



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**Vida post-collita i millora de la qualitat
en fruits climatèrics: estudi en alvocats 'Bacon'
(*Persea americana* Mill. cv. Bacon)**

Celia Vincent Sánchez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

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

**Vida post-collita i millora de la qualitat
en fruits climatèrics: estudi en alvocats 'Bacon'
(*Persea americana* Mill. cv. Bacon)**

Celia Vincent Sánchez





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Barcelona, febrer de 2022

**Vida post-collita i millora de la qualitat en
fruits climatèrics: estudi en alvocats 'Bacon'
(*Persea americana* Mill. cv. Bacon)**

Memòria presentada per Celia Vincent Sánchez per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Programa de doctorat d'Ecologia, Ciències Ambientals i Fisiologia
Vegetal de la Universitat de Barcelona.

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

Doctoranda:

Director i tutor de Tesi:

Celia Vincent Sánchez

Sergi Munné Bosch

Escribir...

o liberarse de lo real, la alfombra mágica que hace volar la ilusión, que rompe la crudeza de lo cotidiano para inventar un final feliz; pintar una hoja seca en primavera o el tintinear de la lluvia en un estribillo de verano. Yo creé un mundo para ti; un lienzo de tinta y garabatos. Con un trazo escribí el misterio que nunca me atreví a contarte. No supe hacerlo de otra manera y me inventé estas hojas para que pudieras compartir un viaje a mi lado.

Miriam García Pascual

AGRAÏMENTS

A mí y a todos,

El doctorado ha supuesto un reto y nuevas experiencias, un descubrimiento de nuevas formas, comportamientos y gente espectacular que me acompañan y acompañaban en el día a día. Muchas gracias a todos vosotros por impulsarme, motivarme, soportarme y hacer esto posible. Sin vosotros, nada hubiese sido tan fácil ni tampoco tan feliz.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director y tutor de tesis, Sergi Munné. Gracias Sergi por la oportunidad, por la confianza, por la motivación y por impulsarme a creer en cosas que ni siquiera yo sabría que podría hacer. Por tu forma revolucionaria de ver la ciencia y trabajar por la ciencia, por construcciones sólidas que no dependen de notas académicas sino de valores, ambiciones y pasiones. Gracias por ver las cosas claras y darle sentido a todo cuando yo solo podía ver NS (non-significant) – aplicable en muchos ámbitos de la vida -. También me gustaría agradecerles a mis padres por la disciplina, responsabilidad y cariño con el que me han criado, por motivarme a conocer y descubrir cada día más, a valerme e impulsarme por mí misma hacia nuevas metas, gracias mama, gracias papa, y gracias Noël por hacerme reír siempre. Y, como no, gracias a todas las mujeres trabajadoras de mi familia que me han criado y me han enseñado que el saber no ocupa lugar y que es el motor del mundo: gracias tita y gracias yaya, os quiero mucho, gracias por trabajar cada día para darme lo mejor siempre.

Al grupo ANTIOX, por ser y trabajar “como una piña” siempre, siempre, siempre. Porque, aunque el grupo esté en continua evolución, acogiendo y despidiendo a los integrantes, me he sentido parte de esa piña en todas las oleadas.

Quiero agradecer a las casualidades de la vida que te llevan a dar con gente fabulosa “PAM, en toda la vida”. Gracias Andrea por compartir conmigo desde los inicios de mi entrada en el grupo ANTIOX, por estar en momentos clave y no tan claves de desarrollo como científica, por tu serenidad, independencia y transmisión de las pasiones, eres mi imagen del equilibrio: mente, pasión y ciencia. Gracias por la motivación de los muestreos y por sacarme a compartir tanta montaña; eres mi mediodía solar. ¿Quedamos para un muestreo de *Cistus* después de tu presentación de tesis en alguna montaña del mundo? Camila, Camila, Camila... dulce y sabia Camila, gracias por enseñarme que para disfrutar has de ser valiente y salir de tu zona de confort, que yo sola me he de comer el mundo y que he de amar el “que” y el “como” hago las cosas, que cada día es una buena oportunidad para aprender y escuchar más en mi viaje de búsqueda del “yo”. Gracias por eso, por el apoyo y por hacerme sentir “en casa”, te quiero amiga. Erola, me has transmitido la sencillez de las cosas, que todo funciona con un buen corazón, mucha amabilidad, voluntad y que azúcar, especias y muchas cosas bonitas, son los ingredientes escogidos para crear a esta ¡supernena! (tú, no yo), eres la viva imagen del regalo de “la pasión por el trabajo”, gran divulgadora y científica y eso, es vida. Muchas gracias por acogerme desde el inicio y hacerme sentir “parte de algo” tan bonito. Volvería a contar mil semillas otra vez. David, admiro tus ansias de conocimiento, por tu afán de superación y querer que las cosas buenas aún sean mejores y también tu interés por la agronomía, el campo y *Botrytis*, pero te admiro más como persona, porque me emocionan tus preocupaciones más filosóficas y tu insaciable búsqueda de cosas a debatir. Solo te puedo describir con expresiones (tuyas) que me hacen

mucha gracia: David eres “tela marinera” en este grupo y, sin ti somos un “cero patatero”. “¡Ay señor!” espero que algún día me puedas hablar de constelaciones y aclarar si Júpiter es o no un avión. Melanie, iluminas allá donde vas. Me encanta tu alegría constante, que hayas combinado la maternidad y la ciencia y estoy segura de que serás una ¡supermamá! Por tu felicidad, me has inspirado mucho. Gracias Marta por ser una persona tan entusiasta, motivadora, amable y sonriente; gracias por hacerme pensar que los límites nos los ponemos nosotros y enseñarme que las pasiones son las que mueven la ciencia además del mundo; eres una gran científica y persona. Muchas gracias Clara por los ánimos, tus ganas de aprender y filosofar sobre la ciencia, por la música compartida en el lab, por tu ayuda pelando aguacates y por lo que hemos compartido desde cero en la búsqueda de la función del MeJA; espero que tus etapas como investigadora tengan una feliz continuidad y que siempre te plantees tantas preguntas como las que ahora te surgen en la mente. Tania, Alba, Laia y Sabina, vosotras que os iniciáis en el mundo del doctorado, tenéis que saber que las cosas no siempre serán fáciles, pero tampoco imposibles. Tendréis momentos en los que deseéis tirarlo todo por la borda, pero recordad la frase escrita en la pantalla de mi ordenador que alguien escribió algún día (es más grande la frase que la pantalla), que para mí tiene un mensaje muy profundo:

“If you get tired learn to rest, not to quit”

Y cuando las cosas se pongan difíciles pensad que todas tenéis la ayuda y el apoyo mutuo de todas en el grupo, que sois un pilar importante del conocimiento en plant physiology y que vuestro pilar, que seguramente compartiréis con más gente, será crucial para avanzar juntas en esta etapa. Yo tengo suerte de haber podido compartir parte de esta etapa con vosotras y os doy las gracias por estar presentes. Laia gracias por tu alegría y tu cariño, cuando estás y entro al despacho siento que voy pisando una alfombra de algodón y seda hacia mi silla. Sabina, muchas gracias por tu felicidad y tus ganas de explorar, espero que puedas inspirar a mucha gente igual que lo has hecho conmigo, y que no pares de saltar de todas partes, eres una cabra loca jajaja. Gracias Alba por compartir experiencias, por hacer de cualquier situación algo tan activo y dinámico como tú eres y por tus ganas de compartir ideas. Haces que el despacho sea un lugar más acogedor, solo le falta... ¡una esterilla de yoga! Tania, me ha gustado poderte enseñar los inicios de la ciencia, trabajar con aguacates, a que aprendas a querer al PLP tanto como yo, a usar estadística y sigmaPlot pero he de decir que el alumno... ha superado al maestro. Que suerte que tengas otros maestros de los que poder seguir aprendiendo y alumnos a los que enseñar, aprovecha todos los inputs de la vida. Muchas gracias por ser mi pierna izquierda cuando solo tuve una derecha y por ayudarme en todo lo que necesité y ponérmelo tan fácil; por darle caña a los experimentos y adaptarte a mis horarios matutinos para poder llegar a todo y más. Gracias por ayudarme en este camino y no solo durante tu TFG sino en todo lo largo de los años posteriores, por ayudarme a poder llegar a mis objetivos, por compartir tus dudas y darme la confianza de entenderte, por decirme en que sitios se puede comer buenas pizzas, pasta y ramen en Barcelona, a abrirme a tu vida y compartirme tanto: me has ayudado en todas mis batallas y espero poder estar para las tuyas. Muchas gracias amiga por hacerlo todo sencillo, eres un pedacito de sol irradiando rojas amapolas silvestres. Gracias Vero y gracias Alba C. por vuestra energía, por enseñarme que para ser científico no hace falta estar loco (yo soy la excepción, vosotras sí lo estáis...) y por haber compartido el Piri conmigo y haber marcado mi corazón con... ¡las mejores caídas en raquetas de nieve! Marina... Sí, tú también estás loca, pero lo tuyo es peor. ¡¡¡A ti te gusta!!! Y a mí también me gusta, la verdad; admiro que seas una persona tan completa, tan alegre, enérgica y que reflejes tan bien el *women empowerment*, me ha gustado mucho reírme a tu lado. Muchas gracias Paula (espero que te

guste el poema que te acabo de hacer, está inspirado en como has marcado mi desarrollo científico y todo lo que me has podido enseñar, te admiro muchísimo).

