiar aquests processos. Les fulles i els òrgans florals no són estructures uniformes. En particular, només la meitat de les cèl·lules d'una fulla madura contenen cloroplasts (Thomas et al., 2003). Considerar tot un òrgan com si fos un conjunt de cèl·lules homogènies que es desenvolupen i responen sincronitzadament és una aproximació limitada (Thomas et al., 2003). En el cas de la senescència de pètals o tèpals la degradació del mesòfil als marges dels tèpals es produeix abans que els signes visuals de senescència (pèrdua de turgència, translucidesa, *rolling*) siguin visibles a *Alostromeria*, *Hemerocallis*, *Iris* o *Lilium* (Stead & van Doorn, 1994; Bailly et al., 2001; Wagstaff et al., 2003; Battelli et al., 2011). En altres espècies, aquest col·lapse de les cèl·lules del mesòfil només té lloc quan la deshidratació és visible (Stead & van Doorn, 1994). De forma limitada, l'estudi de paràmetres fisiològics, bioquímics i hormonals en diferents franges de col (Capítol 2) permet evidenciar aquestes diferències i la seva importància per l'estudi tant del fenomen de la senescència foliar en si com en qualsevol aplicació biotecnològica.

La transdiferenciació cel·lular que té lloc durant la senescència d'òrgans manifesta unes característiques i una regulació similar a la d'altres models més simples. És el cas de la senescència induïda per factors externs en organismes unicel·lulars com *Chlorella* o en la rediferenciació que té lloc durant l'aïllament de protoplasts (Thomas et al., 2003; Jayaraman et al., 2015). Aquests models poden facilitar l'estudi de mecanismes cel·lulars simples, però la seva interacció en el complex sistema ordenat en el temps i l'espai de diferents teixits i tipus cel·lulars que conforma un òrgan vegetal és el que dona als processos fisiològics les seves característiques.

L'heterogeneïtat en el temps i l'espai dins un òrgan és clau per la seva funció. Però, especialment en processos dinàmics com la senescència, fa més complex el seu estudi i interpretació.

Aplicacions exògenes. Aproximació farmacològica?

Molts dels elements de síntesi i percepció d'ABA són codificats per àmplies famílies gèniques, donant molta flexibilitat al sistema en diferents teixits i estadis del desenvolupament però alhora dificultant la seva identificació i estudi per tècniques genètiques clàssiques (*forward genetics*, estudi de mutants i transgènics deficients i/o sobreexpressors) (Cutler et al., 2010; Park et al., 2015). Així, tècniques bioquímiques o farmacològiques han estat claus. Per exemple, els receptors PYR/PYL/RCAR van ser identificats per la seva resistència a la pirabactina (Park et al., 2009).

L'ús de tècniques moleculars per si sol no és tampoc necessàriament conclouent. Per exemple, Haughn & Somerville (1987) estimà que el nombre de mutacions en una línia mutant d'*Arabidopsis thaliana* generada per EMS (metanosulfat d'etil)—el mutagen químic més emprat en plantes—presenta *ca.* 200 mutacions puntuals. Una estimació més recent amb una aproximació similar eleva l'estimació a 700 mutacions (Jander et al., 2003). Així que per assegurar que el fenotip observat és causat per la mutació identificada per l'*screening* i no qualsevol de les altres és necessari l'ús d'assajos de complementació o d'aplicacions exògenes per rescatar el fenotip i confirmar la relació causal (Pastori et al., 2003). En el cas de línies d'inserció mai es poden descartar efectes pleiotròpics difícils de predir o detectar per la localització de la inserció o insercions, o perquè el procés d'inserció hagi causat reorganitzacions cromosòmiques (Hu et al., 2017). L'estudi de la vitamina C presenta un recent exemple d'aquesta problemàtica. El mutant *vtc2-1* (deficient en la biosíntesi de vitamina C) presenta transcrits normals de *VTC2* però les proteïnes codificades presenten una activitat reduïda, presentant nivells reduïts d'ascorbat i un alentiment del creixement, com els mutants *vtc1*. Un nou *knockout* de *VTC2* no té el transcrit i presenta baix contingut d'ascorbat però no un retard del creixement (Lim et al., 2016). Probablement per efecte de mutacions pleiotròpiques.

L'ABA és potser una de les fitohormones o reguladors del creixement més estudiats pel seu rol clau tant en diferents fases del desenvolupament com en la senyalització i resposta a estressos biòtics i abiòtics (Dörffling, 2015). Això compren l'estudi d'aquests processos a totes les escales espacials i temporals, des de la relocalització de transportadors d'ABA en resposta a la detecció d'estrès salí (Park et al., 2016) a la integració de tots aquests detalls reguladors mecanístics en fenotips al camp (Blum, 2015). Sorprenentment les aplicacions d'aquests nombrosos estudis a la producció agronòmica o biotecnològica és força limitada, en comparació amb altres reguladors del creixement (Blum, 2015; Dörffling, 2015; Rademacher, 2015). Hi ha dues limitacions importants: l'ABA és fotosensible (Zaharia et al., 2005), i la seva síntesi química és complexa, encara que alguns fongs fitopatògens en produeixen en grans concentracions (Zaharia et al., 2005; Rademacher, 2015). Existeixen agonistes sintètics no registrats encara i que presenten una síntesi complexa i encara massa costosa pel seu ús a gran escala (Rademacher, 2015).

Una de les poques aplicacions efectives i extenses d'aquest volum de coneixement sobre la fisiologia de l'ABA són les tècniques de *Partial Root Drying* (PRD, assecament parcial de les rels) per estimular la regulació del balanç hídric i les reserves d'aigua del sòl en cultius àrids. (Blum, 2015). L'altre ús estès en la indústria és el control de la dormició en gemmes i bulbs per evitació d'estressos o durant l'emmagatzemament. La pirabactina (*pyrabactin*) és un agonista parcial d'aquesta família de receptors, interaccionant amb alguns membres. Com a agonista, induint la transducció de senyal; o com a antagonista, unint-se al receptor de forma no productiva (sense activar transducció) i per tant competint amb l'activació per l'ABA. Aquesta selectivitat de la pirabactina i compostos derivats ha contribuït a la caracterització de la percepció d'ABA i la seva transducció per tècniques de *chemical biology* o farmacològiques habituals en l'estudi d'altres sistemes (Benson et al., 2015; Park et al., 2015). Altres estudis han fet servir fluridona o norflurazon com a inhibidors de la síntesi de ABA (Spollen et al., 2000), però els seus efectes van molt més enllà en ser inhibidors de la fitoè

desaturasa i per tant afectar la síntesi de tots els carotenoides i metabòlits que se'n deriven. Recentment s'ha caracteritzat l'ABA ANTAGONIST1 (AA1), una molècula capaç d'inhibir les respostes induïdes per ABA unint-se a tots els receptors per bloquejar la interacció amb PP2Cs (Ye et al., 2017). Entre els fenotips que causa es troba el retard de la senescència i els autors asseguren que la seva síntesi és prou senzilla i barata per fer factible el seu ús en producció.

Els milloradors i agrònoms tenen sempre present la importància de tots els elements de la llarga cadena entre el productor i el plat. I com qualsevol millora biotecnològica requereix tenir en compte tots els actors de la cadena alimentària. Per considerar l'impacte real d'una millora del contingut nutricional com les mostrades al Capítol 3 s'ha de tenir en compte les pèrdues pre- i post-collita, al llarg de tota la cadena logística, així com el cuinat i l'assimilació d'aquest increment nutricional acompanyat per la matriu vegetal (Lee & Kader, 2000; Kader, 2005; Fitzpatrick et al., 2012).

Una aplicació exògena representa un augment puntual de concentració més o menys llarg, atenuat progressivament per la metabolització *in planta* i la degradació a la superfície o medi. Les dinàmiques d'absorció, transport als llocs d'acció i metabolització poden ser molt complexes i difícils d'estudiar. La distribució d'un regulador del creixement entre els teixits d'un òrgan i entre els compartiments d'una cèl·lula són molt rellevants per la seva acció biològica. Qualsevol regulador del creixement pot causar diferents efectes a diferents teixits i/o diferents compartiments dins la cèl·lula. L'ús de precursors, que en principi fossin inactius fins a arribar al teixit i compartiment on s'expressessin els enzims necessaris per a la seva metabolització al compost actiu pot ser una alternativa. L'ús de compostos que són transportats activament o passivament pels teixits conductors és una altra estratègia, que és usada pels productes fitosanitaris sistèmics.

Quan l'aplicació d'un compost químic, com l'ABA o els seus agonistes, té lloc en parts de la planta que seran consumides, és necessari considerar la seguretat del

consumidor. L'ABA es produït per un gran rang d'animals, des d'animals inferiors a la majoria de teixit dels mamífers, on actua com a regulador paracrí en respostes a estressos, regulació immune, i regulació de la producció d'insulina (Tossi et al., 2012). Els receptors d'ABA són força diferents en animals i plantes (Tossi et al., 2012), així que el possible efecte dels seus agonistes a diferents regnes és improbable però hauria de ser considerat. L'ABA pot actuar com a inhibidor del creixement i proliferació en cèl·lules canceroses, però no presenta efectes significatius en cèl·lules sanes (Li et al., 2011).

Les aplicacions exògenes són una eina força directa per estudiar la funció d'un compost, però el seu ús tant a la recerca bàsica com la seva aplicació biotecnològica presenten limitacions que s'han de considerar a l'hora de dissenyar un estudi i valorar-ne els resultats.

Tècniques -òmiques.

Les tècniques de seqüenciació de nova generació (*next gen sequencing*) han obert la porta a noves possibilitats tant en la recerca de respostes a preguntes de recerca bàsica com en el disseny i millora de noves varietats de cultius. Aquestes tecnologies permeten l'anàlisi ràpid, relativament barat i exhaustiu de poblacions complexes d'àcids nucleics com pot ser-ho el transcriptoma d'una planta (Bräutigam & Gowik, 2010). La producció, quantificació i anàlisi d'aquestes seqüències requereix el desenvolupament i aplicació d'eines bioinformàtiques (Bräutigam & Gowik, 2010). Tècniques i eines en principi agnòstiques respecte l'espècie i teixit subjacent, permetent estendre aquestes anàlisis sistèmiques a plantes no model (Unamba et al., 2015).

Aquestes tècniques poden permetre caracteritzar i entendre la diversitat de metabolisme i fisiologies del desenvolupament i les respostes a estressos present en el regne vegetal. Permeten estudiar els processos de diversificació en si i la seva relació amb l'ambient, però també l'anàlisi evolutiu i la millora assistida per marcadors. L'evolució de les tècniques no dirigides i amb d'alta capacitat (*high-*

throughput) permeten ampliar el rang de plantes amb les quals es pot treballar de forma efectiva. I la diversitat de metabolisme amb elements i regulació diferents. D'aquesta manera complementant el fenotipat en molts estudis de recerca bàsica o biotecnològica, o en moltes fases de programes de millora directament substituint el fenotipat.

L'anàlisi del transcriptoma és una tècnica no dirigida i robusta però que biaixos introduïts per teixits o òrgans poc estudiats (Aird et al., 2011; Conesa et al., 2016), però també presents en anàlisi bioquímiques o determinacions enzimàtiques (Queval et al., 2008). Les eines bioinformàtiques per reconstruir un genoma o assignar funcions a transcrits detectats són en principi agnòstiques respecte a l'espècie o el teixit emprat. La realitat és que la facilitat de l'anàlisi i la capacitat d'explotar i extreure tota la informació d'un experiment individual és molt més limitat sense un context d'altres òrgans, edats, ambients, processos o respostes amb el mateix model. El volum de dades generat i l'elevat nombre de passos que presenten les anàlisis entre les dades senes processar i el resultat de l'anàlisi requereix un èmfasi renovat en la importància de les bones pràctiques. És vital la documentació raonada dels processos i decisions que condueixen a la tria del disseny experimental, eines emprades en les anàlisis i els paràmetres triats, així com la necessitat de la seva divulgació en les comunicacions dels resultats obtinguts (Conesa et al., 2016).

Un altre factor a tenir en compte és assumir les limitacions del que representen canvis transcripcionals. Un estudi global de la resposta transcriptòmica i proteòmica a ABA de suspensions cel·lulars d'*Arabidopsis* presenta una pobra correlació entre els canvis a nivell transcripcional i de proteïnes ($r = 0.66$) (Böhmer & Schroeder, 2011). El gran nombre de transcrits i proteïnes regulats diferencialment denota la necessitat d'entendre mecanismes addicionals de regulació, no només de la quantitat de transcrit o proteïna, sinó de la seva activitat enzimàtica o transactivadora per modificacions post-traduccionals.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- Els processos de senescència de fulles i flors, i de maduració de fruits, comparteixen característiques fisiològiques i de la seva regulació hormonal i redox.
- Els reguladors endògens analitzats (fitohormones, estat redox, i la seva regulació transcripcional) mostren variacions significatives al llarg dels processos de senescència post-collita de fulles i flors, i de maduració de fruits.
- L'ABA resulta ser un important regulador dels processos de senescència foliar i floral, i de maduració de fruits.
- L'aplicació d'ABA i/o pirabactina promou canvis en els continguts de vitamina C i E, i el seu estat redox durant la maduració de gerds.
- La pirabactina presenta els mateixos efectes sobre la vitamina C en la maduració de gerds que l'ABA, però també disminueix el contingut proteic del fruit.
- L'ABA retarda la senescència foliar post-collita de *Brassica oleracea* var capitata, a través dels nivells endògens i la regulació transcripcional del metabolisme i la senyalització d'ABA, citocinines i etilè.
- L'ABA retarda la senescència foliar post-collita de *Brassica oleracea* var capitata, a través de la desregulació de factors de transcripció que coordinen processos del desenvolupament i resposta a estressos, mantenint la funcionalitat del cloroplast, contingut hídric i l'homeòstasi redox i cel·lular.
- L'ABA redueix la transcripció de mecanismes de percepció i resposta a estressos biòtics durant la senescència foliar post-collita de *Brassica oleracea* var capitata, incloent la desregulació del metabolisme de glucosinolats i fenilpropanoïdes.
- El tractament combinat amb ABA i pirabactina generalment augmenta la magnitud dels efectes observats només amb ABA en la senescència foliar de *B. oleracea* var capitata.