*Muchas gracias, Paula, por la paciencia,
has sido como una madre en la ciencia.
No es por tu inteligencia (que también)
pero más por tus valores, que están llenos de esencia.
Incluso en tu ausencia,
te pienso para conciliar mis creencias.
Paula eres mi influencia, inspiración y referencia.
¡Que dicha soy de haber contado con tu presencia!*

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han impulsado a hacer el doctorado y me han apoyado en todo momento... Gracias Alba y Berta, por la motivación, las emociones compartidas y por las sesiones de terapia conjunta; sois muy importantes en mi vida. Gracias Elena, Jordi, Imma, Anna y Paula por el grupo tan guay que formamos en biotecnología y que persiste más allá del tiempo, gracias por la estabilidad y la comprensión. Gracias Aitor y Alex por las tardes y las risas en el Kapa, por las noches de montaña improvisada y por las charlas más profundas (o no tan profundas). Gracias Cristina por verme y valorarme como soy, aunque se piense lejos, solo estamos a un vuelo de pájaro en cualquier rincón del mundo. Gracias Valeria por tu espíritu innovador y por mantenerme siempre al día de tus historias habidas y por haber y por todas las cervezas que nos podamos beber. Gracias Aleix por enseñarme que los miedos se superan enfrentándose una y mil veces a ellos, que la escalada es como la vida y que la vida va, la vida viene y que tenemos que disfrutar de cada uno de los aspectos de ella y aprender a conducir las cosas hacia lo que nos llena, a estar vivos y a vivir el monte y el presente.

Gracias por vuestra presencia, estoy feliz de poder haber compartido esta etapa con personas como vosotros.

SINOPSI

Els fruits climatèrics es caracteritzen per un procés de maduració comercial estretament vinculat a la producció d'etilè, que comporta la maduració i sobre-maduració del fruit al llarg de la cadena de producció, tot portant a pèrdues que afecten a la qualitat i a la seva apreciació pels consumidors. Diverses estratègies com l'emmagatzematge en fred s'implementen actualment per tal de frenar la maduració comercial i allargar la vida útil del fruit i, així, millorar-ne la comercialització. Per aquesta raó, l'estudi de processos fisiològics desencadenats en resposta a l'exposició a temperatures fredes i l'impacte en la qualitat és essencial per comprendre els avantatges d'aquesta tècnica i les seves limitacions com, per exemple, els danys per fred que tant afecten a la vida post-collita. En aquest estudi, es van seleccionar fruits d'alvocat de la varietat Bacon (*Persea americana* Mill. cv. Bacon) amb l'objectiu d'aprofundir en el coneixement sobre el procés de maduració comercial, determinar l'impacte de l'emmagatzematge en fred sobre el contingut d'antioxidants en el fruit i estudiar tècniques innovadores per augmentar la qualitat del fruit en la post-collita. En base als resultats, la maduració comercial dels alvocats està regulada, a part de l'etilè, per altres fitohormones estretament relacionades entre si i l'emmagatzematge en fred altera la resposta hormonal tot retardant aquest procés. Ara bé, les baixes temperatures indueixen una resposta d'aclimatació regulada principalment per jasmonats, els quals tenen un rol crucial en la tolerància al fred i en evitar el desordre de danys per fred en el fruit. Per una banda, la resposta dels jasmonats contra els danys per fred pot potenciar-se mitjançant l'aplicació directa en el fruit de metil jasmonat (100 μ M) en esprai en la post-collita sense afectar les propietats antioxidants del fruit i, per altra banda, el contingut antioxidant, principalment en vitamines E i B₆, es pot incrementar notablement durant un llarg termini de temps d'emmagatzematge en fred (30d) amb tractaments post-collita de piridoxal 5'-fosfat (9mM) per immersió, els quals tenen a més un impacte positiu en fruits exposats a temperatura ambient. En conclusió, cal destacar la varietat 'Bacon' pel seu elevat contingut en vitamina E. A més, s'ha establert que les baixes temperatures són eficients per retardar la resposta hormonal implicada en la senyalització de maduració de l'alvocat. No obstant, el fred pot arribar a ocasionar danys al fruit que afecten negativament en el mercat. Així mateix, aplicacions de

metil jasmonat en esprai i tractaments de piridoxal 5'-fosfat per immersió poden afavorir l'emmagatzematge i qualitat del fruit al llarg de la cadena de producció.

ABSTRACT

Climacteric fruit are characterized by a ripening process tightly related to ethylene production, thus inducing ripening and overripening along the supply chain causing quality losses that affect consumers acceptance. Some strategies are implemented currently aiming to delay or inhibit ripening to prolong shelf life and increase avocado marketability. For this reason, the knowledge in physiological events triggered by cold exposure and its impact on fruit quality is of paramount importance to understand the advantages and disadvantages of the technique, for instance, chilling injury disorder that highly affects postharvest quality in avocados. Here, 'Bacon' avocados (*Persea americana* Mill. cv. Bacon) were selected aiming to deepen into our understanding of hormonal response regulating ripening, to determine the impact of low temperature exposure on antioxidants and to study some innovative techniques to increase postharvest quality on the fruit. According to the results, avocado ripening is regulated, rather than by ethylene alone, by orchestrated phytohormonal interactions and, cold storage alters these hormonal modulations, therefore delaying ripening. Differently, cold storage induced an acclimation response modulated by jasmonates participating in cold tolerance events for preventing chilling injury. In this sense, jasmonates response against chilling injury can be enhanced by spraying harvested fruit with methyl jasmonate (100 μ M) solutions, which resulted in a reduced number of damaged fruits without negatively affecting antioxidant properties due to vitamin E. Moreover, antioxidant content related to vitamins E and B₆ can be triggered in long-term cold-stored fruit (30d) by submersing avocados in pyridoxal 5'-phosphate (9mM) solutions which, at room temperature, slightly delayed early ripening of fruit. In conclusion, 'Bacon' variety has higher amounts of vitamin E than the widely commercialised 'Hass' or 'Fuerte' avocados. Moreover, cold temperatures prevent hormonal responses related to ripening and activates cold tolerance mechanisms but, long term exposure can induce chilling injury in 'Bacon' avocados, thus affecting its marketability. Noteworthy, methyl jasmonate and pyridoxal 5'-phosphate treatments can improve 'Bacon' avocado storage and quality along the supply chain.

ÍNDEX

ABREVIATURES	i
INTRODUCCIÓ	1
1. Desenvolupament i maduració de fruits climatèrics	3
1.1 De l'inici de la fructificació a la maduració comercial.....	3
1.2 Regulació hormonal de la maduració comercial.....	5
1.3 Canvis bioquímics	7
2. Qualitat del fruit i implicacions en la nutrició	8
2.1 Antioxidants.....	8
2.1.1 Vitamina E.....	8
2.1.2 Vitamina B ₆	9
2.2 Qualitat nutricional	11
3. Efectes de l'emmagatzematge a baixes temperatures en la qualitat	12
3.1 Efectes fisiològics i bioquímics	13
3.2 Estrès per fred.....	14
3.2.1 Espècies reactives de l'oxigen.....	15
3.2.2 Tolerància al fred.....	16
3.3 Danys per fred.....	17
4. Tractaments per a la reducció dels danys per fred en la post-collita	18
4.1 Reducció dels danys per fred.....	19
4.1.1 Modificacions de temperatura	19
4.1.2 Emmagatzematge en atmosferes controlades.....	19
4.1.3 Modificacions en la radiació	20
4.1.4 Tractaments exògens (elicitors i fitohormones)	20
4.2 Mecanismes fisiològics.....	21
4.2.1 Integritat de la membrana.....	22

4.2.2	Sistema antioxidant.....	22
5.	Model d'estudi: <i>Persea americana</i> Mill. cv. Bacon.....	23
	OBJECTIUS.....	27
	INFORME DEL DIRECTOR DE TESI.....	31
	RESULTATS.....	37
	Capítol 1. Identificació d'una nova varietat d'alvocat (<i>Persea americana</i> Mill. CV. Bacon) amb alt contingut de vitamina E i impacte de l'emmagatzematge en fred en la composició de tococromanols	39
	Capítol 2. Interacció hormonal en la regulació de la maduració comercial en fruits i aclimatació al fred en alvocats.....	57
	Capítol 3. Determinació de la qualitat de fruits d'alvocat submergits en una solució de piridoxal 5'-fosfat.....	73
	Capítol 4. L'aplicació de metil jasmonat redueix els danys per fred en l'alvocat 'Bacon' (<i>Persea americana</i> Mill. cv. Bacon)	117
	DISCUSSIÓ.....	147
	1. L'alvocat com a model de fruits climatèrics	149
	2. L'alvocat 'Bacon' i la rellevància del fruit en el comerç global.....	152
	3. Maduració comercial i sobre-maduració en l'alvocat.....	155
	4. Límit entre la tolerància a les baixes temperatures i els danys per fred.....	158
	5. Contraposició dels desordres "black spot" i danys per fred.....	163
	6. Estratègies per a la millora de la qualitat de l'alvocat en la cadena de producció.....	164
	CONCLUSIONS	171
	BIBLIOGRAFIA.....	177

ABREVIATURES

ACC àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic

CBF *C-REPEAT BINDING FACTOR COLD RESPONSE PATHWAY*

CKs citocinines

GA gibberel·lines

JA-Ile jasmonoil-isoleucina

1-MCP 1-metilciclopropà

OPDA àcid 12-*oxo*-fitodienoic

PLP piridoxal 5'-fosfat

ROS espècies reactives de l'oxigen



INTRODUCCIÓ

1. Desenvolupament i maduració de fruits climatèrics

1.1 De l'inici de la fructificació a la maduració comercial

L'evolució és una estratègia molt rigorosa a mans de la naturalesa que afecta i ha afectat a tots els organismes del planeta. Al llarg de l'evolució, la complexitat de les plantes ha incrementat donant lloc a aspectes distintius entre espècies que ha portat a la diferenciació entre les gimnospermes i angiospermes. El grup de les angiospermes es caracteritza per incloure plantes productores de flors i fruits – que contindran la llavor en el seu interior – mentre que les gimnospermes, com el seu nom indica, produeixen una llavor nua (Friis i Ende, 1990). Així doncs, gràcies a l'evolució en la fructificació de les plantes, els humans ens hem pogut proveir de fruites i, conseqüentment, aliments essencials pel nostre consum (Tomato Genome Consortium, 2012). La fructificació és, doncs, un mecanisme complex que gira entorn la reproducció per afavorir la dispersió i mantenir el llinatge i supervivència de l'individu (Friis i Ende, 1990; McAtee et al., 2013; Seymour et al., 2013). En les plantes angiospermes, existeix un paral·lelisme entre el procés de desenvolupament del fruit – des del quallat del fruit fins a la maduració fisiològica – i el desenvolupament de la llavor, que succeeixen de forma sincrònica i sigui possiblement desencadenat per una complexa interacció hormonal entre l'embrió i el mesocarpi (Rasori et al., 2010; McAtee et al., 2013). La fructificació es descriu a través d'una corba sigmoïdal dividida en tres fases: la primera que consisteix en el quallat del fruit un cop s'ha portat a terme el procés de fertilització, la segona on té lloc el creixement del fruit, desenvolupament de l'embrió i la llavor i la tercera, on es dona la maduració fisiològica (Cowan et al., 2001). Així mateix, quan s'assoleix la maduració de l'embrió i la fructificació, es dona pas al procés de maduració comercial en el fruit, a través del qual adquireix les propietats organolèptiques desitjades per al consum humà, generalment relacionades amb el gust, aromes i textura (Figura 1, Klee i Giovannoni, 2011).

Cal distingir entre la maduració fisiològica i la maduració comercial o, en anglès, “ripening”. La maduració fisiològica és un procés que s'inicia després del creixement del fruit – regulat, principalment, per auxines i citocinines (CKs; Kumar et al., 2014) – i consisteix en la preparació del fruit per iniciar la maduració comercial. Finalment, la maduració comercial es defineix com el procés que dona lloc a una sèrie de canvis

bioquímics que milloren les propietats organolèptiques del fruit que tant apreciem els humans (Seymour et al., 2013). No obstant, aquest procés difereix entre diferents fruits i no es dona de la mateixa manera en totes les espècies. D'aquesta manera, els fruits s'engloben en les categories de climatèrics i no climatèrics.

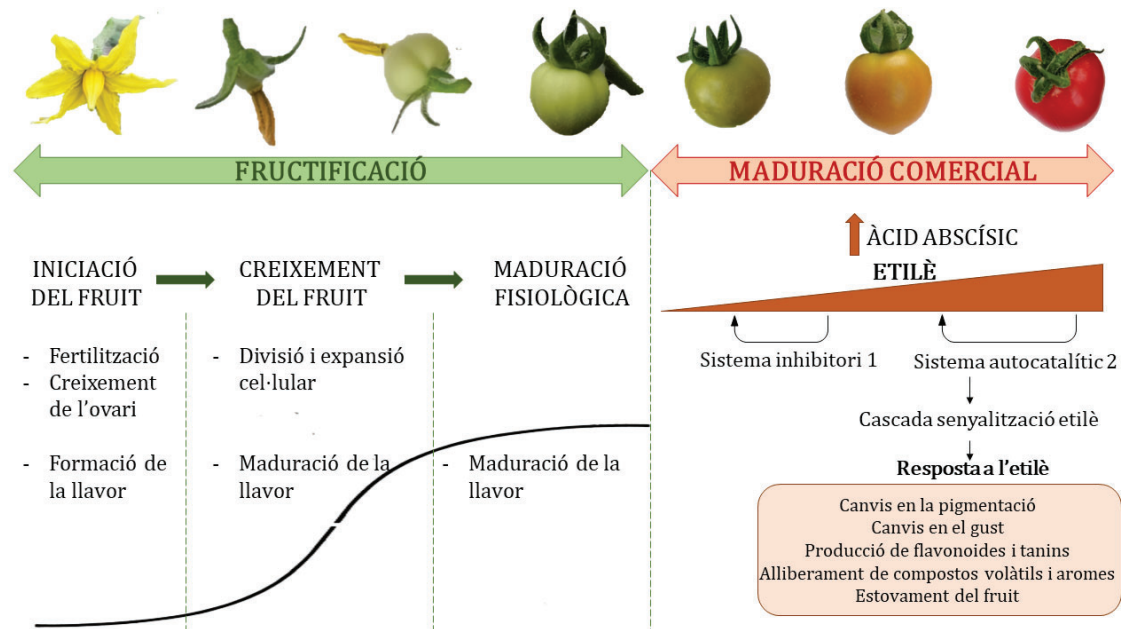


Figura 1: Procés de fructificació des de la iniciació fins a la maduració fisiològica amb esdeveniments inclosos en la corba sigmoïdal de creixement i procés de maduració comercial i canvis fisiològics en fruits climatèrics.

La classificació dels fruits en climatèrics i no climatèrics va sorgir a finals del 1950, quan van aparèixer discrepàncies sobre el rol de l'etilè en aquest procés i es va suggerir la seva funció com a molècula inductora de la fase climatèrica en fruits, deixant de banda la idea que es construïa entorn a ser un subproducte de la maduració comercial (Buhler et al., 1957). Així mateix, des dels anys 60, la categoria dels fruits climatèrics inclou aquells que tenen una maduració comercial dependent de l'etilè, la producció del qual s'associa, a més a més, a un pic de respiració en el fruit (Burg et al., 1962). En canvi, els fruits no climatèrics es defineixen com aquells que no depenen de l'etilè per dur a terme la maduració comercial, sinó que l'àcid abscísic és la fitohormona responsable d'aquest procés (Li et al., 2011). Tot i que actualment aquesta classificació es segueix mantenint, la comunitat científica replanteja i qüestiona les bases d'aquest criteri ja que, recentment, s'està establint un nexa entre els processos fisiològics i bioquímics que tenen lloc durant la

maduració comercial i l'acció de diverses fitohormones, fet que suggereix que el procés està regulat de forma coordinada entre altres hormones més enllà de l'etilè en fruits climatèrics (Kumar et al., 2014). A més, en fruits no-climatèrics, l'etilè també adquireix una funció important en el desenvolupament i maduració comercial (Chervin et al., 2004).

1.2 Regulació hormonal de la maduració comercial

La maduració comercial és el procés per a obtenir un fruit madur llest per ser consumit i, per tant, d'elevat interès en la indústria agrícola, biotecnològica i de l'alimentació. Un major coneixement d'aquest procés fisiològic permet millorar les estratègies tecnològiques per tal de millorar la qualitat dels fruits al llarg de la cadena de producció. Com s'ha mencionat anteriorment, la maduració comercial en fruits climatèrics està regulada en l'espai i el temps principalment per l'etilè (Burg et al., 1962; Klee i Giovannoni, 2011; Kumar et al., 2014). L'estat de desenvolupament del fruit condicionarà la resposta del propi fruit a l'etilè a través de la regulació de la producció i la sensibilitat a aquesta hormona (Klee i Giovannoni, 2011; Brumos, 2021). Malgrat això, estudis recents en tomaquera destaquen la rellevància d'altres fitohormones que participen activament i de forma orquestrada en el procés, com ara les auxines, l'àcid abscísic, els brassinosteroides i el metil jasmonat, que regulen esdeveniments específics durant la maduració comercial (Kumar et al., 2014; Brumos, 2021; Qiao et al., 2021). Així mateix, en tomaquera, s'ha observat que una caiguda en els nivells d'auxines a l'inici de la maduració comercial és essencial per la transició del creixement i desenvolupament del fruit a la maduració comercial, ja que la relació entre les auxines i l'etilè estableix el moment de canvi del sistema 1 inhibitori de producció d'etilè al sistema 2 auto-catalític. A més a més, l'àcid abscísic controla aspectes d'aquest procés fisiològic relacionats amb l'estovament del fruit característic d'aquesta etapa, intervenint directament en la regulació de l'expressió d'enzims moduladors de les parets cel·lulars, com la poligalacturonasa i la pectat liasa, tot participant conjuntament amb l'etilè afavorint la pèrdua de fermesa (Brumos, 2021).