- La melatonina allarga la longevitat de la flor i especialment els darrers estadis de senescència floral de *Lilium* amb efectes dependents de la concentració, temps d'aplicació i patró de senescència de la varietat tractada.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abner EL, Schmitt FA, Mendiando MS, Marcum JL, Kryscio RJ** (2011) Vitamin E and all-cause mortality: a meta-analysis. *Curr Aging Sci* **4**: 158–170
- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J** (2004) Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci* **9**: 331–338
- Aharoni N** (1989) Interrelationship between ethylene and growth regulators in the senescence of lettuce leaf discs. *J Plant Growth Regul* **8**: 309–317
- Aird D, Ross MG, Chen W-S, Danielsson M, Fennell T, Russ C, Jaffe DB, Nusbaum C, Gnrke A** (2011) Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol* **12**: R18
- Almeida J, Azevedo M da S, Spicher L, Glauser G, vom Dorp K, Guyer L, del Valle Carranza A, Asis R, de Souza AP, Buckeridge M, et al** (2016) Down-regulation of tomato *PHYTOL KINASE* strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenyl lipid metabolism in an organ-specific manner. *J Exp Bot* **67**: 919–934
- Alós E, Rodrigo MJ, Zacarías L** (2013) Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci* **207**: 2–11
- Alós E, Rodrigo MJ, Zacarías L** (2014) Differential transcriptional regulation of L-ascorbic acid content in peel and pulp of citrus fruits during development and maturation. *Planta* **239**: 1113–1128
- Ansari MW, Tuteja N** (2015) Post-harvest quality risks by stress/ethylene: management to mitigate. *Protoplasma* **252**: 21–32
- Anttonen MJ, Karjalainen RO** (2005) Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *J Food Compos Anal* **18**: 759–769
- Archbold D, Dennis F** (1984) Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit-development. *J Am Soc Hortic Sci* **109**: 330–335
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J** (2014) Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends Plant Sci* **19**: 789–797
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J** (2015) Functions of melatonin in plants: a review. *J Pineal Res* **59**: 133–150

- Arrigoni O, De Tullio MC** (2000) The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *J Plant Physiol* **157**: 481–488
- Arrigoni O, De Tullio MC** (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta BBA–General Subj* **1569**: 1–9
- Arrom L** (2012) Senescència floral en *Lilium*: importància dels reguladors endògens i efectes de les aplicacions exògenes. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona
- Arrom L, Munné-Bosch S** (2012a) Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*. *Planta* **236**: 343–354
- Arrom L, Munné-Bosch S** (2010) Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence. *Plant Sci* **179**: 289–295
- Arrom L, Munné-Bosch S** (2012b) Hormonal regulation of leaf senescence in *Lilium*. *J Plant Physiol* **169**: 1542–1550
- Asada K** (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* **141**: 391–396
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 601–639
- Asensi-Fabado MA, Ammon A, Sonnewald U, Munné-Bosch S, Voll LM** (2015) Tocopherol deficiency reduces sucrose export from salt-stressed potato leaves independently of oxidative stress and symplastic obstruction by callose. *J Exp Bot* **66**: 957–971
- Asensi-Fabado MA, Munné-Bosch S** (2010) Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends Plant Sci* **15**: 582–592
- Ashman T-L, Schoen DJ** (1994) How long should flowers live? *Nature* **371**: 788–791
- Atkinson J, Epand RF, Epand RM** (2008) Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radic Biol Med* **44**: 739–764
- Azzi A** (2007) Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radic Biol Med* **43**: 16–21
- Badejo AA, Wada K, Gao Y, Maruta T, Sawa Y, Shigeoka S, Ishikawa T** (2012) Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *J Exp Bot* **63**: 229–239

- Bailly C, Corbineau F, van Doorn WG** (2001) Free radical scavenging and senescence in *Iris* tepals. *Plant Physiol Biochem* **39**: 649–656
- Balestrini R, Ott T, Güther M, Bonfante P, Udvardi MK, De Tullio MC** (2012) Ascorbate oxidase: the unexpected involvement of a “wasteful enzyme” in the symbioses with nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol Biochem* **59**: 71–79
- Barth C, Tullio MD, Conklin PL** (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *J Exp Bot* **57**: 1657–1665
- Bartoli CG, Casalongué CA, Simontacchi M, Marquez-Garcia B, Foyer CH** (2013) Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ Exp Bot* **94**: 73–88
- Bartoli CG, Senn ME, Grozeff GEG** (2016) Physiological processes contributing to the synthesis of ascorbic acid in plants. *A* DK Gupta, JM Palma, FJ Corpas, eds, Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 71–92
- Bast A, Haenen GRMM** (2013) Ten misconceptions about antioxidants. *Trends Pharmacol Sci* **34**: 430–436
- Bast A, Haenen GRMM** (2002) The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environ Toxicol Pharmacol* **11**: 251–258
- Battelli R, Lombardi L, Rogers HJ, Picciarelli P, Lorenzi R, Ceccarelli N** (2011) Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum*. *Plant Sci* **180**: 716–725
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N** (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* **65**: 1229–1240
- Beekwilder J, Hall RD, Ric Vos CHD** (2005a) Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. *BioFactors* **23**: 197–205
- Beekwilder J, Jonker H, Meesters P, Hall RD, van der Meer IM, Ric de Vos CH** (2005b) Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J Agric Food Chem* **53**: 3313–3320
- Beekwilder J, van der Meer IM, Simic A, Uitdewilligen J, van Arkel J, de Vos RCH, Jonker H, Verstappen FWA, Bouwmeester HJ, Sibbesen O, et al** (2008) Metabolism of carotenoids and apocarotenoids during ripening of raspberry fruit. *BioFactors* **34**: 57–66
- Beilstein MA, Al-Shehbaz IA, Kellogg EA** (2006) Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *Am J Bot* **93**: 607–619

- Ben-Ari G** (2012) The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* **31**: 1357–1369
- Benschop M, Kamenetsky R, Emeritus MLND, Okubo H, Emeritus ADHP** (2010) The global flower bulb industry: production, utilization, research.
- Benson CL, Kepka M, Wunschel C, Rajagopalan N, Nelson KM, Christmann A, Abrams SR, Grill E, Loewen MC** (2015) Abscisic acid analogs as chemical probes for dissection of abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **113**: 96–107
- Bisby RH, Parker AW** (1995) Reaction of ascorbate with the α -tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch Biochem Biophys* **317**: 170–178
- Blum A** (2016) Stress, strain, signaling, and adaptation—not just a matter of definition. *J Exp Bot* **67**: 562–565
- Blum A** (2015) Towards a conceptual ABA ideotype in plant breeding for water limited environments. *Funct Plant Biol* **42**: 502–513
- Böhmer M, Schroeder JI** (2011) Quantitative transcriptomic analysis of abscisic acid-induced and reactive oxygen species-dependent expression changes and proteomic profiling in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant J* **67**: 105–118
- Bonner JF** (1957) The chemical cure of climatic lesions. *Eng Sci* **20**: 28–30
- Bostock RM, Pye MF, Roubtsova TV** (2014) Predisposition in plant disease: exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annu Rev Phytopathol* **52**: 517–549
- Boursiac Y, Léran S, Corratgé-Faillie C, Gojon A, Krouk G, Lacombe B** (2013) ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci* **18**: 325–333
- Braun P, Aubourg S, Van Leene J, De Jaeger G, Lurin C** (2013) Plant protein interactomes. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 161–187
- Bräutigam A, Gowik U** (2010) What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research: next generation sequencing. *Plant Biol* **12**: 831–841
- Brigelius-Flohé R** (2009) Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radic Biol Med* **46**: 543–554
- Buchanan-Wollaston V** (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* **48**: 181–199
- Buran TJ, Sandhu AK, Azeredo AM, Bent AH, Williamson JG, Gu L** (2012) Effects of exogenous abscisic acid on fruit quality, antioxidant capacities,

- and phytochemical contents of southern high bush blueberries. *Food Chem* **132**: 1375–1381
- Byeon Y, Back K** (2015) Molecular cloning of melatonin 2-hydroxylase responsible for 2-hydroxymelatonin production in rice (*Oryza sativa*). *J Pineal Res* **58**: 343–351
- Byeon Y, Choi G-H, Lee HY, Back K** (2015) Melatonin biosynthesis requires *N*-acetylserotonin methyltransferase activity of caffeic acid *O*-methyltransferase in rice. *J Exp Bot* **66**: 6917–6925
- Byeon Y, Park S, Lee HY, Kim Y-S, Back K** (2014) Elevated production of melatonin in transgenic rice seeds expressing rice tryptophan decarboxylase. *J Pineal Res* **56**: 275–282
- Cantwell M, Suslow T** (2001) Cabbage (round & chinese types): Recommendations for maintaining postharvest quality. *Perish. Handl.* 107 UC Davis Postharvest Technol.
- Carpentier SC, Panis B, Vertommen A, Swennen R, Sergeant K, Renaut J, Laukens K, Witters E, Samyn B, Devreese B** (2008) Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. *Mass Spectrom Rev* **27**: 354–377
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Álvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM** (2013) Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci* **14**: 8638–8683
- Carvalho E, Fraser PD, Martens S** (2013) Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chem* **139**: 744–752
- Cela J, Chang C, Munne-Bosch S** (2011) Accumulation of γ - rather than α -tocopherol alters ethylene signaling gene expression in the *vte4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **52**: 1389–1400
- Celikel FG, van Doorn WG** (1995) Solute leakage, lipid peroxidation, and protein degradation during the senescence of *Iris* tepals. *Physiol Plant* **94**: 515–521
- Chai Y, Jia H, Li C, Dong Q, Shen Y** (2011) FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *J Exp Bot* **62**: 5079–5089
- Chaudhary N, Khurana P** (2009) Vitamin E biosynthesis genes in rice: molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. *Plant Sci* **177**: 479–491
- Chen WL, Hsiao CH, Chen YC, Chen YW** (2012) Effect of cultivar, position, fertilizer quantity and low temperature storage on the antioxidant activity of cabbages.

- Cherian S, Figueroa CR, Nair H** (2014) “Movers and shakers” in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *J Exp Bot* **65**: 4705–4722
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan J-P, Latché A, Lamon J, Bouzayen M** (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci* **167**: 1301–1305
- Chiang MS, Chong C, Landry BS, Crête R** (1993) Cabbage: *Brassica oleracea* subsp. *capitata* L. A G Kalloo, BO Bergh, eds, Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon, Amsterdam, Holland, pp 113–155
- Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN** (1997) γ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and complements α -tocopherol: Physiological implications. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 3217–3222
- Cisneros-Zevallos L** (2003) The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *J Food Sci* **68**: 1560–1565
- Combs GF** (2012) *The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*, 4th edition. Elsevier, Amsterdam, Holland
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczesniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, et al** (2016) A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol* **17**: 13
- Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF** (1965) Chemistry and physiology of “dormins” in sycamore: identity of sycamore “dormin” with abscisin II. *Nature* **205**: 1269–1270
- Cornwell DG, Ma J** (2007) Studies in vitamin E: biochemistry and molecular biology of tocopherol quinones. A Gerald Litwack, ed, *Vitamins & Hormones*. Academic Press, Cambridge, UK, pp 99–134
- Cruz-Rus E, Amaya I, Sánchez-Sevilla JF, Botella MA, Valpuesta V** (2011) Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *J Exp Bot* **62**: 4191–4201
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–679
- De Ancos B, Gonzalez EM, Cano MP** (2000) Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J Agric Food Chem* **48**: 4565–4570

- Debolt S, Melino V, Ford CM** (2007) Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Ann Bot* **99**: 3–8
- DellaPenna D, Pogson BJ** (2006) Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 711–738
- Demmig-Adams B, Cohu CM, Amiard V, van Zadelhoff G, Veldink GA, Muller O, Adams WW** (2013) Emerging trade-offs–impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytol* **197**: 720–729
- Demmig-Adams B, Stewart JJ, Adams WW** (2014) Multiple feedbacks between chloroplast and whole plant in the context of plant adaptation and acclimation to the environment. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **369**: 20130244
- Dietz K-J** (2016) Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast? *Mol Cells* **39**: 20–25
- van Doorn WG** (2001) Categories of petal senescence and abscission: a re-evaluation. *Ann Bot* **87**: 447–456
- van Doorn WG, Çelikel FG, Pak C, Harkema H** (2012) Delay of *Iris* flower senescence by cytokinins and jasmonates. *Physiol Plant* **148**: 105–120
- van Doorn WG, Han SS** (2011) Postharvest quality of cut lily flowers. *Postharvest Biol Technol* **62**: 1–6
- van Doorn WG, Woltering EJ** (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. *J Exp Bot* **59**: 453–480
- Dörffling K** (2015) The discovery of abscisic acid: a retrospect. *J Plant Growth Regul* **34**: 795–808
- vom Dorp K, Hölzl G, Plohm C, Eisenhut M, Abraham M, Weber APM, Hanson AD, Dörmann P** (2015) Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**: 2846–2859
- Du S-Y, Zhang X-F, Lu Z, Xin Q, Wu Z, Jiang T, Lu Y, Wang X-F, Zhang D-P** (2012) Roles of the different components of magnesium chelatase in abscisic acid signal transduction. *Plant Mol Biol* **80**: 519–537
- Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W** (1995) Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res* **18**: 28–31

- Dykes WR** (1913) The genus *Iris*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Epstein SS, Forsyth J, Saporoschetz IB, Mantel N** (1966) An exploratory investigation on the inhibition of selected photosensitizers by agents of varying antioxidant activity. *Radiat Res* **28**: 322–335
- Ernst IMA, Pallauf K, Bendall JK, Paulsen L, Nikolai S, Huebbe P, Roeder T, Rimbach G** (2013) Vitamin E supplementation and lifespan in model organisms. *Ageing Res Rev* **12**: 365–375
- Esteban R, Olano JM, Castresana J, Fernández-Marín B, Hernández A, Becerril JM, García-Plazaola JI** (2009) Distribution and evolutionary trends of photoprotective isoprenoids (xanthophylls and tocopherols) within the plant kingdom. *Physiol Plant* **135**: 379–389
- Eugeni Piller L, Glauser G, Kessler F, Besagni C** (2014) Role of plastoglobules in metabolite repair in the tocopherol redox cycle. *Front Plant Sci* **5**: 298
- Evans HM, Bishop KS** (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**: 650–651
- Evenson RE, Gollin D** (2003) Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science* **300**: 758–762
- Falk J, Munné-Bosch S** (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J Exp Bot* **61**: 1549–1566
- FAO** (2012) FAOSTAT Online Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- FAO** (2016) Food loss and waste accounting and reporting standard. Executive summary. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Farmer EE, Mueller MJ** (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 429–450
- Finkelstein R** (2013) Abscisic acid synthesis and response. *Arab Book* e0166
- Finn CE, Mezzetti B, eds** (2016) Proceedings of the II International Berry Fruit Symposium: Interactions! Local and Global Berry Research and Innovation: Brisbane, Australia, August 17-22, 2014. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven
- Fischer BB, Krieger-Liszkay A, Hideg É, Šnyrychová I, Wiesendanger M, Eggen RIL** (2007) Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **581**: 5555–5560