Entre les diverses hormones al regne vegetal hi trobem les auxines, CKs, gibberel·lines (GAs), àcid abscísic, etilè, salicilats i jasmonats. Aquestes actuen en concentracions molt baixes en el metabolisme permetent que les plantes es

desenvolupin i responguin a canvis tant interns com externs, com ara la maduració comercial o la tolerància a estressos. Generalment, a cada hormona se li escau una funció o procés fisiològic concret però, la realitat és molt més complexa. Les fitohormones actuen en processos de senyalització de forma individual o mitjançant interaccions entre elles tot generant una resposta sinèrgica o antagònica segons l'espai i el temps (Botton et al., 2019). D'aquesta manera, s'estableix que les hormones tenen una funció espacio-temporal. Generalment, les CKs i auxines estan implicades en processos de divisió i expansió cel·lular i, per tant, es relacionen amb funcions de creixement d'òrgans (Rademacher, 2015; Iqbal et al., 2017). Entre les CKs naturals trobem la zeatina i la isopentenil adenina, que es sintetitzen a partir dels seus precursors ribòsid de zeatina i isopentenil adenosina, respectivament. L'àcid indol-3-acètic és la única auxina natural i activa en el teixit vegetal implicada en aquest procés però, també s'ha destacat el seu rol en l'estovament del fruit durant la maduració comercial (Figuerola et al., 2009). Les GAs naturals més actives en plantes són la GA₁, GA₃, GA₄, GA₇ que participen promovent la proliferació cel·lular, a més de tenir una funció clau en la germinació i la floració (Rademacher, 2015; Iqbal et al., 2017). Els jasmonats i els salicilats són hormones encarregades, principalment, de la funció de defensa contra estressos abiòtics i biòtics. Tot i així, els jasmonats pertanyen a la família de les oxilipines essent l'àcid 12-*oxo*-fitodienoic (OPDA) el precursor directe de l'àcid jasmònic i els seus derivats. Els jasmonats engloben moltes formes conjugades amb aminoàcids, entre les quals les més actives són la jasmonoil-isoleucina (JA-Ile), a la que se li atribueix una funció essencial en la tolerància contra estressos, i el metil jasmonat que, juntament amb el metil salicilat, són uns compostos volàtils implicats en la defensa de patògens, a més d'oferir protecció en alguns desordres en fruits (Rademacher, 2015). En la tolerància a estressos abiòtics també està implicat l'àcid abscísic que, a més, té un rol crucial en processos de dormició de la llavor o de les gemmes florals i, fins i tot, intervé en la maduració comercial de fruits no climatèrics. Finalment, l'etilè participa en una gran diversitat de processos fisiològics en la planta però destaca principalment per induir la maduració comercial en fruits climatèrics (Klee i Giovannoni, 2011; Rademacher, 2015; Iqbal et al., 2017).

Recentment, diversos estudis atribueixen l'activitat epigenètica a aspectes reguladors del control de la maduració comercial. Aquests descriuen que les

histones indueixen reaccions de metilació i desmetilació en regions promotores de gens directament implicats en la síntesi de l'etilè i del propi procés de maduració (Giovannoni et al., 2017; Brumos, 2021).

1.3 Canvis bioquímics

Durant les etapes de desenvolupament, el canvi més rellevant és el creixement del fruit, però les modificacions més interessants, des del punt de vista organolèptic, esdevenen posteriorment durant la maduració comercial (Wang et al., 2021). Entre aquests canvis destaquen la degradació de clorofil·les i l'acumulació de pigments, com els carotenoides o els antocians que influeixen en el canvi de coloració del fruit, passant de tonalitats verdes a coloracions taronges o vermelles pròpies d'aquests pigments (Zhao et al., 2021a). També hi ha canvis en el gust degut a la síntesi de sucres derivada de la degradació de midó (Wang et al., 2021; Zhu et al., 2021a) i acompanyada d'una caiguda en l'acidesa. Altres canvis rellevants durant la maduració comercial són la producció de flavonoides i tanins i l'alliberació de compostos volàtils i aromes deguts a processos de respiració (Dourou et al., 2021; Wang et al., 2021). En fruits amb elevat contingut lipídic, són característiques les modificacions en la composició d'àcids grassos (Ozdemir i Topuz, 2004). Finalment, al llarg de tot el procés, té lloc la pèrdua de la fermesa que comporta l'estovament del fruit (Gao et al., 2021; Kumar et al., 2021; Yang et al., 2021). Aquests canvis bioquímics estan estretament regulats per senyals endògenes i, entre elles, la regulació hormonal esdevé un factor clau. El rol de l'etilè adquireix rellevància en els processos bioquímics propis de la maduració comercial, regulant canvis en el color, en l'alliberament d'aromes i modificacions en la textura que, conjuntament, determinen la qualitat final dels fruits (Klee i Giovannoni, 2011; Iqbal et al., 2017; Botton et al., 2019). Aquesta regulació té lloc de forma organitzada en òrgans i teixits concrets (Yang et al., 2021). No obstant, els fruits en la post-collita es deterioren fàcilment, ja sigui per possibles danys mecànics o fisiològics, per patògens o per la pròpia sobre-maduració i, en conseqüència, es perden moltes propietats organolèptiques durant el transport, emmagatzematge i exposició als mercats i supermercats, tot alterant-ne la qualitat i la comercialització (Zhang i Jiang, 2019).

2. Qualitat del fruit i implicacions en la nutrició

2.1 Antioxidants

La qualitat del fruit es pot apreciar des de dues vessants: per una banda, contemplant la seva integritat i l'absència d'anomalies possiblement causades per defectes en el desenvolupament, danys produïts durant la cadena de producció o deguts a possibles infeccions per patògens; i, per altra banda, la qualitat també es pot associar a aspectes bioquímics considerant la riquesa d'aquests fruits en vitamines, antioxidants, fibra, àcids grassos i altres compostos beneficiosos per la salut del consumidor.

Tenint en compte la perspectiva de qualitat que considera la integritat, els danys i el deteriorament del fruit, aquesta es pot avaluar a simple vista, tot generant el rebuig inicial del fruit per part del consumidor. Així mateix, fruits malformats o que presenten taques, ferides o altres anomalies rarament són aprofitats i, generalment, es descarten abans de ser exposats a les prestatgeries de mercats i supermercats. Considerant la qualitat bioquímica, aquesta es veu alterada per aspectes relacionats tant amb la cadena de producció com amb les infeccions per patògens, on es desencadenen respostes d'estrès que influeixen en l'estat oxidatiu del fruit i en el contingut d'antioxidants. Entre aquests antioxidants destaquen les vitamines antioxidants, com les vitamines E i B₆, les quals exerceixen una funció protectora en les estructures cel·lulars i en la defensa enfront l'estrès oxidatiu, així com davant de possibles patògens (Falk i Munné-Bosch, 2010; Zhang et al., 2014; Bagri, 2018).

2.1.1 Vitamina E

Els tococromanols inclouen els tocoferols, els tocotrienols i el plastocromanol-8 però, sols els tocoferols i tocotrienols pertanyen al grup de la vitamina E. Aquesta vitamina va ser inicialment descrita en l'àmbit de la fisiologia animal per Evans i Bishop (1922). Els tococromanols estan conformats per una cadena isoprenoide, saturada en el cas dels tocoferols i insaturada per als tocotrienols i plastocromanol-8, i un anell cromanol comú en els tres grups (Figura 2; Kruk et al., 2014; Falk i Munné-Bosch, 2010). Tant en el cas dels tocoferols com dels tocotrienols es distingeixen diferents isoformes segons el nombre i la posició dels grups metil en l'anell cromanol. Així, es diferencien 8 isoformes diferents de vitamina E: α -

tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol i α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol i δ -tocotrienol (Falk i Munné-Bosch, 2010; Figura 2).