- Fisk ID, White DA, Carvalho A, Gray DA** (2006) Tocopherol—an intrinsic component of sunflower seed oil bodies. *J Am Oil Chem Soc* **83**: 341–344
- Fitzpatrick TB, Basset GJC, Borel P, Carrari F, DellaPenna D, Fraser PD, Hellmann H, Osorio S, Rothan C, Valpuesta V, et al** (2012) Vitamin deficiencies in humans: can plant science help? *Plant Cell* **24**: 395–414
- Foyer CH, Noctor G** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* **11**: 861–905
- Foyer CH, Noctor G** (2016) Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant Cell Environ* **39**: 951–964
- Foyer CH, Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* **155**: 2–18
- Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutani M, Chen L, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K** (2010) Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem* **285**: 11308–11313
- Fukuzawa K, Ikebata W, Shibata A, Sakanaka T, Urano S** (1993) Location of α -tocopherol in phospholipid vesicles and its dynamics in inhibiting lipid peroxidation. *A M Mino, ed, Vitamin E—its usefulness in health and in curing diseases*. Japan Science Society Press, Tokyo, Japan, pp 31–40
- Galano A, Tan DX, Reiter RJ** (2011) Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* **51**: 1–16
- Gallie DR** (2013) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *J Exp Bot* **64**: 433–443
- Gapper NE, McQuinn RP, Giovannoni JJ** (2013) Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Mol Biol* **82**: 575–591
- Ghassemian M, Lutes J, Chang H-S, Lange I, Chen W, Zhu T, Wang X, Lange BM** (2008) Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **69**: 2899–2911
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P** (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 1117–1126
- Giribaldi M, Gény L, Delrot S, Schubert A** (2010) Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. *J Exp Bot* **61**: 2447–2458

- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA** (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* **26**: 139–145
- Gläßer C, Haberer G, Finkemeier I, Pfannschmidt T, Kleine T, Leister D, Dietz K-J, Häusler RE, Grimm B, Mayer KFX** (2014) Meta-analysis of retrograde signaling in *Arabidopsis thaliana* reveals a core module of genes embedded in complex cellular signaling networks. *Mol Plant* **7**: 1167–1190
- Gómez MD, Vera-Sirera F, Pérez-Amador MA** (2014) Molecular programme of senescence in dry and fleshy fruits. *J Exp Bot* **65**: 4515–4526
- Goodman M, Bostick RM, Kucuk O, Jones DP** (2011) Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future. *Free Radic Biol Med* **51**: 1068–1084
- Green MA, Fry SC** (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**: 83–87
- Greene D, Costa G** (2013) Fruit thinning in pome- and stone-fruit: state of the art. *Acta Hort* **998**: 93–102
- Guo Y, Gan S-S** (2012) Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant Cell Environ* **35**: 644–655
- Hanson AD, Beaudoin GA, McCarty DR, Gregory JF** (2016) Does abiotic stress cause functional B vitamin deficiency? *Plant Physiol* **127**: 2082–2097
- Hardeland R** (2015) Melatonin in plants and other phototrophs: advances and gaps concerning the diversity of functions. *J Exp Bot* **66**: 627–646
- Hardeland R, Madrid JA, Tan D-X, Reiter RJ** (2012) Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res* **52**: 139–166
- Harman D** (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11.3**: 298–300
- Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ** (1995) Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int* **35**: 627–634
- Haughn G, Somerville CR** (1987) Selection for herbicide resistance at the whole-plant level. *Biotechnology in Agricultural Chemistry*. American Chemical Society, Washington, DC, USA, pp 98–107

- Hemavathi, Upadhyaya CP, Young KE, Akula N, Kim H soon, Heung JJ, Oh OM, Aswath CR, Chun SC, Kim DH, et al** (2009) Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Sci* **177**: 659–667
- Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K** (1997) Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* **409**: 105–108
- Hu Y, Chen Z, Zhuang C, Huang J** (2017) Cascade of chromosomal rearrangements caused by a heterogeneous T-DNA integration supports the double-strand break repair model for T-DNA integration. *Plant J.* doi: 10.1111/tbj.13523
- Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y** (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed Sci* **64**: 48–59
- Ivanov AG, Krol M, Maxwell D, Huner NPA** (1995) Abscisic acid induced protection against photoinhibition of PSII correlates with enhanced activity of the xanthophyll cycle. *FEBS Lett* **371**: 61–64
- Jander G, Baerson SR, Hudak JA, Gonzalez KA, Gruys KJ, Last RL** (2003) Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiol* **131**: 139–146
- Jayaraman J, Miret JA, Munné-Bosch S, Dijkwel PP** (2015) Redox and hormone profiling of a *Nicotiana tabacum* dedifferentiated protoplast culture suggests a role for a cytokinin and gibberellin in plant totipotency. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC* **124**: 295–306
- Ji K, Kai W, Zhao B, Sun Y, Yuan B, Dai S, Li Q, Chen P, Wang Y, Pei Y, et al** (2014) *SINCE1* and *SICYP707A2*: key genes involved in ABA metabolism during tomato fruit ripening. *J Exp Bot* **65**: 5243–5255
- Jia H-F, Chai Y-M, Li C-L, Lu D, Luo J-J, Qin L, Shen Y-Y** (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol* **157**: 188–199
- Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C, Ames BN** (2000a) γ -Tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 11494–11499
- Jiang Y, Joyce DC** (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regul* **39**: 171–174

- Jiang Y, Joyce DC, Macnish AJ** (2000b) Effect of abscisic acid on banana fruit ripening in relation to the role of ethylene. *J Plant Growth Regul* **19**: 106–111
- Jibran R, Hunter DA, Dijkwel PP** (2013) Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Mol Biol* **82**: 547–561
- Jin P, Wang SY, Gao H, Chen H, Zheng Y, Wang CY** (2012) Effect of cultural system and essential oil treatment on antioxidant capacity in raspberries. *Food Chem* **132**: 399–405
- Jing H-C, Schippers JHM, Hille J, Dijkwel PP** (2005) Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and old genes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **56**: 2915–2923
- John I, Drake R, Farrell A, Cooper W, Lee P, Horton P, Grierson D** (1995) Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *Plant J* **7**: 483–490
- Jones DP, Sies H** (2015) The redox code. *Antioxid Redox Signal* **23**: 734–746
- Juvany M, Müller M, Munné-Bosch S** (2013) Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? *J Exp Bot* **64**: 3087–3098
- Kader AA** (2005) Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce. *Acta Hort* **682**: 2169–2176
- Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL** (1999) Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J Agric Food Chem* **47**: 4638–4644
- Kamal-Eldin A, Appelqvist L-Å** (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**: 671–701
- Kang K, Kong K, Park S, Natsagdorj U, Kim YS, Back K** (2011) Molecular cloning of a plant *N*-acetylserotonin methyltransferase and its expression characteristics in rice. *J Pineal Res* **50**: 304–309
- Kang K, Lee K, Park S, Byeon Y, Back K** (2013) Molecular cloning of rice serotonin *N*-acetyltransferase, the penultimate gene in plant melatonin biosynthesis. *J Pineal Res* **55**: 7–13
- Kang S, Kang K, Lee K, Back K** (2007) Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta* **227**: 263–272
- Kikuzawa K, Lechowicz MJ** (2011) *Ecology of leaf longevity*. Springer Tokyo, Tokyo, Japan

- Kobayashi N, DellaPenna D** (2008) Tocopherol metabolism, oxidation and recycling under high light stress in *Arabidopsis*. *Plant J* **55**: 607–618
- Kohli A, Sreenivasulu N, Lakshmanan P, Kumar PP** (2013) The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Rep* **32**: 945–957
- Kolář J, Johnson CH, Macháčková I** (2003) Exogenously applied melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) affects flowering of the short-day plant *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plant* **118**: 605–612
- Korasick DA, Enders TA, Strader LC** (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* **64**: 2541–2555
- Kramchote S, Srilaong V, Wongs-Aree C, Kanlayanarat S** (2012) Nutritional quality differences of leaves in a cabbage head. *Acta Hort* **943**: 181–186
- Krüger E, Dietrich H, Schöpplein E, Rasim S, Kürbel P** (2011) Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. *Postharvest Biol Technol* **60**: 31–37
- Kruk J, Schmid GH, Strzalka K** (2000) Interaction of α -tocopherol quinone, α -tocopherol and other prenyllipids with photosystem II. *Plant Physiol Biochem* **38**: 271–277
- Kruk J, Szymańska R, Cela J, Munne-Bosch S** (2014) Plastochromanol-8: fifty years of research. *Phytochemistry* **108**: 9–16
- Kumar R, Khurana A, Sharma AK** (2014) Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *J Exp Bot* **65**: 4561–4575
- Lacampagne S, Gagné S, Gény L** (2010) Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *J Plant Growth Regul* **29**: 81–90
- Lai AG, Doherty CJ, Mueller-Roeber B, Kay SA, Schippers JHM, Dijkwel PP** (2012) *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1* regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 17129–17134
- Lawson RH** (1996) Economic importance and trends in ornamental horticulture. *Acta Hort* **432**: 226–237
- Lee I-M, Cook NR, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE** (2005) Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer. The women's health study: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* **294**: 56–65

- Lee SK, Kader AA** (2000) Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Technol* **20**: 207–220
- Leng P, Yuan B, Guo Y** (2014) The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *J Exp Bot* **65**: 4577–4588
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W** (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* **80**: 2587
- Li C, Tan D-X, Liang D, Chang C, Jia D, Ma F** (2015) Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. *J Exp Bot* **66**: 669–680
- Li H-H, Hao R-L, Wu S-S, Guo P-C, Chen C-J, Pan L-P, Ni H** (2011) Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans. *Biochem Pharmacol* **82**: 701–712
- Li M-J, Ma F-W, Zhang M, Pu F** (2008) Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). *Plant Sci* **174**: 606–612
- Liang C, Zheng G, Li W, Wang Y, Hu B, Wang H, Wu H, Qian Y, Zhu X-G, Tan D-X, et al** (2015) Melatonin delays leaf senescence and enhances salt stress tolerance in rice. *J Pineal Res* **59**: 91–101
- Lim B, Smirnoff N, Cobbett CS, Golz JF** (2016) Ascorbate-deficient *vtc2* mutants in arabidopsis do not exhibit decreased growth. *Front Plant Sci* **7**: 1025
- Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H** (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 115–136
- Linster CL, Clarke SG** (2008) L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Trends Plant Sci* **13**: 567–573
- Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin IAP, Zhao M, Ma J, Yu J, Huang S, et al** (2014) The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nat Commun* **5**: 3930
- Lombardi L, Arrom L, Mariotti L, Battelli R, Picciarelli P, Kille P, Stead T, Munné-Bosch S, Rogers HJ** (2015) Auxin involvement in tepal senescence and abscission in *Lilium*: a tale of two lilies. *J Exp Bot* **66**: 945–956
- López-Carbonell M, Gabasa M, Jáuregui O** (2009) Enhanced determination of abscisic acid (ABA) and abscisic acid glucose ester (ABA-GE) in *Cistus albidus* plants by liquid chromatography–mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiol Biochem* **47**: 256–261

- Lushchak VI, Semchuk NM** (2012) Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta Physiol Plant* **34**: 1607–1628
- Ma X, Ma F, Mi Y, Ma Y, Shu H** (2008) Morphological and physiological responses of two contrasting *Malus* species to exogenous abscisic acid application. *Plant Growth Regul* **56**: 77–87
- Maeda H, DellaPenna D** (2007) Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 260–265
- Maeda H, Song W, Sage T, DellaPenna D** (2014) Role of callose synthases in transfer cell wall development in tocopherol deficient *Arabidopsis* mutants. *Front Plant Sci* **5**: 46
- Manchali S, Chidambara Murthy KN, Patil BS** (2012) Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *J Funct Foods* **4**: 94–106
- Marquardt D, Williams JA, Kučerka N, Atkinson J, Wassall SR, Katsaras J, Harroun TA** (2013) Tocopherol activity correlates with its location in a membrane: a new perspective on the antioxidant vitamin E. *J Am Chem Soc* **135**: 7523–7533
- Matas AJ, Gapper NE, Chung M-Y, Giovannoni JJ, Rose JK** (2009) Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. *Curr Opin Biotechnol* **20**: 197–203
- Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J** (2013) A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* **54**: 1–14
- Mazur SP, Nes A, Wold A-B, Remberg SF, Aaby K** (2014a) Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chem* **160**: 233–240
- Mazur SP, Sønsteby A, Wold A-B, Foito A, Freitag S, Verrall S, Conner S, Stewart D, Heide OM** (2014b) Post-flowering photoperiod has marked effects on fruit chemical composition in red raspberry (*Rubus idaeus*). *Ann Appl Biol* **165**: 454–465
- McAtee P, Karim S, Schaffer RJ, David K** (2013) A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Plant Cell Biol* **4**: 79
- Mehrshahi P, Johnny C, DellaPenna D** (2014) Redefining the metabolic continuity of chloroplasts and ER. *Trends Plant Sci* **19**: 501–507
- Mehrshahi P, Stefano G, Andaloro JM, Brandizzi F, Froehlich JE, DellaPenna D** (2013) Transorganellar complementation redefines the

biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 12126–12131

Mène-Saffrané L, DellaPenna D (2010) Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiol Biochem* **48**: 301–309

Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A (2004) The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol* **4**: 4

Michels AJ, Frei B (2013) Myths, artifacts, and fatal flaws: identifying limitations and opportunities in vitamin C research. *Nutrients* **5**: 5161–5192

Millar AH, Mittova V, Kiddle G, Heazlewood JL, Bartoli CG, Theodoulou FL, Foyer CH (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol* **133**: 443–447

Miret JA, Munné-Bosch S (2015) Redox signaling and stress tolerance in plants: a focus on vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* **13402**: 29–38

Mittler R, Blumwald E (2015) The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell* **27**: 64–70

Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* **16**: 300–309

Mondal K, Sharma NS, Malhotra SP, Dhawan K, Singh R (2004) Antioxidant systems in ripening tomato fruits. *Biol Plant* **48**: 49–53

Mukherjee M, Larrimore KE, Ahmed NJ, Bedick TS, Barghouthi NT, Traw MB, Barth C (2010) Ascorbic acid deficiency in *Arabidopsis* induces constitutive priming that is dependent on hydrogen peroxide, salicylic acid, and the *NPR1* gene. *Mol Plant-Microbe Interact* **23**: 340–351

Mullen W, McGinn J, Lean MEJ, MacLean MR, Gardner P, Duthie GG, Yokota T, Crozier A (2002a) Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J Agric Food Chem* **50**: 5191–5196

Mullen W, Stewart AJ, Lean MEJ, Gardner P, Duthie GG, Crozier A (2002b) Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem* **50**: 5197–5201

Munné-Bosch S (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* **162**: 743–748

- Munné-Bosch S, Alegre L** (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct Plant Biol* **31**: 203–216
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci* **21**: 31–57
- Munné-Bosch S, Queval G, Foyer CH** (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiol* **161**: 5–19
- Murch SJ, Alan AR, Cao J, Saxena PK** (2009) Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *J Pineal Res* **47**: 277–283
- Murch SJ, Saxena PK** (2002) Mammalian neurohormones: potential significance in reproductive physiology of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)? *Naturwissenschaften* **89**: 555–560
- Nagaoka S, Inoue M, Nishioka C, Nishioku Y, Tsunoda S, Ohguchi C, Ohara K, Mukai K, Nagashima U** (2000) Tunneling effect in antioxidant, prooxidant, and regeneration reactions of vitamin E. *J Phys Chem B* **104**: 856–862
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2013) ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep* **32**: 959–970
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165–185
- Nelson CJ** (1988) Genetic associations between photosynthetic characteristics and yield: review of the evidence. *Plant Physiol Biochem* **26**: 543–554
- Neocleous D, Vasilakakis M** (2007) Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. “Autumn Bliss”). *Sci Hortic* **112**: 282–289
- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, et al** (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell* **23**: 2169–2183
- Noctor G** (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* **29**: 409–425
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE** (1963) Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science* **142**: 1592–1593
- Pak C, van Doorn WG** (2005) Delay of *Iris* flower senescence by protease inhibitors. *New Phytol* **165**: 473–480

- Pallauf K, Bendall JK, Scheiermann C, Watschinger K, Hoffmann J, Roeder T, Rimbach G** (2013) Vitamin C and lifespan in model organisms. *Food Chem Toxicol* **58**: 255–263
- Palma JM, Sevilla F, Jiménez A, Río LA del, Corpas FJ, Morales PÁ de, Camejo DM** (2015) Physiology of pepper fruit and the metabolism of antioxidants: chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. *Ann Bot* **116**: 627–636
- Palonen P, Karhu S, Savelainen H, Rantanen M, Junttila O** (2011) Growth and cropping of primocane and biennial raspberry cultivars grown under a film absorbing far-red light. *J Hortic Sci Biotechnol* **86**: 113–119
- Palonen P, Pehkonen E, Rantanen M** (2013) Growth control of “Glen Ample” and “Tulameen” raspberry cultivars with single and repeated ProCa applications. *Eur J Hortic Sci* **78**: 22–29
- Park S, Le T-NN, Byeon Y, Kim YS, Back K** (2013) Transient induction of melatonin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) during the reproductive stage. *J Pineal Res* **55**: 40–45
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, et al** (2009) Abscisic acid inhibits type 2c protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**: 1068–1071
- Park S-Y, Peterson FC, Mosquna A, Yao J, Volkman BF, Cutler SR** (2015) Agrochemical control of plant water use using engineered abscisic acid receptors. *Nature* **520**: 545–548
- Park Y, Xu Z-Y, Kim SY, Lee J, Choi B, Lee J, Kim H, Sim H-J, Hwang I** (2016) Spatial regulation of ABCG25, an ABA exporter, is an important component of the mechanism for controlling the cellular ABA levels. *Plant Cell* **28**: 2528–2544
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH** (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* **15**: 939–951
- Paterson AH, Lan T, Amasino R, Osborn TC, Quiros C** (2001) Brassica genomics: a complement to, and early beneficiary of the *Arabidopsis* sequence. *Genome Biol* **2**: reviews1011.1–1011.4
- Pavet V, Olmos E, Kiddle G, Mowla S, Kumar S, Antoniw J, Alvarez ME, Foyer CH** (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 1291–1303

- Perkins-Veazie P** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Hortic Rev* **17**: 267–297
- Perkins-Veazie P, Nonnecke G** (1992) Physiological changes during ripening of raspberry fruit. *HortScience* **27**: 331–333
- Petrov VD, Van Breusegem F** (2012) Hydrogen peroxide—A central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* **2012**: pls014
- Pfannschmidt T** (2010) Plastidial retrograde signalling—A true “plastid factor” or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci* **15**: 427–435
- Pignocchi C, Kiddle G, Hernández I, Foster SJ, Asensi A, Taybi T, Barnes J, Foyer CH** (2006) Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiol* **141**: 423–435
- Pinheiro C, Chaves MM** (2011) Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J Exp Bot* **62**: 869–882
- Piotrowska A, Bajguz A** (2011) Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**: 2097–2112
- Queval G, Hager J, Gakière B, Noctor G** (2008) Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *J Exp Bot* **59**: 135–146
- Rademacher W** (2015) Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *J Plant Growth Regul* **34**: 845–872
- Raiola A, Tenore G, Barone A, Frusciante L, Rigano M** (2015) Vitamin E content and composition in tomato fruits: beneficial roles and bio-fortification. *Int J Mol Sci* **16**: 29250–29264
- Rao AV, Snyder DM** (2010) Raspberries and human health: a review. *J Agric Food Chem* **58**: 3871–3883
- Rébeillé F, Ravanel S, Marquet A, Mendel RR, Webb ME, Smith AG, Warren MJ** (2007) Roles of vitamins B5, B8, B9, B12 and molybdenum cofactor at cellular and organismal levels. *Nat Prod Rep* **24**: 949–962
- Reddanna P, Krishna Rao M, Channa Reddy C** (1985) Inhibition of 5-lipoxygenase by vitamin E. *FEBS Lett* **193**: 39–43
- Reiter RJ, Tan D-X, Lorena F-B** (2010) Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* **181**: 127–151

- Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Qi W** (2001) Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* **34**: 237–256
- Reiter RJ, Tan D-X, Zhou Z, Cruz MHC, Fuentes-Broto L, Galano A** (2015) Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules* **20**: 7396–7437
- Remberg SF, Sønsteby A, Wold A-B, Heide OM** (2012) Influence of temperature on berry quality of “Glen Ample” red raspberry. *Acta Hortic* **926**: 705–711
- Remberg SF, Sønsteby A, Aaby K, Heide OM** (2010) Influence of postflowering temperature on fruit size and chemical composition of Glen Ample raspberry (*Rubus idaeus* L.). *J Agric Food Chem* **58**: 9120–9128
- Riov J, Dagan E, Goren R, Yang SF** (1990) Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in Citrus leaf and tomato fruit tissues. *Plant Physiol* **92**: 48–53
- Rodionenko GI** (1961) The genus *Iris* L.: questions of morphology, biology evolution and systematics. British Iris Society, London, UK
- Rodrigo M-J, Marcos JF, Alférez F, Mallent MD, Zacarías L** (2003) Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J Exp Bot* **54**: 727–738
- Rogers HJ** (2013) From models to ornamentals: how is flower senescence regulated? *Plant Mol Biol* **82**: 563–574
- Rogers HJ** (2012) Is there an important role for reactive oxygen species and redox regulation during floral senescence? *Plant Cell Environ* **35**: 217–233
- Rogers HJ, Munné-Bosch S** (2016) Production and scavenging of reactive oxygen species and redox signaling during leaf and flower senescence: similar but different. *Plant Physiol* **171**: 1560–1568
- Romero P, Lafuente MT, Rodrigo MJ** (2012) The *Citrus* ABA signalosome: identification and transcriptional regulation during sweet orange fruit ripening and leaf dehydration. *J Exp Bot* **63**: 4931–4945
- Rothwell K, Wain RL** (1964) Studies on a growth inhibitor in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Régulateurs Nat Croissance Végétale* 363–375
- Rubinstein B** (2000) Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol Biol* **44**: 303–318

- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M** (2004) Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol* **134**: 1439–1449
- Sandorf I, Holländer-Czytko H** (2002) Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 173–179
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K, et al** (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**: 653–668
- Sattler SE, Mène-Saffrané L, Farmer EE, Krischke M, Mueller MJ, DellaPenna D** (2006) Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell* **18**: 3706–3720
- Schippers JHM, Jing H-C, Hille J, Dijkwel PP** (2007) Developmental and hormonal control of leaf senescence. *A S Gan*, ed, *Senescence processes in plants*, 2nd edition. Blackwell Publishing, pp 145–170
- Schranz ME, Lysak MA, Mitchell-Olds T** (2006) The ABC's of comparative genomics in the *Brassicaceae*: building blocks of crucifer genomes. *Trends Plant Sci* **11**: 535–542
- Schuelke M, Elsner A, Finckh B, Kohlschütter A, Hübner C, Brigelius-Flohé R** (2000) Urinary α -tocopherol metabolites in α -tocopherol transfer protein-deficient patients. *J Lipid Res* **41**: 1543–1551
- Setha S** (2012) Roles of abscisic acid in fruit ripening. *Walailak J Sci Technol WJST* **9**: 297–308
- Seung D, Risopatron J, Jones B, Marc J** (2012) Circadian clock-dependent gating in ABA signalling networks. *Protoplasma* **249**: 445–457
- Sevilla F, Camejo D, Ortiz-Espín A, Calderón A, Lázaro JJ, Jiménez A** (2015) The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *J Exp Bot* **66**: 2945–2955
- Seymour GB, Chapman NH, Chew BL, Rose JKC** (2013a) Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnol J* **11**: 269–278

- Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C** (2013b) Fruit development and ripening. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 219–241
- Sharp RE** (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ* **25**: 211–222
- Sheppard AJ, Pennington JAT, Weihrauch JL** (1993) Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. *A L Packer, ed, Vitamin E in health and disease: biochemistry and clinical applications*. Macerl Dekker Inc., New York, USA, pp 9–31
- Shida CS, Castrucci AML, Lamy-Freund MT** (1994) High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res* **16**: 198–201
- Singh J, Upadhyay AK, Bahadur A, Singh B, Singh KP, Rai M** (2006) Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Sci Hortic* **108**: 233–237
- Singh RK, Ali SA, Nath P, Sane VA** (2011) Activation of ethylene-responsive *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase leads to increased tocopherol levels during ripening in mango. *J Exp Bot* **62**: 3375–3385
- Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z** (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol* **54**: 39–50
- Smirnoff N, Wheeler GL** (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **35**: 291–314
- Spollen WG, LeNoble ME, Samuels TD, Bernstein N, Sharp RE** (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol* **122**: 967–976
- Srivastava A, Handa A** (2005) Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *J Plant Growth Regul* **24**: 67–82
- Stead AD, van Doorn WG** (1994) Strategies of flower senescence—A review. *A RJ Scott, AD Stead, eds, Molecular and cellular aspects of plant reproduction*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 215–238
- Stocker R** (2007) Vitamin E. *Diet Suppl Health Novartis Found Symp* **282**: 77–92
- Stocker R, Keaney JF** (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* **84**: 1381–1478

- Sun B, Yan H, Zhang F, Wang Q** (2012) Effects of plant hormones on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese kale. *Food Res Int* **48**: 359–366
- Sun S, Fan W, Mu Z** (2016) The spatio-temporal specificity of PYR1/PYL/RCAR ABA receptors in response to developmental and environmental cues. *Plant Signal Behav.* doi: 10.1080/15592324.2016.1214793
- Symons GM, Chua Y-J, Ross JJ, Quittenden LJ, Davies NW, Reid JB** (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J Exp Bot* **63**: 4741–4750
- Tan D-X, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ** (1993) Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* **1**: 57–60
- Taylor IB, Burbidge A, Thompson AJ** (2000) Control of abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* **51**: 1563–1574
- Thomas H, Howarth CJ** (2000) Five ways to stay green. *J Exp Bot* **51**: 329–337
- Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C, Stead AD** (2003) Defining senescence and death. *J Exp Bot* **54**: 1127–1132
- Thompson JF, Mitchell FG, Kasmire RF** (2002) Cooling horticultural commodities. *A AA Kader*, ed, *Postharvest technology for horticultural crops*, 3rd edition. UCANR Publications, Davis, USA, pp 97–112
- Thongsavath C, Varit S, Thananya W, Sirichai K, Antonio A** (2012) Cabbage supply chain mapping and postharvest loss in the domestic and export trade in Lao PDR. *Int Food Res J* **19**: 1615–1620
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S** (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**: 671–677
- Toivonen PMA** (2004) Postharvest storage procedures and oxidative stress. *HortScience* **39**: 938–942
- Toivonen PMA** (1997) The effects of storage temperature, storage duration, hydro-cooling, and micro-perforated wrap on shelf life of broccoli (*Brassica oleracea* L., Italica Group). *Postharvest Biol Technol* **10**: 59–65
- Toivonen PMA, Hodges DM** (2011) Abiotic stress in harvested fruits and vegetables. *A A Shanker*, ed, *Abiotic stress in plants—Mechanisms and adaptations*. InTech, Rijeka, Croatia, pp 39–58
- Tossi V, Cassia R, Bruzzone S, Zocchi E, Lamattina L** (2012) ABA says NO to UV-B: a universal response? *Trends Plant Sci* **17**: 510–517