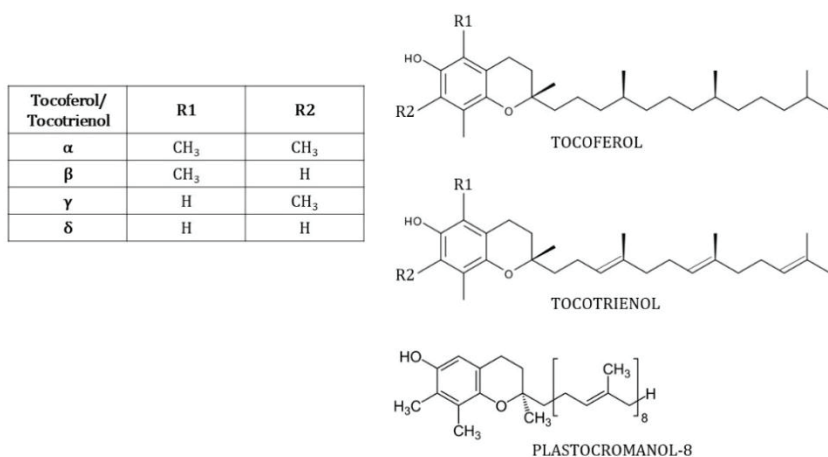


Figura 2.
Estructura química dels tococromanols, incloent les diferents isoformes de tocoferol i tocotrienol.

Els tococromanols, principalment l' α -tocoferol amb una major activitat de vitamina E, es sintetitzen i localitzen en plastidis, concretament ancorats a les seves membranes (tant en la membrana interna com en els tilacoides, en el cas de l' α -tocoferol en cloroplasts) per la cadena poliprenil, degut a la seva naturalesa lipofílica. Participen en la detoxificació del singlet d'oxigen (1O_2), en la protecció del fotosistema II i també com a antioxidants inhibint la propagació de la peroxidació lipídica reduint la concentració de radicals lipídics oxidants en les membranes (Kruk et al., 2005; Falk i Munné-Bosch, 2010). En aquesta darrera reacció, el tocoferol es converteix en radical tocoferoxil que serà reciclat de nou a tocoferol amb l'ajuda de l'ascorbat (Falk i Munné-Bosch, 2010). Així doncs, la vitamina E té un rol crucial en l'eliminació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) generades en excés durant períodes d'estrès tant biòtic com abiòtic. Així mateix, el plastocromanol-8 té una activitat comparable a la de la vitamina E, sobretot en medis lipofílics, tot i trobar-se en menors concentracions en els teixits (Falk i Munné-Bosch, 2010; Kruk et al., 2014).

2.1.2 Vitamina B₆

La vitamina B₆ va ser descrita per Ohdake (1932) en extractes d'arròs. Aquesta engloba diferents vitàmers que s'interconverteixen entre sí; són la piridoxina,

piridoxamina i piridoxal els quals també existeixen en les seves formes fosforilades (Figura 3).

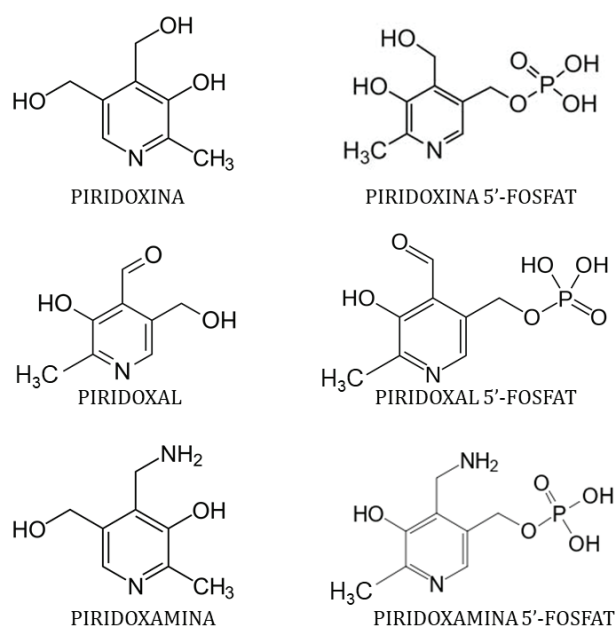


Figura 3. Estructura dels 6 vitàmers de la vitamina B₆ incloent piridoxina, piridoxina 5'-fosfat, piridoxal, piridoxal 5'-fosfat, piridoxamina i piridoxamina 5'-fosfat.

Entre aquestes, la forma metabòlicament més activa és el piridoxal 5'-fosfat (PLP) que participa com a cofactor en més de 140 reaccions enzimàtiques en teixits vegetal entre les quals destaquen oxidoreductases, transferases, hidrolases, liases i isomerasas actuant en reaccions de transaminació, racemització, α -descarboxilació, ruptura dels grups aldol i eliminació de formes β i γ (Jansonius, 1998; Drewke i Leistner, 2001; Percudani i Peracchi, 2009; Mooney i Hellman, 2010; Colinas et al., 2016). Els vitàmers existeixen en la majoria dels organismes vius on es sintetitzen a través de la via clàssica –excepte en animals, que l'han d'obtenir a través de la dieta –. Així mateix, en pocs organismes, entre els quals destaquen les plantes, es descriu una via de síntesi *de novo* que representa la major font de vitamina B₆. Diversos estudis realitzats en fulles o arrels de plantes evidencien el seu rol com a cofactor però també es destaca la seva activitat antioxidant contra el singlet d'oxigen i l'anió superòxid complementant la funció amb d'altres vitamines com l'ascorbat o l' α -tocoferol (Bilski et al., 2000; Havaux et al., 2009; Huang et al., 2013). D'aquesta manera, a la vitamina B₆ se li atribueix un rol en la fotoprotecció i la protecció contra molècules oxidatives com les ROS (Havaux et al., 2009). A més, també s'ha descrit que pot tenir una influència sobre el creixement i desenvolupament de la planta

afectant la síntesi de fitohormones com l'etilè i auxines, i en la tolerància contra l'estrès biòtic i abiòtic (Zhang et al., 2014; Boycheva et al., 2015; Bagri et al., 2018). Encara que els efectes en teixits vegetals, com fulles i arrels, ja es coneixen, la funció de la vitamina B₆ en fruits i la seva possible implicació en la maduració de fruits romanen desconegudes.

2.2 Qualitat nutricional

Actualment, en l'àmbit de la nutrició sorgeixen noves tendències que s'enfoquen cap a una modalitat més ecològica i sostenible i, en el cas dels fruits, es prioritza que hagin estat cultivats, recol·lectats i transportats a través de pràctiques que tinguin en consideració el medi ambient, el malbaratament i l'ètica (Mastronardi et al., 2019). D'aquesta manera, es promouen iniciatives com el "cultiu ecològic" on es redueix l'ús de pesticides i herbicides de naturalesa química, es promou el "km zero", on es fomenta el comerç local i de curta distància, i la reducció de la "petjada ambiental", on es té en compte l'impacte ambiental que té la cadena de producció d'un producte o aliment en concret. En resum, la tecnologia i producció d'aliments evolucionen cap a un sentit més "natural" i menys artificial (Binz i Conto, 2019). De fet, el Pacte Verd Europeu incentivat per la Comissió Europea (2021) pretén que les àrees agrícoles amb producció ecològica assoleixin el 25% al 2030. A més, segons el Reglament (UE) 2020/1693 de 11 de novembre que entra en vigor aquest any 2022, s'estableix una nova legislació sobre l'agricultura ecològica que facilita la pràctica i amplia les possibilitats dels agricultors alhora que garanteix la seguretat per els consumidors.

Així mateix, els consumidors aprecien, cada cop més, productes amb aquestes característiques i, per tant, que no hagin estat tractats amb químics ni durant el cultiu ni al llarg de tota la cadena de producció (Gol et al., 2013). A més, valoren positivament que els fruits tinguin un origen més proper al lloc de comercialització i una vida útil més llarga per tal de reduir la petjada ambiental i el malbaratament. Per aquest motiu, el propi sistema alimentari busca alternatives per substituir l'ús de productes químics, allargar la vida útil i afavorir l'abastiment d'aliments a través de l'ús de components més naturals que estiguin presents ja a la naturalesa o que tinguin un impacte nul en el medi, tal i com s'indica en el Real Decreto 1311/2012 a Espanya (Gol et al., 2013; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio

Ambiente, 2012; Scarlato et al., 2021). De la mateixa manera, l'alimentació, sobretot en l'àmbit de l'agricultura, també s'enfoca cap a una major qualitat nutritiva tenint com a objectiu garantir el contingut màxim de components beneficiosos per la salut en una mateixa peça de fruita i que aquesta sigui mínimament alterada al llarg de la cadena de producció (Gol et al., 2013; Bill et al., 2014; Nayak et al., 2021; Sivakumar et al., 2021). D'aquesta manera, els consumidors es tornen més exigents i busquen aliments més complets i amb major propietats nutraceutiques, destacant l'àmbit dels antioxidants (Lobo et al., 2010), com la vitamina E i B₆, que tenen una potent acció contra el desenvolupament de malalties cardiovasculars que tant afecten la salut pública en el segle XXI segons indiquen dades de comitè American Heart Disease i Stroke Statistics (Virani et al., 2021).