- Town CD, Cheung F, Maiti R, Crabtree J, Haas BJ, Wortman JR, Hine EE, Althoff R, Arbogast TS, Tallon LJ, et al** (2006) Comparative genomics of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* reveal gene loss, fragmentation, and dispersal after polyploidy. *Plant Cell* **18**: 1348–1359
- Traber MG** (2013) Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J Lipid Res* **54**: 2295–2306
- Traber MG, Atkinson J** (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* **43**: 4–15
- Tripathi SK, Tuteja N** (2007) Integrated signaling in flower senescence: an overview. *Plant Signal Behav* **2**: 437–445
- Tsuzuki T, Takahashi K, Inoue S, Okigaki Y, Tomiyama M, Hossain M, Shimazaki K, Murata Y, Kinoshita T** (2011) Mg-chelatase H subunit affects ABA signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* **124**: 527–538
- Unamba CIN, Nag A, Sharma RK** (2015) Next generation sequencing technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants. *Front Plant Sci* **6**: 1074
- Valentin HE, Lincoln K, Moshiri F, Jensen PK, Qi Q, Venkatesh TV, Karunanandaa B, Baszis SR, Norris SR, Savidge B, et al** (2006) The *Arabidopsis vitamin E pathway gene5-1* mutant reveals a critical role for phytyl kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell* **18**: 212–224
- Van de Poel B, Van Der Straeten D** (2014) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front Plant Sci* **5**: 640
- Wagstaff C, Chanasut U, Harren FJM, Laarhoven L-J, Thomas B, Rogers HJ, Stead AD** (2005) Ethylene and flower longevity in *Alstroemeria*: relationship between tepal senescence, abscission and ethylene biosynthesis. *J Exp Bot* **56**: 1007–1016
- Wagstaff C, Malcolm P, Rafiq A, Leverentz M, Griffiths G, Thomas B, Stead A, Rogers H** (2003) Programmed cell death (PCD) processes begin extremely early in *Alstroemeria* petal senescence. *New Phytol* **160**: 49–59
- Wagstaff C, Yang TJW, Stead AD, Buchanan-Wollaston V, Roberts JA** (2009) A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *Plant J* **57**: 690–705
- Wang P, Sun X, Chang C, Feng F, Liang D, Cheng L, Ma F** (2013a) Delay in leaf senescence of *Malus hupehensis* by long-term melatonin application is

- associated with its regulation of metabolic status and protein degradation. *J Pineal Res* **55**: 424–434
- Wang P, Sun X, Li C, Wei Z, Liang D, Ma F** (2013b) Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. *J Pineal Res* **54**: 292–302
- Wang P, Sun X, Wang N, Tan D-X, Ma F** (2015) Melatonin enhances the occurrence of autophagy induced by oxidative stress in *Arabidopsis* seedlings. *J Pineal Res* **58**: 479–489
- Wang P, Sun X, Xie Y, Li M, Chen W, Zhang S, Liang D, Ma F** (2014) Melatonin regulates proteomic changes during leaf senescence in *Malus hupehensis*. *J Pineal Res* **57**: 291–307
- Wang P, Yin L, Liang D, Li C, Ma F, Yue Z** (2012) Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. *J Pineal Res* **53**: 11–20
- Wang SY, Chen C-T, Wang CY** (2009) The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chem* **112**: 676–684
- Wang SY, Zheng W** (2005) Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. *Int J Food Sci Technol* **40**: 187–195
- Wang X-F, Zhang D-P** (2014) ABA signal perception and ABA receptors. Abscisic acid: metabolism, transport and signaling. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 89–116
- Wang Y, Frei M** (2011) Stressed food—The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agric Ecosyst Environ* **141**: 271–286
- Wang Y, Li L, Ye T, Zhao S, Liu Z, Feng Y-Q, Wu Y** (2011) Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of *Arabidopsis* by downregulating ABI5 expression. *Plant J* **68**: 249–261
- Weeda S, Zhang N, Zhao X, Ndip G, Guo Y, Buck GA, Fu C, Ren S** (2014) *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS ONE* **9**: e93462
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365–369
- White DA, Fisk ID, Gray DA** (2006) Characterisation of oat (*Avena sativa* L.) oil bodies and intrinsically associated E-vitamins. *J Cereal Sci* **43**: 244–249

- Wingler A, Roitsch T** (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biol* **10**: 50–62
- Woltering EJ, van Doorn WG** (2009) Petal senescence: new concepts for ageing cells. *Acta Hort* ISHS **847**: 161–170
- Woltering EJ, van Doorn WG** (1988) Role of ethylene in senescence of petals—Morphological and taxonomical relationships. *J Exp Bot* **39**: 1605–1616
- Xi Y, Cheng D, Zeng X, Cao J, Jiang W** (2016) Evidences for chlorogenic acid—A major endogenous polyphenol involved in regulation of ripening and senescence of apple fruit. *PloS One* **11**: e0146940
- Xia X-J, Zhou Y-H, Shi K, Zhou J, Foyer CH, Yu J-Q** (2015) Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J Exp Bot* **66**: 2839–2856
- Yang W, Cahoon RE, Hunter SC, Zhang C, Han J, Borgschulte T, Cahoon EB** (2011) Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase. *Plant J* **65**: 206–217
- Yang W, Zhang W, Wang X** (2017) Post-translational control of ABA signalling: the roles of protein phosphorylation and ubiquitination. *Plant Biotechnol J* **15**: 4–14
- Ye Y, Zhou L, Liu X, Liu H, Li D, Cao M, Chen H, Xu L, Zhu J-K, Zhao Y** (2017) A novel chemical inhibitor of ABA signaling targets all ABA receptors. *Plant Physiol* **173**: 2356–2369
- Ye Z, Song H** (2008) Antioxidant vitamins intake and the risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **15**: 26–34
- Yu F, Wu Y, Xie Q** (2016) Ubiquitin–proteasome system in ABA signaling: from perception to action. *Mol Plant* **9**: 21–33
- Zaharia LI, Walker-Simmon MK, Rodríguez CN, Abrams SR** (2005) Chemistry of abscisic acid, abscisic acid catabolites and analogs. *J Plant Growth Regul* **24**: 274–284
- Zhang C, Zhang W, Ren G, Li D, Cahoon RE, Chen M, Zhou Y, Yu B, Cahoon EB** (2015a) Chlorophyll synthase under epigenetic surveillance is critical for vitamin E synthesis, and altered expression affects tocopherol levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **168**: 1503–1511
- Zhang H, Zhu H, Pan Y, Yu Y, Luan S, Li L** (2014) A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **7**: 1522–1532

- Zhang J, Li H, Xu B, Li J, Huang B** (2016) Exogenous melatonin suppresses dark-induced leaf senescence by activating the superoxide dismutase-catalase antioxidant pathway and down-regulating chlorophyll degradation in excised leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Front Plant Sci* **7**: 1500
- Zhang M, Yuan B, Leng P** (2009) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *J Exp Bot* **60**: 1579–1588
- Zhang N, Sun Q, Zhang H, Cao Y, Weeda S, Ren S, Guo Y-D** (2015b) Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *J Exp Bot* **66**: 647–656
- Zhang X, Chen Y, Lin X, Hong X, Zhu Y, Li W, He W, An F, Guo H** (2013) Adenine Phosphoribosyl Transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **6**: 1661–1672
- Zhang Y, Stefano RD, Robine M, Butelli E, Bulling K, Hill L, Rejzek M, Martin C, Schoonbeek H** (2015c) Different reactive oxygen species scavenging properties of flavonoids determine their abilities to extend the shelf life of tomato. *Plant Physiol* **169**: 1568–1583
- Zhao Y, Chan Z, Gao J, Xing L, Cao M, Yu C, Hu Y, You J, Shi H, Zhu Y, et al** (2016) ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 1949–1954
- Zimmermann P, Zentgraf U** (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell Mol Biol Lett* **10**: 515–534



APÈNDIX 1

REGULACIÓ DE LA SENESCÈNCIA FLORAL DE *LILIUM* PER MELATONINA

APÈNDIX 1. REGULACIÓ DE LA SENESCÈNCIA FLORAL DE *LILIUM* PER MELATONINA

1. Introducció

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina, MT) és una molècula amb funcions reguladores conservades en els diferents regnes de la vida que presenta nombroses funcions de regulació fisiològica i cel·lular (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015; Hardeland, 2015). Prové del metabolisme dels amino àcids aromàtics i té al triptòfan com a precursor, com la família de fitohormones de les auxines (Korasick et al., 2013). A més, la melatonina ha estat caracteritzada *in vivo* com un potent antioxidant d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i espècies reactives de nitrogen (RNS) (Tan et al., 1993; Reiter et al., 2001; Galano et al., 2011). En plantes, la literatura suggereix la seva implicació principalment en la percepció i/o resposta a estressos abiòtics, com a promotor del desenvolupament i la regulació de ritmes circadians; però també en resposta a estressos biòtics, desenvolupament de fruits i senescència foliar (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015; Hardeland, 2015; Reiter et al., 2015; Zhang et al., 2015). Encara que en els darrers anys diferents estudis suggereixen la seva participació en processos de senescència associats a estressos, la seva possible implicació en la senescència floral no ha estat descrita (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015; Hardeland, 2015; Reiter et al., 2015). En processos de senescència foliar, els tractaments amb diferents concentracions de MT alteren les vies de senyalització de diferents hormones (auxines, àcid abscísic, àcid salicílic, etilè i jasmonats (Weeda et al., 2014) i l'activació de diferents sistemes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics (Wang et al., 2012; Liang et al., 2015), tenint com a resultat un retard dels símptomes visibles i els marcadors moleculars de senescència foliar.

Encara que els tèpals comparteixin el seu origen evolutiu amb el model de senescència d'òrgans més estudiat—la fulla—la seva diferent funció comporta importants diferències fisiològiques. Mentre les fulles són autòtrofes—i en conseqüència els cloroplasts són els principals generadors de ROS—, els pètals (o

tèpals) són majoritàriament no fotosintètics, i per tant heteròtrofs. Mentre des de la seva maduresa les fulles són sempre una font de nutrients per remobilitzar, els pètals canvien d'embornal a font de remobilització de nutrients (Rogers, 2013). Tot i això, durant el desenvolupament de la flor les gemmes florals de *Lilium* són verdes i fotosintètiques, i és amb la maduresa i obertura de la flor que es decoloren completament. La contribució d'aquesta activitat fotosintètica a la fisiologia de la flor i el desenvolupament dels trets comercials no està resolta (Thomas et al., 2003).

El patró de senescència i la longevitat són específics de cada òrgan floral i estan estrictament lligats a la seva funció biològica. En el cas dels pètals/tèpals la seva senescència i abscisió estan estrictament lligades al desenvolupament dels òrgans florals i la pol·linització (Stead & van Doorn, 1994; van Doorn & Woltering, 2008). A més, s'ha que considerar que encara que la turgència i l'aspecte extern es mantenen molt temps després de l'inici de la mort cel·lular programada, bona part de les seves cèl·lules ja han completat la senescència i entrat en mort cel·lular programada tot i mantenir un bon aspecte extern (van Doorn & Woltering, 2008).

A la majoria de flors, la senescència floral és desencadenada per l'increment de la producció d'etilè, associat a un augment de la sensibilitat a aquest (van Doorn & Woltering, 2008). En canvi, moltes monocotiledònies—inclouent algunes de gran interès comercial: *Lilium spp*, *Iris spp*, *Narcissus spp*, *Tulipa spp*—són insensibles a l'etilè (van Doorn, 2001; Rogers, 2013). En aquestes últimes, els factors hormonals involucrats en l'inici de la senescència i la regulació de la seva progressió encara no han estat resolts. Tot i així, en el cas de *Lilium*, una recent revisió (van Doorn & Han, 2011) acumula evidències dels factors que afecten a la qualitat post-collita, destacant el paper rellevant de la regulació hormonal i redox en la qualitat i longevitat de la flor. Tractaments amb gibberel·lines i citocinines es troben associats a una major duració de la flor tallada (van Doorn & Han, 2011), complementant les diferències amb els nivells naturals a la flor sense tallar (Arrom

& Munné-Bosch, 2012). Durant el transcurs de la senescència d'aquesta flor insensible a l'etilè hi ha un augment en els nivells d'ABA (Arrom & Munné-Bosch, 2012). El tractament de vares florals de *Lilium* amb ABA i/o pirabactina no presenta efectes sobre la longevitat floral, només al ser combinat amb l'inhibidor de la senescència Promalin es presentava una reducció de la longevitat (Arrom & Munné-Bosch, 2012). En altres espècies, l'ABA pot presentar efectes contradictoris (Rogers, 2013). Recents publicacions identifiquen llacunes en la comprensió d'aquests reguladors de la senescència, senyalant com l'acumulació d'observacions empíriques va acompanyada d'una falta d'explicació dels mecanismes subjacents per la manca de bons models d'estudi (van Doorn & Han, 2011; Rogers, 2013; Rogers & Munné-Bosch, 2016).

A quasi totes les espècies estudiades amb la progressió de la senescència hi ha canvis en les concentracions de ROS i en els nivells de mecanismes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics (Rogers, 2013). El paper de les ROS en la regulació de la senescència floral és discutit. En altres teixits, un balanç redox més oxidat actua com un senyal d'inducció de respostes de defensa a estressos abiòtics i biòtics (Bartoli et al., 2013; Braun et al., 2013; Munné-Bosch et al., 2013), però també de regulació de la senescència foliar (Zimmermann & Zentgraf, 2005). A la senescència floral s'identifiquen 2 pics en els nivells de ROS: un primer associat a l'obertura de la flor i un segon associat als signes de senescència. Aquests són acompanyats per una disminució dels mecanismes antioxidants (Rogers, 2012). Els hidroperòxids generats enzimàticament o no enzimàticament també podrien tenir un paper en els darrers estadis de senescència (Rogers, 2012). El paper d'aquests canvis com a senyal és discutit pel seu patró temporal respecte als canvis fisiològics observats durant la senescència i la mort cel·lular programada associada a aquesta. Rogers (2012) senyala el canvi de l'estat d'oxidació de l'ascorbat (vitamina C) com a candidat a senyal primària reguladora de la senescència.