S'ha descrit la funció de la vitamina E (α -tocoferol) en la reducció del risc de malalties cardiovasculars gràcies a la seva funció antioxidant, protectora contra l'oxidació de lipoproteïnes i inhibidora de l'agregació plaquetària (Freedman et al., 1996; Clarke et al., 2008). A més a més, la deficiència de vitamina E s'associa a patir atàxia, hiperreflexia, ceguera i demència (Aparicio et al., 2001). Així mateix, es recomana una ingesta diària de 15mg d' α -tocoferol, tot i que cal tenir en compte que una sobre-suplementació (per sobre d'1mg diari) d'aquesta vitamina també pot comportar afectacions negatives en el metabolisme humà (Miller et al., 2005).

Com s'ha esmentat anteriorment, la vitamina B₆, en concret el PLP, té una activitat antioxidant molt potent que complementa la de la vitamina E en la detoxificació de ROS, fet que no només succeeix en plantes sinó també en el metabolisme humà (Hellman i Mooney, 2010). La ingesta recomanada de vitamina B₆ és de 2 mg amb un màxim de 100 mg diaris en adults. Aquesta aportació de vitamina B₆ s'ha observat que és important en el control de la pressió arterial i en la prevenció de malalties cardiovasculars (Hellman i Mooney, 2010).

3. Efectes de l'emmagatzematge a baixes temperatures en la qualitat

La temperatura és el principal factor que influeix en els canvis de qualitat, deteriorament del fruit i en la vida útil de productes peribles i molt peribles com ara els fruits. L'emmagatzematge en fred és una pràctica molt comú i eficient en la cadena de producció d'aquests aliments, ja que permet allargar la vida útil i així,

permet el transport a llargues distàncies. Sense aquesta pràctica, les propietats dels fruits serien malmeses (Khumalo et al., 2021; Ndraha et al., 2018).

3.1 Efectes fisiològics i bioquímics

L'emmagatzematge a baixes temperatures pot allargar la vida útil dels fruits de forma eficient afectant a processos metabòlics associats a la maduració comercial com la respiració o la producció d'etilè (Botton et al., 2019). Ara bé, canvis i/o interrupcions en aquestes temperatures pot comportar fenòmens negatius en la collita que posteriorment, afecti a la seva comercialització (Cheng et al., 2021). Generalment, es descriuen casos de danys per fred o en anglès "chilling injury" que apareixen en fruits emmagatzemats a baixes temperatures – per sota del llindar de tolerància i/o per llargs períodes de temps–. Aquest desordre es manifesta com a taques negres a la pell i enfosquiment o decoloració del mesocarpí de fruits com l'alvocat, mangos olives i pomes (Figura 4), tot i que segons l'espècie, el fenotip de danys per fred pot variar presentant-se com coloracions pàl·lides com succeeix en pinyes o bananes, alteracions en el gust i els aromes com en el cas de la papaia, també els préssecs i els tomàquets poden manifestar una aparença aigualida o, fins i tot, els fruits poden presentar diversos símptomes alhora (Lurie i Crisosto, 2005; Luo et al., 2015).

Figura 4. Efectes fisiològics del dany per fred en l'alvocat on manifesta un enfosquiment del mesocarpí del fruit en la zona inferior a l'os i s'agreuja amb el temps d'exposició a baixes temperatures.



A més, l'emmagatzematge a baixes temperatures també comporta efectes negatius durant la maduració comercial fent que aquesta no es doni uniformement en el fruit afectant, per exemple, a la degradació de pectines i estructures cel·lulars tot alterant l'estovament del fruit (un dels principals factors que influeixen en el valor i apreciació del fruits al mercat) i creant un rebuig en el consumidor (Gwanpua et al., 2014; Yang et al., 2021).

Bioquímicament, el fred també té un impacte en l'aparença tot generant canvis en la composició de pigments i, per tant, en la coloració del fruit. Existeix una àmplia documentació descrivint l'augment d'antocians en fruits vermells emmagatzemats a baixes temperatures (Qiu et al., 2016; Zhou et al., 2017) però altres pigments, com els carotenoides, disminueixen dràsticament quan els fruits es mantenen a baixes temperatures, tal i com s'ha descrit en taronja o en bananes (Facundo et al., 2015; Wibowo et al., 2015; Lado et al., 2019). Els nivells de vitamina C també decreixen al voltant del 45% en nectarines emmagatzemades a temperatures entre 1-4°C, així com els compostos volàtils que defineixen els aromes atribuïts als fruits un cop són comercialment madurs (Dalla Valle et al., 2007; Aubert et al., 2014; Morales-Sillero et al., 2017). Tanmateix, es descriu que les temperatures fredes afecten negativament al contingut de fenols i a l'estabilitat oxidativa dels olis d'oliva de diverses varietats (Morales-Sillero et al., 2017) i els nivells de clorofil·les també es redueixen quan els fruits s'exposen a temperatures fredes (Aispuro-Hernández et al., 2019). No obstant, tots aquests canvis no ocorren de la mateixa manera en tots els fruits, depèn sempre de l'espècie i, fins i tot, diferents varietats d'una mateixa espècie també poden diferir en la forma de respondre a les baixes temperatures (Facundo et al., 2015; Lado et al., 2019).

3.2 Estrès per fred

Diversos estressos, ja estiguin actuant sols o de forma combinada, biòtics o abiòtics, amenacen constantment els individus als ecosistemes, tot afectant a la funció biològica de la pròpia planta. Així mateix, la temperatura és un factor crucial per a garantir que l'individu es desenvolupi en condicions òptimes i, per definició, un estrès consisteix en els danys irreversibles generats sobre el metabolisme i creixement de la planta causats per factors externs (Wahid et al., 2007). La realitat és que aquest estrès no només afecta a l'individu complet sinó que també pot afectar a diferents òrgans individualment i en diferent mesura, fins i tot, un cop després d'haver-se separat de la planta, regulant diversos processos fisiològics com la maduració comercial en el fruit o la senescència en les flors i les fulles (Muñoz i Munné-Bosch, 2018).

Les baixes temperatures són condicions ambientals adverses per a la majoria de fruits poden generar un xoc tèrmic en l'òrgan i, per tant, desencadenar una resposta

enfront l'estrès. Aquest estrès està normalment condicionat pels límits de temperatura que l'espècie i la varietat pot tolerar i, a més, pel temps d'exposició a aquest factor (Guo et al., 2018). Temperatures per sota o sobre d'aquest òptim fisiològic són percebudes per receptors tèrmics que indueixen una senyalització hormonal, on els jasmonats i l'àcid abscísic juguen una funció principal tot portant a la posterior síntesi de ROS. Les ROS iniciaran cascades de transducció de la senyal que derivaran en canvis fisiològics i bioquímics (Noctor i Foyer, 2005; Devireddy et al., 2021).

3.2.1 Espècies reactives de l'oxigen

Les ROS són molècules produïdes per les cèl·lules vegetals que, en concentracions molt baixes, participen en diversos processos cel·lulars i permeten regular processos metabòlics per al correcte desenvolupament de la planta (Foyer i Noctor, 2005; Muñoz i Munné-Bosch, 2018). Tot i així, en concentracions elevades, les ROS poden afectar negativament al metabolisme i causar danys cel·lular i tissulars (Muñoz i Munné-Bosch, 2018). Foyer i Noctor (2005) descriuen que la producció de ROS no només es localitza al cloroplast en plantes, sinó que als mitocondris i als peroxisomes també hi té lloc la formació de peròxid de hidrogen durant processos com la fotosíntesi o la mort cel·lular programada (Noctor et al., 2002; Foyer i Noctor, 2005). En concret, amb l'inici de l'estrès s'inicia una senyalització hormonal mediada principalment per àcid abscísic, jasmonats i brassinosteroides, que indueix la producció i acumulació de ROS. La producció de ROS deriva en un estrès oxidatiu que conduirà a efectes més dràstics en la cèl·lula tot afectant al metabolisme (Devireddy et al., 2021). D'aquesta manera, l'estrès per baixes temperatures comporta una aturada en el creixement i en l'activitat enzimàtica relacionada amb canvis transcripcionals, d'expressió genètica, regulant cascades de senyalització de resposta a l'estrès i de funcions metabòliques en la planta tot retardant el creixement (Zhu, 2016). Sota aquestes condicions d'estrès, també tenen lloc canvis en la fluïdesa de les membranes, comportant una major rigidesa. A més, succeeixen canvis en l'estabilitat i degradació proteica, es redueix l'eficiència antioxidant i es promou l'activitat detoxificadora de ROS. Finalment, s'inicia la síntesi de metabòlits secundaris, sucres i aminoàcids (Rihan et al., 2017).