L'augment dels nivells de melatonina en planta sencera—mitjançant aplicacions exògenes o sobreexpressió de gens involucrats en la seva síntesi—

normalment retarda la floració tant en plantes de dia curt com de dia llarg, afectant la regulació de la inducció fotoperiòdica de la floració (Kolář et al., 2003; Byeon et al., 2014). Un cop formada la gemma floral, existeix evidència de què una certa acumulació de MT és regulada transcripcionalment durant el desenvolupament de la flor en panícules senceres d'arròs (Park et al., 2013). Així, ha estat descrita una acumulació de MT i dels seus precursors a la panícula sencera degut a canvis en l'expressió de gens involucrats en la síntesi de MT entre tres estadis: una setmana abans de la floració, durant la floració i una setmana després d'aquesta. En canvi, flors senceres de *Datura metel* presenten una ràpida disminució del contingut de MT i serotonina durant el seu desenvolupament (Murch et al., 2009). Al considerar la flor sencera i presentar uns pètals que representen una part molt reduïda de la massa total de la flor, canvis importants del contingut de MT en altres òrgans florals poden ser determinants pels nivells de MT en flors senceres recollits per la literatura. Per exemple, s'han observat canvis dinàmics dels nivells de MT a l'ovari durant diferents fases de la microesporogènesi a *Hypericum perforatum* (Murch & Saxena, 2002). La literatura que relaciona MT i el desenvolupament de flors és limitada, i en cap cas analitza el seu possible paper a la senescència floral a la planta o post-collita. Més enllà dels canvis que tenen lloc durant la microesporogènesi als ovaris, les diferents funcions que pot assumir la MT als diversos òrgans florals durant el desenvolupament i senescència floral són desconegudes.

Amb aquest l'objectiu d'estudiar el paper de la melatonina en la regulació de la senescència floral post-collita, es va comparar la regulació de la senescència floral en dos cultivars de la mateixa espècie amb diferents—encara que comparables— patrons de senescència de tèpals: *Lilium longiflorum* cv. 'White Heaven', on els tèpals s'escindeixen després de deshidratar-se; i *Lilium* L.A. cv. 'Courier' (híbrid de *L. longiflorum* × Asiàtic), en la que aquests s'escindeixen turgents i amb limitats signes visuals de senescència. Aquestes diferències permetrien evidenciar com diferents patrons de senescència presenten diferents respostes a nivell hormonal, redox i transcripcional en resposta a la MT. Revelant possibles

mecanismes moleculars subjacents sense necessitat de generar mutants i/o transgènics que presentessin guany o pèrdua de funció.

La caracterització del paper de la melatonina en la regulació de la senescència floral post-collita de *Lilium* per mitjà de la regulació hormonal. Aquest estudi es portà a terme en col·laboració amb la Dra. Hilary J Rogers durant una estada de 6 mesos a la School of BioSciences de la Cardiff University (Regne Unit). També s'estudià la regulació transcripcional del metabolisme de la melatonina i la possible aplicació biotecnològica de la melatonina en la millora de la longevitat i característiques comercials de la flor tallada.

2. Objectius

Els objectius d'aquest estudi són:

- L'estudi del paper de la melatonina en la regulació de la senescència floral post-collita de *Lilium* per mitjà de la regulació hormonal i redox. Ús de dues varietats filogenèticament properes que presenten diferents patrons de senescència.
- Analitzar la regulació transcripcional del metabolisme de la melatonina durant la senescència floral post-collita.
- Explorar el doble paper regulador i antioxidant de la melatonina
- Analitzar el paper d'aplicacions exògenes de melatonina en la millora del valor comercial de la post-collita de flors insensibles a l'etilè

3. Material i mètodes

3.1. Material vegetal i tractaments

Tres bulbs del calibre 18 (Deleeuw Flowerbulb Group b.v., Holanda) es varen plantar en testos de 6L en hivernacle (LA Courier sembrat a novembre del 2015, *L. longiflorum* 'White heaven' a desembre del 2015). Al gener van ser introduïts a un hivernacle calefactat amb llum suplementària i condicions de temperatura i humitat semicontrolades. 3-5 setmanes després les gemmes florals assoliren l'estadi Closed

Bud (CB, gemmes madures, inflades, decolorades i amb els òrgans reproductius madurs; veure Fig. 1). En aquest estadi, les flors van ser tallades (flors individuals amb un peduncle de 12-15 cm) i transferides immediatament a la cambra de creixement (16:8 llum:fosc, 20-22°C, 40-60% humitat relativa, 50-60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) on eren transferides a petites ampolles de vidre contenint 0, 5, 50 o 500 μM MT 0.5% (v/v) etanol. Estocs frescos de MT concentrada en etanol eren generats cada setmana i mantinguts a -20°C. La solució del vas era renovada cada 2 dies i estava protegida dels raigs ultraviolats pel vidre, limitant la degradació per la llum. Es monitoritzaren els canvis en la concentració de MT a la solució del vas per espectrofotometria UV (màxims a 230 i 280 nm) i fluorimetria (Ex: 280 nm, Em: 340 nm), sense presentar canvis significatius en els 2 primers dies sota les condicions de les cambres de cultiu.

En un primer experiment, es va avaluar l'efecte d'un rang de concentracions de melatonina (0, 5, 50, 500 μM MT) a la solució del vas de la flor tallada, des del tall de les gemmes florals madures de la planta (estadi CB) fins a l'abscisió. Diàriament s'avaluà la progressió pels diferents estadis de senescència i el pes fresc de la flor. En un segon experiment, es compararen l'efecte d'un tractament control (tractament 0) amb diferents pautes de tractament a la solució de manteniment amb 500 μM MT: aplicant la melatonina des de CB fins a l'abscisió (_CB), exposant les flors a un pols de només 24h a l'estadi CB (24h), aplicant la melatonina només des de l'obertura completa de la flor (FB) fins a l'abscisió (_FB).

Diàriament s'enregistrà el pes de la flor sencera per avaluar la pèrdua de turgència i l'estadi en el qual es trobava cada flor. Aquests estadis han estat definits prèviament en les dues varietats estudiades, proporcionant una sèrie de senescència comparable entre les dues varietats, tot i les diferències en la duració i la progressió de la senescència (Lombardi et al., 2015). D'aquesta manera, es van definir: Closed Bud (CB), gemmes florals madures amb els òrgans reproductius completament desenvolupats i madurs i la gemma presentant un aspecte exterior

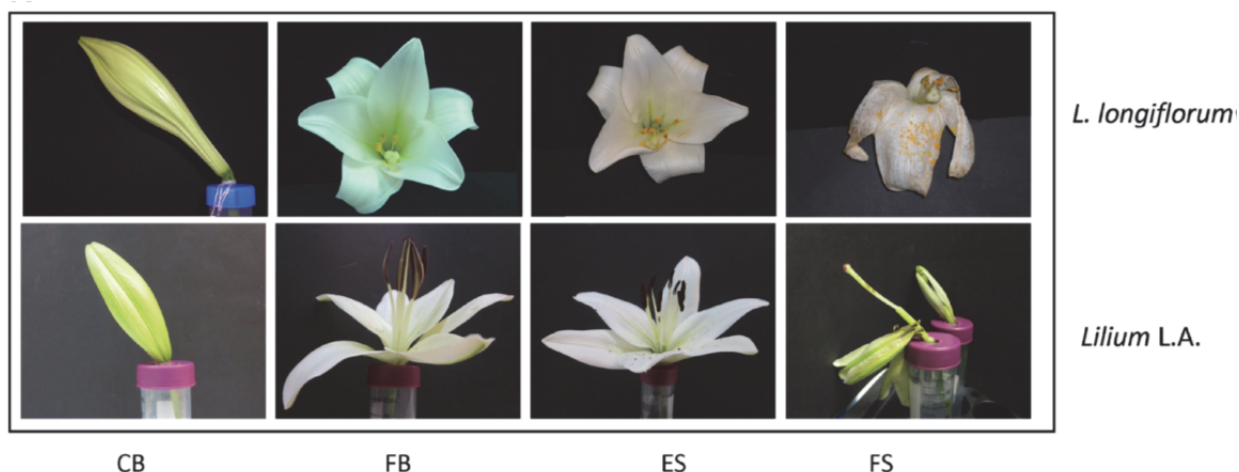


Fig. 1 Imatge composta amb la successió d'estadis de senescència de *Lilium* LA Courier i *L. longiflorum* cv. 'White heaven' (veure text per la seva descripció; extret de Lombardi et al., 2015). CB, Closed bud; FB, Full bloom; ES, Early Senescence; FS, Full Senescence.

decolorat i completament inflat; Full Bloom (FB), obertura completa de la flor; Anthesis (Ant), anthesis, dehiscència del pol·len; Early Senescence (ES), *primers* signes de senescència, lleuger cargolament del marge, pèrdua de turgència i lleugera transparència dels tèpals externs; Late Senescence (LS), els signes observats a ES es troben estesos, amb una pèrdua de turgència generalitzada i un lleuger augment de la translucidesa dels tèpals; i Abscission (Abs), abscisió completa dels tèpals externs (Fig. 1).

Per les anàlisis bioquímiques i moleculars, el conjunt de 3 tèpals externs d'una flor constituïen una mostra biològica. 5 rèpliques de cada estadi i tractament (0 i 500 μ M MT) van ser immediatament congelades en nitrogen líquid i conservades a -80°C . La melatonina s'adquirí de Sigma-Aldrich (Gillingham, UK) amb la major puresa disponible (>98%). A menys que s'expliciti, tots els reactius químics van ser adquirits a Sigma-Aldrich (UK) i eren de grau HPLC o superior.

3.2. Extracció de RNA i quantificació de l'expressió gènica

S'extragué i purificà RNA total amb el reactiu TRI Reagent (Sigma-Aldrich) seguint el protocol del fabricant, amb modificacions. S'afegí 20 μ l 0.5 M CaCl_2 per precipitar pectines (Dal Cin et al., 2005), una tercera separació de fases amb cloroform i un tercer rentat amb etanol 75%. La qualitat del RNA obtingut es

valorà espectofotomètricament (relació 260/280nm i 260/230 nm) i per electroforesi en gel. Les mostres de prou qualitat s'incubaren amb DNasa RQ1 (Promega; Southampton, UK) i se sintetitzà cDNA amb M-MLV RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Promega) seguint les instruccions del fabricant. Després de comprovar l'especificitat i eficiència dels *primers* (Taula 1) dissenyats per PUV, SNAT (serotonina *N*-acetiltransferasa), COMT (àcid cafèic *O*-metiltransferasa) i M2H (melatonina 2-hidroxilasa) a partir de regions conservades a les seqüències del transcriptoma de *Lilium longiflorum* (Lombardi et al., 2015), es quantificà l'expressió gènica d'aquests emprant el mètode de la quantificació relativa (Schmittgen & Livak, 2008) fent servir com a referència els *primers* PUV dissenyats a partir de regions de RNA ribosomal conservades (Dempster et al., 1999) i el fluorocrom SyGreen (2x qPCRBIO SyGreen Lo-ROX, PCRBiosystems; Londres, UK). Es van emprar les següents condicions al termociclador MxPro-Mx3000P (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA): 5 minuts 95°C; 40 cicles: 95°C 30 segons, 55°C 30 segons, 72°C 30 segons; 1,5 minuts 60°C; corba de dissociació.

Taula 1 *Primers* emprats en aquest estudi

Oligonucleòtid	Seqüència
SNAT_F	ACTAATTGGGATGGCTCGGG
SNAT_R	GAAGTAACATGAGCAGTTGCC
COMT_F	TGTTGAAACTGCTCATCTGATTG
COMT_R	AACCTCTTGTCGGTTTCGCT
M2H_F	TTCAACAAGGGAGTGGACTTT
M2H_R	GCGACATGCTGAAGGTTTGG
PUV1	ATTCCAGCTCCAATAGCG
PUV2	CCATGCTAATGTATGCAGAG

3.3. Anàlisi estadística

Anàlisi de la variància ANOVA va ser emprat per determinar diferències estadístiques entre tractaments, estadis i/o varietats (si era el cas), amb el posthoc Tukey-*b*. Les diferències es van considerar significatives amb un nivell de

probabilitat de $P \leq 0.05$. Totes les anàlisis es van portar a terme amb el programari SPSS (Release Version 20; IBM, USA).

4. Resultats

4.1. Efecte de diferents concentracions de melatonina (Experiment I)

El tractament amb diferents concentracions de melatonina a solució del vas des del tall de la flor fins a la seva abscisió tingué efectes sobre la duració i la successió d'estadis del desenvolupament de la flor.

A L.A. Courier, el tractament amb diferents concentracions de melatonina (5, 50, 500 μM MT des de CB fins a l'abscisió) afecta el nombre de dies transcorreguts entre els estadis observats. Hi ha un augment significatiu del nombre de dies transcorreguts entre l'obertura de la flor i l'abscisió (FB i l'abscisió), però només en les flors tractades amb 500 μM MT, de 5.3 a 6.1 dies (+15%; Fig 2). No s'observaren efectes en el %FW (percentatge de pes fresc) de la flor sencera en el dia en que entra en cada estadi, ni relatiu al pes fresc màxim que presentà cada flor, ni relatiu al pes fresc que presentava la mateixa gemma al principi de l'experiment.

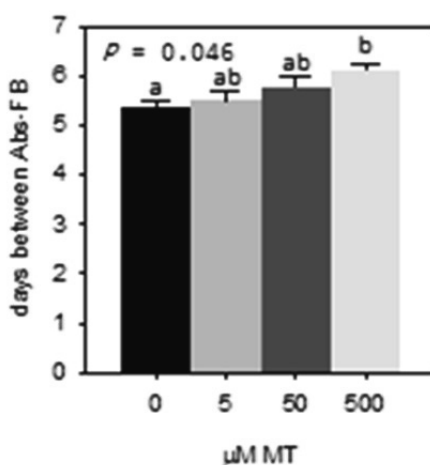


Fig. 2 Dies transcorreguts entre l'obertura completa de la flor (FB) i l'abscisió en flors de *Lilium* L.A. Courier tractades amb diferents concentracions de melatonina (MT). $\bar{x} \pm \text{SE}$, $n = 12$. ANOVA, Tukey-*b* posthoc.

En canvi, l'abscisió es retardà significativament a *L. longiflorum*, amb diferències entre el tractament amb 0, 50 i 500 μM . Mentre transcorreran 9.4 dies fins a l'abscisió en el tractament control (0 μM), van ser 10.8 dies amb 50 μM i 12.4 dies en flores exposades a 500 μM MT (Fig. 3). Aquestes diferències en longevitat són acumulades a través dels estadis, amb diferències significatives des de ES. Entre FB i LS—que pot ser considerada la longevitat comercial de la flor d'ençà que s'obre fins a la que la senescència es troba visualment estesa—transcorrien 5.3 dies en el control, 5.9 dies a 50 μM i 6.1 dies a 500 μM ; mentre en els estadis finals de la senescència entre LS i l'abscisió transcorrien 1.4 dies al control, fins a 2.2 dies a 50 μM i 3.8 dies a 500 μM (Fig. 3). A més, el tractament amb MT allarga el període transcuregut entre FB i l'abscisió, i entre ES i l'abscisió (Fig. 3). Comparant únicament el tractament control amb flores tractades amb 500

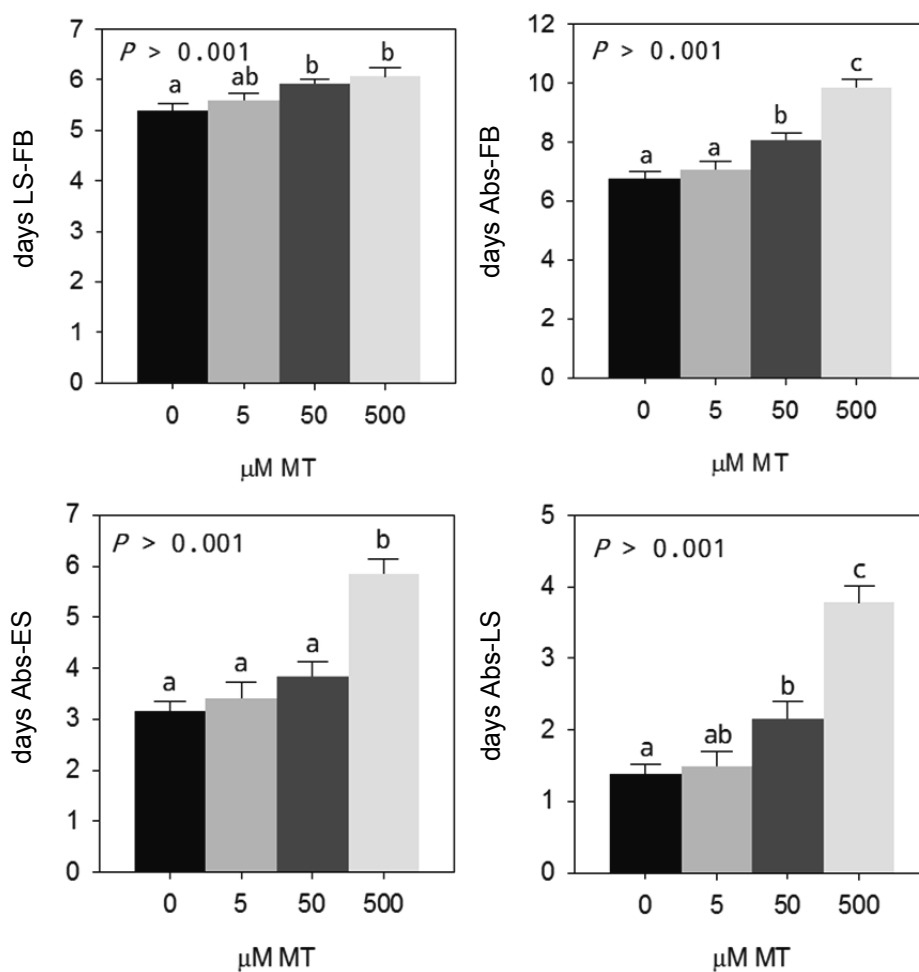


Fig. 3 Dies transcorreguts entre diferents estadis: l'obertura completa de la flor (FB, Full Bloom), primers signes de senescència (ES, Early Senescence), senescència avançada (LS, Late Senescence) i l'abscisió (Abs) en flores de *Lilium longiflorum* cv 'White heaven' tractades amb diferents concentracions de melatonina (MT). $\bar{x} \pm \text{SE}$, n = 12. ANOVA, Tukey-b posthoc.

μM MT: (i) d'ençà que són tallades fins que la flor s'obre (FB) no hi ha efectes apreciables (2.6 contra 2.7 dies), (ii) hi ha un increment de +0.8 dies entre que la flor s'obre (FB) i aquesta presenta signes visuals estesos (Late Senescense) (+15%); (iii) i +2.4 dies entre LS i l'abscisió (l'abscisió) (+171%). A més, el pes de la flor sencera a l'arribar a la abscisió (normalitzat pel pes fresc al principi de l'experiment) disminuï en les flors tractades amb 500 μM MT (-20%, Fig. 4).

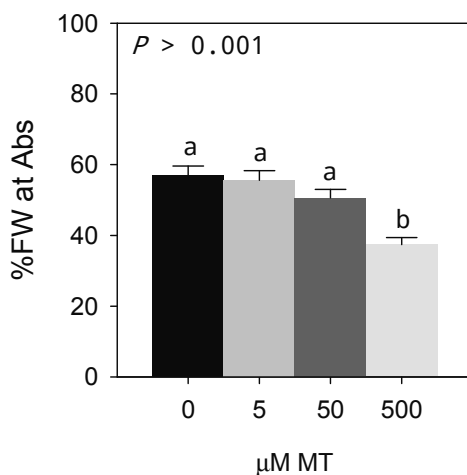


Fig. 4 Percentatge de pes fresc en el moment de l'abscisió, relatiu al pes fresc de la gemma floral sencera al principi de l'experiment en flors de *Lilium longiflorum* cv 'White heaven' tractades amb diferents concentracions de melatonina (MT). $\bar{x} \pm \text{SE}$, $n = 12$. ANOVA, Tukey-*b* posthoc.

Aquestes diferències de pes fresc i duració dels estadis durant el transcurs de la senescència es veuen reflectits en canvis visuals en la turgència i l'aspecte de la flor sencera, però especialment la progressiva translucidesa i cargolament dels extrems del tèpal, però també en l'aspecte de la zona basal. Aquests canvis de turgència i en el temps d'abscisió es veuen especialment reflectits en l'aspecte de la zona d'abscisió (Fig. 5 i 6).

Efecte de diferents patrons de tractament (Experiment II)

Es comparà els efectes d'un tractament control ("0") i d'una sèrie de patrons d'aplicació de 500 μM MT: durant tot l'experiment (des de CB fins a l'abscisió; _CB), un puls de 500 μM MT durant les primeres 24h per a seguir fins a l'abscisió en la solució control (_24h), i mantenint la flor tallada en solució control fins al FB, per exposar la flor a 500 μM MT fins a l'abscisió. Renovant la solució de manteniment cada 2 dies.

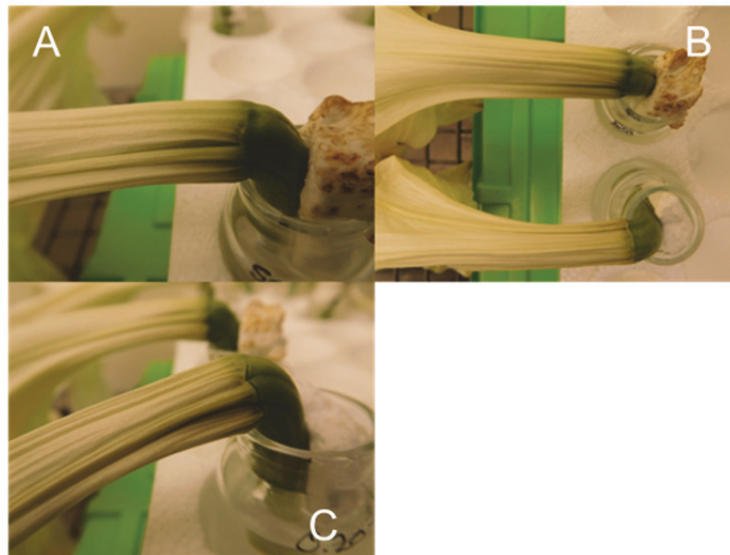


Fig. 5. Detalls de la part basal i la zona d'abscisió de flors tallades de *Lilium longiflorum* al cap de 10 dies des de la recol·lecció, tractades des del primer dia amb 500 µM MT (A, B a dalt) o amb solució del vas control (C, D a baix).

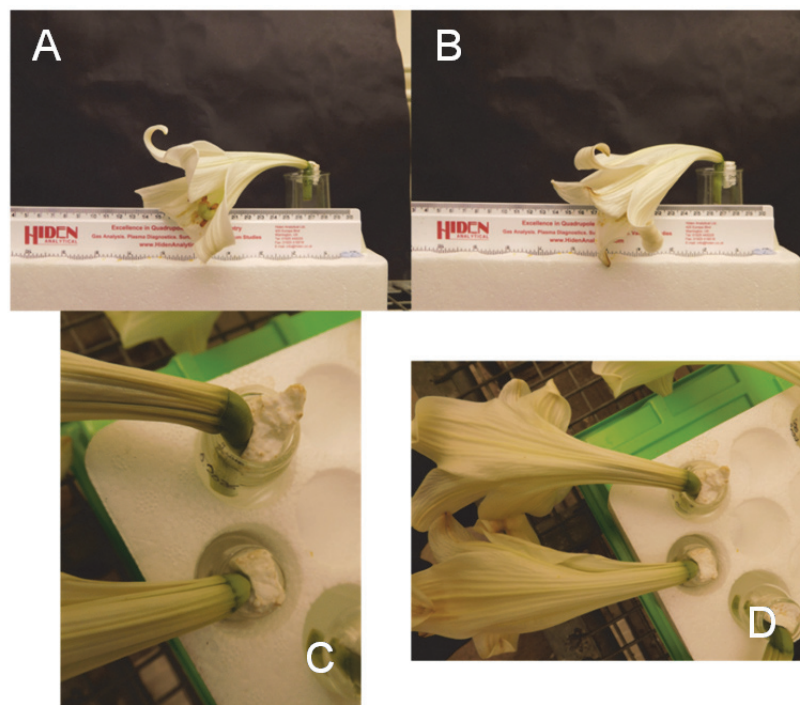


Fig. 6 (superior) Flors tallades de *Lilium longiflorum* al cap de 10 dies des de la recol·lecció, tractades des del primer dia amb 500 µM MT (esquerra) o amb solució del vas control (dreta). (inferior) dos detalls de la part basal i la zona d'abscisió de les mateixes flors tractades amb 500 µM MT (a baix) o tractament control (a dalt)

A L.A. Courier, hi ha un efecte significatiu del tractament amb MT en els dies des de CB fins a l'abscisió, de 7.2 dies al control a 8.3 dies en flors tractades amb 500 µM des de CB (+15%), però no hi ha un efecte significatiu en els altres

tractaments (Fig. 7). També entre FB i l'abscisió, i entre LS i l'abscisió (1.2 a 2 dies). Considerant els dies transcorreguts entre l'abscisió i l'antesi (Abs-Ant) tots els tractaments que exposen la flor a MT (_CB, _24h, _FB), encara que sigui només per un reduït període, passen més temps entre aquests estadis que el control (Fig. 7). A més, el %FW és significativament inferior a LS solament en el tractament _24h (Fig. 7). En canvi, a l'arribar a l'abscisió el pes fresc de totes les flors tractades amb MT és inferior al de les no exposades: 78 %FW al control mentre els diferents tractaments presenten 61-64 %FW (relatiu al pes fresc del CB, al principi de l'experiment).

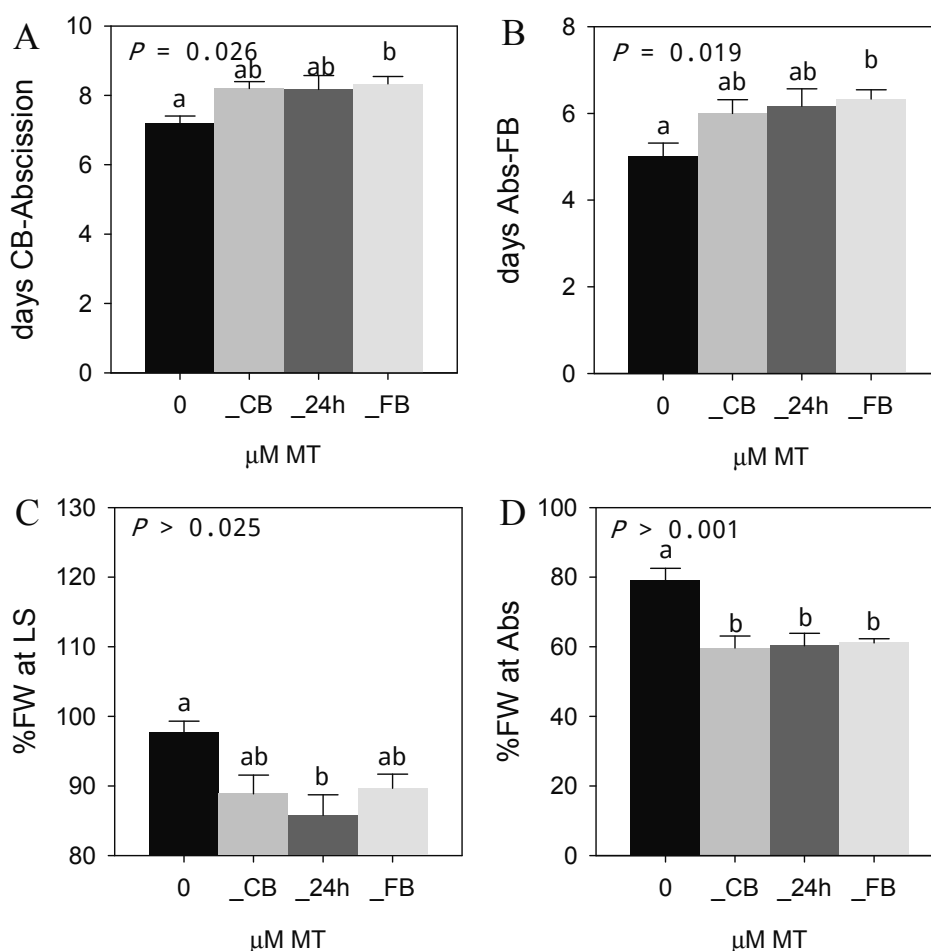


Fig. 6 Dies transcorreguts entre el principi de diferents estadis de senescència (A,B) i percentatge de pes fresc al principi de cada estadi (respecte el pes fresc de la gemma floral a l'estadi CB (C,D) en flors de *Lilium* L.A. Courier amb diferents tractaments de melatonina (0, control; _CB, 500 μM MT des del tall; _24h, pols de 24h de 500 μM MT des del tall; _FB, 500 μM MT a la solució del vas des de l'obertura completa de la flor). $\bar{x} \pm SE$, n = 12. ANOVA, Tukey-*b* posthoc.