3.2.2 Tolerància al fred

En resposta a les baixes temperatures, les plantes han adquirit al llarg de l'evolució diversos mecanismes per poder tolerar aquestes condicions adverses. Les plantes presenten estratègies per fer front a l'exposició a aquestes temperatures com, per exemple, la dormició de la llavor o de les gemmes, la sensibilitat al fotoperíode, la vernalització, la protecció dels vasos a les gelades i l'aclimatació al fred (Zaragotas et al., 2016). Així com la planta té mecanismes per adquirir tolerància al fred que li permeten resistir les condicions ambientals adverses (Devireddy et al., 2021), els fruits també han desenvolupat estratègies i respostes per fer front a aquests estressos. La resposta enfront l'estrès per fred s'inicia a través de senyals hormonals i l'estat oxidatiu de la cèl·lula (Devireddy et al., 2021), principalment modulats per les ROS que actuen amb una funció senyalitzadora juntament amb la regulació exercida per les fitohormones. S'ha atribuït gran importància a la funció dels jasmonats i l'àcid abscísic en la resposta enfront l'estrès per fred que, posteriorment, induiran una resposta bioquímica de tolerància contra aquestes condicions adverses (Figura 5).

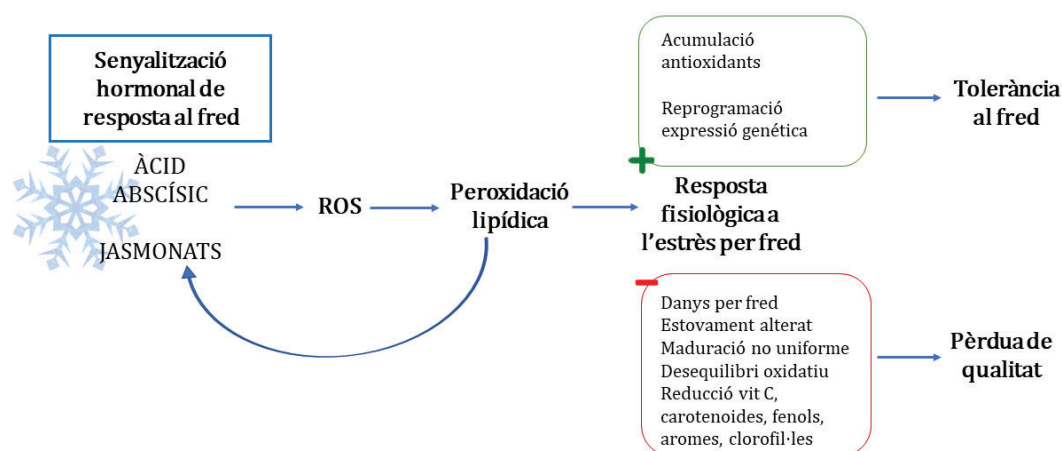


Figura 5. Resposta de tolerància als danys per fred modulada per la peroxidació lipídica i efectes positius que afavoreixen aquesta tolerància (en verd) i efectes negatius que repercuteixen a la qualitat del fruit (en vermell).

En concret, la tolerància a l'estrès per fred s'assoleix a través de mecanismes antioxidants que controlen la concentració de ROS (Foyer i Noctor, 2005) i del resultat de la interacció fitohormona-ROS que modifica el metabolisme de la planta a nivell metabòlic i bioquímic (Foyer i Noctor, 2003), on es produeix una

reprogramació de l'expressió genètica i transcripcional (Zhang et al., 2017). Aquesta resposta contraresta els efectes de l'estrès augmentant la capacitat detoxificadora de ROS tot potenciant la síntesi i acumulació de soluts compatibles i crioprotectors com la prolina o alguns antioxidants (Wahid et al., 2007; Devireddy et al., 2021). Aquests antioxidants permetran mantenir un balanç dels nivells de ROS per evitar la seva acumulació excessiva, fet que podria ocasionar canvis en la permeabilitat i fluïdesa de la membrana (Martinière et al., 2015).

3.3 Danys per fred

L'emmagatzematge en fred és l'estratègia més comuna emprada comercialment en la post-collita però, majoritàriament, els fruits tropicals i subtropicals no resisteixen bé aquestes temperatures i desenvolupen desordres fisiològics que es coneixen com a danys per fred. Els danys per fred sorgeixen desencadenats per un estrès per fred bruscat o persistent, quan les temperatures d'emmagatzematge es troben per sota del llindar de tolerància d'una espècie o varietat i per sobre del punt de congelació, generalment, en un rang entre 0-15°C (Zhang et al., 2021). Tot i així, el temps d'emmagatzematge a aquestes temperatures també condiciona l'aparició del desordre i, per tant, els danys per fred es manifesten quan es sobrepassen els límits de temperatura tolerats i/o el temps d'emmagatzematge del fruit en aquestes condicions. Els danys per fred succeeixen en dues etapes: la primera consisteix en una fase d'inducció i la segona és la fase asimptòtica. La fase d'inducció és una fase reversible on els fruits s'exposen a les temperatures crítiques i tenen lloc canvis en la composició lipídica de les membranes cel·lulars. La fase asimptòtica coincideix amb una afectació irreversible del fruit on s'aprecien els danys per fred degut a afectacions en el transport d'ions entre membranes i modificacions en processos metabòlics que malmeten les membranes cel·lulars fent visible els símptomes (Romojaro-Casado, 2016).

Aquest desordre apareix tant a la pell com al mesocarpi del fruit o bé en ambdós teixits alhora i es caracteritza per coloracions inusuals com taques negres o marronoses i/o decoloracions, aparença aigualida a la pell i/o fibrositat a la polpa (Lurie i Crisosto, 2005), tot i que pot variar en funció del fruit i de la varietat, així com de les condicions de creixement i desenvolupament (Wang, 1989). Tot i així, a nivell microscòpic les afectacions són les mateixes: desmantellament de cloroplasts

i mitocondris, degradació de clorofil·les, reducció de la mida i nombre dels grans de midó, i acumulació de lípids al cloroplast i cromatina al nucli que, posteriorment afavoreixen un deteriorament accelerat del fruit (Zhang et al., 2021). Així com discernir entre els fruits amb o sense danys per fred a la pell és evident, es complica més quan es tracta de detectar el desordre en el mesocarpi dels fruits, ja que no es pot detectar a simple vista fins al seu consum. Per aquesta raó, l'aparició de danys per fred en el mesocarpi és un dels fenòmens que més rebuig causa als consumidors i que més impacte negatiu genera sobre el mercat.

Actualment, existeixen dues hipòtesis sobre els danys per fred. La primera es basa en els danys de la membrana propis del desordre, considerant que després de l'inici del desordre, es dona l'estrès fisiològic que desencadena una sèrie de reaccions bioquímiques i metabòliques al teixit (Aghdam i Bodbodak, 2013). La segona proposa que l'estrès per baixes temperatures comporta una senyalització per ROS –concretament de singlet d'oxigen, radicals superòxid, radicals hidroxil o peròxid d'hidrogen- que resulta en els desordres típics dels danys per fred amb els canvis metabòlics i bioquímics que porta associats (Aghdam i Bodbodak, 2013).

4. Tractaments per a la reducció dels danys per fred en la post-collita

Els fruits són aliments peribles i la seva vida post-collita es pot veure afectada al llarg de la cadena de producció. Actualment, un dels principals reptes en el sector fructícola és allargar la vida útil dels fruits peribles durant l'emmagatzematge en la post-collita i garantir la qualitat durant aquest temps (Zhang i Jiang, 2019). Els últims anys, s'ha avançat cap al desenvolupament de tècniques que permetin allargar aquest temps i la qualitat entre la collita i el consum i, gràcies a aquest objectiu s'han descobert compostos, com l'1-metilciclopropà (1-MCP), que fins a dia d'avui són comunament utilitzats en fruits climatèrics com bananes, mangos, kiwis, tomàquets, pomes i préssecs, entre d'altres, per a retardar la maduració comercial (Hu et al., 2019; Pintado et al., 2021). També s'implementen tècniques basades en el control de temperatures com l'emmagatzematge en fred per tal d'evitar el deteriorament dels fruits degut al propi metabolisme o a possibles patògens.

4.1 Reducció dels danys per fred

Diversos estudis demostren que els danys per fred en productes d'origen vegetal, com els fruits, es poden reduir mitjançant l'ús d'estratègies físiques i químiques com modificacions en la temperatura prèvia a l'emmagatzematge, canvis en la composició atmosfèrica i radiacions lumíniques. Recentment, tant el mercat com la comunitat científica estan apostant per alternatives més naturals que compleixin la mateixa funció. Destaca l'ús de fitohormones –com metil salicilat i metil jasmonat – i/o elicitors com la melatonina o òxid nítric, entre d'altres, que permeten disminuir els danys per fred que és el principal desordre que afecta a la collita en fruits que passen per un procés d'emmagatzematge en fred (Aghdam et al., 2020; Seo et al., 2020; Zhang et al., 2020).