4.2. Efecte de diferents concentracions de melatonina en la regulació transcripcional del metabolisme de la melatonina (Experiment I)

El transcriptoma d'un *pool* de tèpals de *Lilium longiflorum* cv 'White Heaven' en diferents estadis de senescència (FB i ES) va ser seqüenciat (SRA Experiment: SRX690392; Lombardi et al., (2015)) i ensamblat en una sèrie de *contigs* representant una sèrie de putatives seqüències de nucleotids completes o fragments d'aquestes. Alineant aquestes seqüències de *Lilium* amb les seqüències del gens identificats a arròs i *Arabidopsis* s'identificaren les zones conservades però que tampoc no es mostraven repetides en el transcriptoma de referència ni en el de plantes model (PrimerBlast).

S'identificaren els gens que codifiquen els enzims involucrats en la síntesi i degradació de la melatonina. S'identificaren aquests després d'una exhaustiva cerca bibliogràfica (Scopus, AMENDA, revisions recents) i de bases de dades de seqüències de nucleòtids i proteïnes generalistes (Uniprot, ncbi, PlantCyc) i específiques (tair, RAP-DB) (1 de febrer de 2016). L'activitat d'aquests gens a plantes només ha estat confirmada i caracteritzada inequívocament per mètodes bioquímics (expressió heteròloga de gens putatius i assajos enzimàtics per confirmar la seva activitat i especificitat) en arròs (*Oryza sativa*) i només en alguns d'aquests gens també a *Arabidopsis thaliana* (Kang et al., 2007; Fujiwara et al., 2010; Kang et al., 2011; Kang et al., 2013; Byeon & Back, 2015; Byeon et al., 2015). Es tingueren en compte l'especificitat i funcionalitat dels *contigs* de *Lilium* candidats, identificant dominis conservats i les regions associades a l'especificitat de les reaccions catalitzades mitjançant cerques a la base de dades de dominis conservats del NCBI (CCD, *Conserved Domain Database* (Marchler-Bauer et al., 2009)) i consultant revisions sobre les diferents famílies de gens a les quals pertanyen. D'aquesta manera s'identificaren amb un cert grau de certesa homòlegs dels gens identificats en *Arabidopsis* i arròs en el transcriptoma de *Lilium*. Cerques invertides dels *contigs* candidats sobre les bases de dades permetien eliminar falsos positius. Així s'identificaren i es quantificà l'expressió relativa de SNAT, COMT i

M2H. SNAT, serotonina *N*-acetiltransferasa catalitza el pas de serotonina a *N*-acetilserotonina (Kang et al., 2011), la qual forma el primer pas exclusiu de la síntesi de melatonina (veure *Introducció*). Existeix evidència de que constitueix un pas limitant en la transformació de serotonina en melatonina (Hardeland, 2015). COMT, àcid cafèic *O*-metiltransferasa, és un gen multifuncional amb diferents fenilpropanoïdes com a substrat capaç de catalitzar el pas de *N*-acetilserotonina a melatonina (Byeon et al., 2015). Finalment, M2H (melatonina 2-hidroxilasa) és membre de la família de dioxigenases dependent de 2-oxoglutarat de la que almenys 4 homòlegs en arròs tenen aquesta activitat degradadora de melatonina (Byeon & Back, 2015). S'identificà un homòleg a *Os2ODD33* a *Lilium*.

Un cop identificats els homòlegs al transcriptoma de *Lilium* i comprovada l'especificitat i rendiment dels *primers* dissenyats es quantificà l'expressió gènica relativa emprant els *primers* PUV com a referència. S'avaluaren els canvis en la regulació transcripcional del metabolisme i catabolisme de flors tallades sense tractament amb melatonina (tractament control de l'experiment I) per ambdues varietats i el quatre estadis de senescència estudiats (Fig 8). En termes relatius, els gens de la síntesi i degradació de melatonina analitzats eren quantitativament més expressats a la varietat *L. longiflorum*, possiblement degut a la poliploidia de l'hibrid L.A. Courier. Tot i que els *primers* es dissenyaren per amplificar regions conservades, la principal referència va ser el transcriptoma de *L longiflorum* i no es pot descartar l'expressió d'altres homòlegs no amplificats. Tot i això, les dues varietats presenten patrons diferents. A L.A. Courier hi ha una regulació transcripcional a la baixa del metabolisme de la MT amb l'obertura de la flor (FB), seguida d'una regualció a l'alta que s'incrementa fins a l'estadi LS. Els canvis a *L.longiflorum* són més marcats i segueixen un altre patró, amb un màxim amb els primers signes de senescència a ES, per disminuir dramàticament a LS. L'objectiu és complementar aquestes mesures amb l'estudi de canvis en el perfil hormonal, incloent metabolits de la melatonina. Així, canvis en els continguts es podran associar a canvis en l'expressió de gens que codifiquen enzims responsables de la interconversió entre els diferents precursors i catabòlits de melatonina.

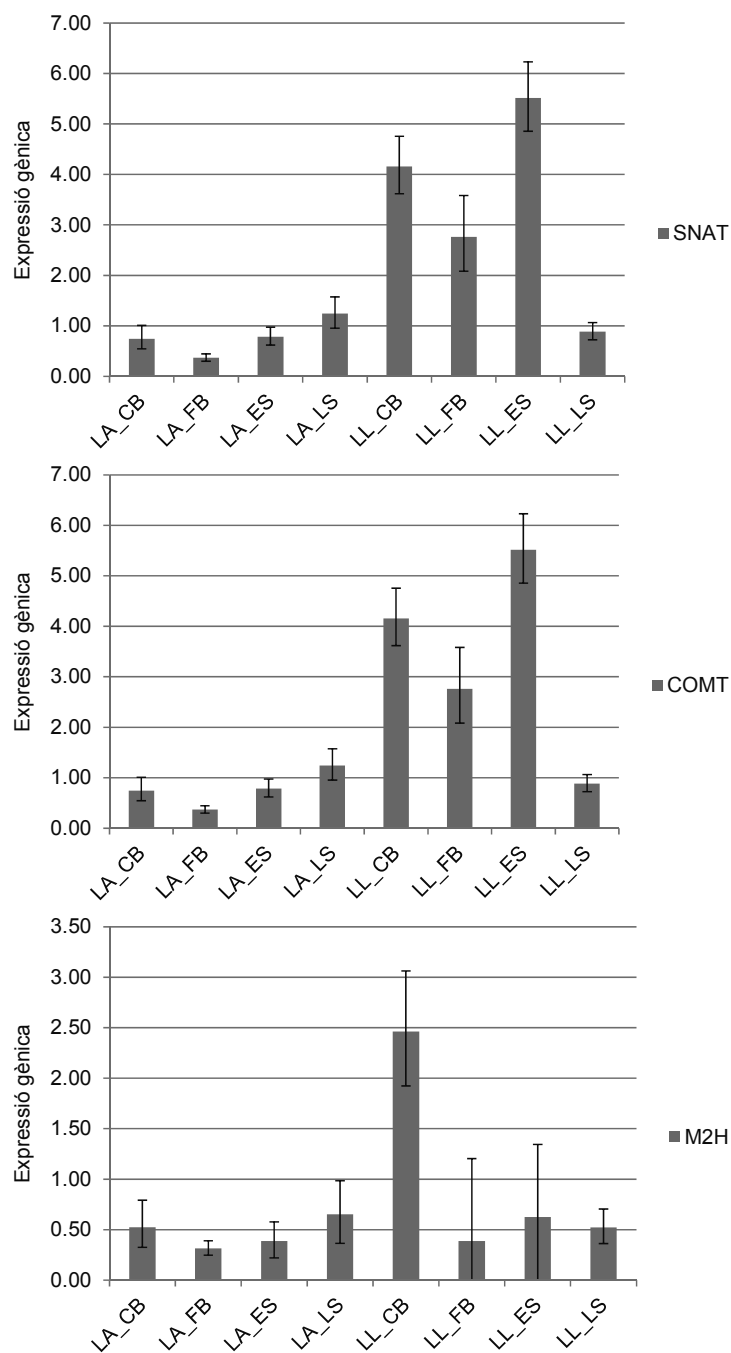


Fig. 8. Canvis en els nivells d'expressió gènica de gens involucrats en la síntesi i degradació de melatonina. S'hi mostren 2 varietats (LA, L.A. Courier; LL, L. longiflorum cv 'White heaven'), els diferents estadis estudiats (CB, Closed Bud; FB, Full Bloom; ES, Early Senescence; LS, Late Senescence) i els gens dels quals s'en quantificà l'expressió (SNAT, serotonina *N*-acetiltransferasa; COMT, àcid cafèic *O*-metiltransferasa; M2H, melatonina 2-hidroxilasa). Promig de 2 rèpliques biològiques amb 3 rèpliques metodològiques.

Referències

- Arnao MB, Hernández-Ruiz J** (2015) Functions of melatonin in plants: a review. *J Pineal Res* **59**: 133–150
- Arrom L, Munné-Bosch S** (2012) Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*. *Planta* **236**: 343–354
- Bartoli CG, Casalongué CA, Simontacchi M, Marquez-Garcia B, Foyer CH** (2013) Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ Exp Bot* **94**: 73–88
- Braun P, Aubourg S, Van Leene J, De Jaeger G, Lurin C** (2013) Plant protein interactomes. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 161–187
- Byeon Y, Back K** (2015) Molecular cloning of melatonin 2-hydroxylase responsible for 2-hydroxymelatonin production in rice (*Oryza sativa*). *J Pineal Res* **58**: 343–351
- Byeon Y, Choi G-H, Lee HY, Back K** (2015) Melatonin biosynthesis requires *N*-acetylserotonin methyltransferase activity of caffeic acid *O*-methyltransferase in rice. *J Exp Bot* **66**: 6917–6925
- Byeon Y, Park S, Lee HY, Kim Y-S, Back K** (2014) Elevated production of melatonin in transgenic rice seeds expressing rice tryptophan decarboxylase. *J Pineal Res* **56**: 275–282
- Dal Cin V, Danesin M, Rizzini FM, Ramina A** (2005) RNA extraction from plant tissues: the use of calcium to precipitate contaminating pectic sugars. *Mol Biotechnol* **31**: 113–120
- Dempster EL, Pryor KV, Francis D, Young JE, Rogers HJ** (1999) Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses. *BioTechniques* **27**: 66–68
- van Doorn WG** (2001) Categories of petal senescence and abscission: a re-evaluation. *Ann Bot* **87**: 447–456
- van Doorn WG, Han SS** (2011) Postharvest quality of cut lily flowers. *Postharvest Biol Technol* **62**: 1–6
- van Doorn WG, Woltering EJ** (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. *J Exp Bot* **59**: 453–480
- Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutani M, Chen L, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K** (2010) Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem* **285**: 11308–11313

- Galano A, Tan DX, Reiter RJ** (2011) Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* **51**: 1–16
- Hardeland R** (2015) Melatonin in plants and other phototrophs: advances and gaps concerning the diversity of functions. *J Exp Bot* **66**: 627–646
- Kang K, Kong K, Park S, Natsagdorj U, Kim YS, Back K** (2011) Molecular cloning of a plant *N*-acetylserotonin methyltransferase and its expression characteristics in rice. *J Pineal Res* **50**: 304–309
- Kang K, Lee K, Park S, Byeon Y, Back K** (2013) Molecular cloning of rice serotonin *N*-acetyltransferase, the penultimate gene in plant melatonin biosynthesis. *J Pineal Res* **55**: 7–13
- Kang S, Kang K, Lee K, Back K** (2007) Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta* **227**: 263–272
- Kolář J, Johnson CH, Macháčková I** (2003) Exogenously applied melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) affects flowering of the short-day plant *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plant* **118**: 605–612
- Korasick DA, Enders TA, Strader LC** (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* **64**: 2541–2555
- Liang C, Zheng G, Li W, Wang Y, Hu B, Wang H, Wu H, Qian Y, Zhu X-G, Tan D-X, et al** (2015) Melatonin delays leaf senescence and enhances salt stress tolerance in rice. *J Pineal Res* **59**: 91–101
- Lombardi L, Arrom L, Mariotti L, Battelli R, Picciarelli P, Kille P, Stead T, Munné-Bosch S, Rogers HJ** (2015) Auxin involvement in tepal senescence and abscission in *Lilium*: a tale of two lilies. *J Exp Bot* **66**: 945–956
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, et al** (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* **37**: D205–210
- Munné-Bosch S, Queval G, Foyer CH** (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. *Plant Physiol* **161**: 5–19
- Murch SJ, Alan AR, Cao J, Saxena PK** (2009) Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *J Pineal Res* **47**: 277–283
- Murch SJ, Saxena PK** (2002) Mammalian neurohormones: potential significance in reproductive physiology of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)? *Naturwissenschaften* **89**: 555–560

- Park S, Le T-NN, Byeon Y, Kim YS, Back K** (2013) Transient induction of melatonin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) during the reproductive stage. *J Pineal Res* **55**: 40–45
- Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Qi W** (2001) Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* **34**: 237–256
- Reiter RJ, Tan D-X, Zhou Z, Cruz MHC, Fuentes-Broto L, Galano A** (2015) Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules* **20**: 7396–7437
- Rogers H, Munné-Bosch S** (2016) Production and scavenging of reactive oxygen species and redox signaling during leaf and flower senescence: similar but different. *Plant Physiol* **171**: 1560–1568
- Rogers HJ** (2013) From models to ornamentals: how is flower senescence regulated? *Plant Mol Biol* **82**: 563–574
- Rogers HJ** (2012) Is there an important role for reactive oxygen species and redox regulation during floral senescence? *Plant Cell Environ* **35**: 217–233
- Schmittgen TD, Livak KJ** (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* **3**: 1101–1108
- Stead AD, van Doorn W** (1994) Strategies of flower senescence—a review. *A RJ Scott, AD Stead, eds, Molecular and cellular aspects of plant reproduction. Cambridge University Press*, pp 215–238
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ** (1993) Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* **1**: 57–60
- Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C, Stead AD** (2003) Defining senescence and death. *J Exp Bot* **54**: 1127–1132
- Wang P, Yin L, Liang D, Li C, Ma F, Yue Z** (2012) Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *J Pineal Res* **53**: 11–20
- Weeda S, Zhang N, Zhao X, Ndip G, Guo Y, Buck GA, Fu C, Ren S** (2014) Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS ONE* **9**: e93462
- Zhang N, Sun Q, Zhang H, Cao Y, Weeda S, Ren S, Guo Y-D** (2015) Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *J Exp Bot* **66**: 647–656
- Zimmermann P, Zentgraf U** (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cell Mol Biol Lett* **10**: 515–534