4.1.1 Modificacions de temperatura

Per induir una lleugera aclimatació al fred que permeti una millor tolerància a les baixes temperatures s'utilitzen tècniques que consisteixen en pretractaments a baixes temperatures prèvies a l'emmagatzematge en fred o, directament, emmagatzematge a temperatures de congelació (al voltant de 0°C) per retardar el metabolisme cel·lular i, així, evitar reaccions associades al desenvolupament de danys per fred (Fan et al., 2018). Tot i així, aquestes tècniques segueixen en etapa d'investigació. A més a més, no són aplicables a tots els cultius i necessiten sistemes de control de temperatura al llarg de tota la cadena de transport (Jayarajan i Sharma, 2021)

L'ús de tractaments de calor (38-60°C) per activar sistemes de tolerància a xocs per temperatura també s'han avaluat. Consisteix en exposar a temperatures elevades els fruits en la post-collita durant un període de temps concret, ja sigui a través de tractaments d'aire o d'aigua, previs a l'emmagatzematge en fred. No obstant, la temperatura de tractament depèn tant del tipus de fruit com de factors associats al seu cultiu i collita (Wang et al., 1994; Woolf et al., 1997). Tanmateix, excedir-se en temps i temperatura dels límits de tolerància del fruit pot fomentar l'aparició de danys per fred, sent contraproductiu per la producció (Ma et al., 2014).

4.1.2 Emmagatzematge en atmosferes controlades

L'emmagatzematge en atmosferes controlades és una estratègia àmpliament implementada al llarg de la cadena de producció, sobretot durant l'empaquetat de

molts productes vegetals. Aquesta tècnica consisteix en mantenir els fruits a unes concentracions controlades de CO₂ i O₂, normalment amb alts nivells de CO₂ i baixos d'O₂ per endarrerir les reaccions aeròbiques associades al metabolisme del fruit i, per tant, l'aparició de danys per fred (Park et al., 2018). Tot i així, les concentracions atmosfèriques òptimes per reduir els danys per fred varia depenent del producte a emmagatzemar i, per tant, aquesta tecnologia no sempre és eficient (Li et al., 2019).

A més, un paràmetre a tenir en compte al llarg de tot l'emmagatzematge en fred és la humitat relativa de l'ambient. Els productes vegetals emmagatzemats transpiren i això suposa la pèrdua d'aigua. Zuo et al. (2021) confirmen que una humitat relativa elevada no només permet reduir els danys per fred sinó que també redueix la transpiració i pèrdua d'aigua tot augmentant la qualitat de la collita quan s'exposa durant llargs períodes a temperatures baixes.

4.1.3 Modificacions en la radiació

S'utilitzen radiacions ultraviolades per reduir els danys per fred en la collita, no obstant, s'ha de tenir en consideració la dosi ja que sinó pot potenciar els efectes de danys per fred i malbaratar el fruit (Ruan et al., 2015; Zhang i Jiang, 2019).

4.1.4 Tractaments exògens (elicitors i fitohormones)

S'ha descrit que la melatonina té efectes pleiotròpics en el metabolisme humà i vegetal i, en aquest últim, la seva funció és exercida des d'estadis inicials de germinació fins a la senescència de la planta. Entre aquests processos, la funció de la melatonina destaca sobretot en respostes contra l'estrès biòtic i abiòtic. Així mateix, les baixes temperatures indueixen la síntesi de melatonina per augmentar la tolerància a l'estrès i, les aplicacions exògenes han demostrat ser eficients per reduir els danys per fred associats a l'estrès per fred. Aquesta tolerància s'assoleix, principalment, reduint l'acumulació de ROS i fomentant la síntesi de poliamines i d'antioxidants (Aghdam et al., 2019; Xu et al., 2019).

Altres elicitors naturals també han demostrat eficiència en la reducció de l'aparició de danys per fred, com ara l'àcid oxàlic (Jing et al., 2018), ions de calci (Li et al., 2020), l'òxid nítric (Singh et al., 2009; Jiménez-Muñoz et al., 2021) i les poliamines com la putrescina, espermina i espermidina (Habibi i Ramezani, 2017).

S'ha descrit que les aplicacions d'etilè, per una banda, redueixen els danys per fred en alguns fruits com les bananes i peres però, per altra banda, es poden agreujar els danys en altres fruits com les prunes (Wei et al., 2019; Candan et al., 2008). Per tant, s'ha generat controvèrsia sobre els efectes d'aquesta hormona en relació amb el desenvolupament de danys. No obstant, l'ús d'1-MCP, un inhibidor de la percepció d'etilè (Pintado et al., 2021), ha demostrat tenir un efecte positiu contra els danys per fred en diversos cultius hortícoles, corroborant els efectes negatius sobre els danys per fred ocasionats per l'etilè en les prunes (Zheng et al., 2021). Tanmateix, degut a les característiques que les descriuen com a naturals, segures i no-tòxiques, l'àcid salicílic, l'àcid jasmònic i els seus derivats han rebut especial atenció per part dels científics i s'han estudiat la influència d'aplicacions exògenes amb la intenció de reduir els danys per fred i incrementar la qualitat post-collita dels fruits (Aghdam i Bodbodak, 2013). A més, suggereixen que aquest desordre podria tenir un punt de partida oxidatiu, on actuarien aquestes hormones inhibint enzims implicats en aquestes reaccions d'oxidació com la polifenol oxidasa i la peroxidasa (Cao et al., 2009).

4.2 Mecanismes fisiològics

Així mateix, els danys per fred poden regular-se millorant la tolerància al fred mitjançant l'acumulació de soluts osmocompatibles a través de via metabòlica de l'arginina i regulació del metabolisme del sucre. L'arginina és un aminoàcid que participa en la síntesi de compostos com la ornitina, la prolina, les poliamines i l'òxid nítric, els quals s'associen a processos de tolerància al fred i reducció de danys ocasionats per aquestes temperatures (Aghdam i Bodbodak, 2013). Així mateix, s'ha establert que la inducció de formació d'aquestes molècules a través de l'aplicació de melatonina és eficient per reduir els danys per fred (Aghdam et al., 2019). Els sucres també ofereixen tolerància a les baixes temperatures (Wang et al., 2016) i la seva acumulació té un impacte directe sobre la reducció de danys per fred, tal i com s'ha descrit en nectarines, préssecs i peres (Zhao et al., 2019; Wang et al., 2019a; Zhao et al., 2021b). La senyalització hormonal desencadenada en resposta a les baixes temperatures també és rellevant en la resposta de tolerància, ja que deriva en l'activació de l'expressió dels gens *C-REPEAT BINDING FACTOR COLD RESPONSE PATHWAY (CBF)* que posteriorment produiran canvis en l'expressió genètica d'altres molècules implicades en el procés. La cascada de gens *CBF* és el primer

mecanisme de resposta a estrès per temperatura en plantes (Ma et al., 2014). Una major expressió dels gens *CBF* en suposen una major tolerància a temperatures baixes i altes, tal i com s'ha descrit en albergínies o pomes entre d'altres (Huang et al., 2019; An et al., 2021). Tot i així, la reducció de danys per fred s'associen, majoritàriament, al manteniment de la integritat de les membranes i a l'augment de la capacitat antioxidant.

4.2.1 Integritat de la membrana

La membrana cel·lular és un orgànul d'extrema importància, no només perquè ofereix estructura, estabilitat i protecció a la planta sinó perquè és una zona metabòlicament molt activa on es concentra un gran nombre de reaccions que es donen a la cèl·lula. Així com la membrana plasmàtica té aquesta rellevància, les membranes plastídiques (incloent les tilacoidals) també són vitals per a la compartimentació de processos bioquímics i per al correcte funcionament de la cèl·lula (Hernández i Cejudo, 2021). A les membranes tilacoidals s'hi donen les reaccions de transport d'electrons i fotofosforilació, on hi intervenen els complexos intercanviadors d'energia (Kobayashi et al., 2017). No obstant, sota condicions adverses la funcionalitat d'aquests complexos es pot veure afectada, tot generant un excés de ROS i oxidant els components principals de les membranes, incloent no només els fosfolípids sinó també els centres de reacció del transport d'electrons fotosintètic (Kong et al., 2020). A més a més, altres membranes que es troben a nivell cel·lular tenen també moltes altres funcions metabòliques essencials, com ara la membrana interna mitocondrial en la respiració. Per aquesta raó, és crucial per reduir els danys per fred garantir l'estabilitat i integritat de la membrana, sobretot en condicions d'estrès a través d'aplicacions de melatonina, 1-MCP, òxid nítric o metil jasmonat (Wang et al., 2015; García-Pastor et al., 2020; Kong et al., 2020; Zhang et al., 2020b).

4.2.2 Sistema antioxidant

Les plantes compten amb sistemes antioxidants de naturalesa enzimàtica i no-enzimàtica. Entre els components enzimàtics destaquen la superòxid dismutasa, catalasa, ascorbat peroxidasa, glutatió peroxidasa, monodehidroascorbat reductasa, dehidroascorbat reductasa i glutatió reductasa, mentre que el sistema antioxidant no-enzimàtic inclou fenols, flavonoides, carotenoides i, com s'ha descrit

anteriorment, diverses vitamines (Zhang et al., 2020a). Una major activitat antioxidant suposa una reducció en la taxa d'oxidació de diversos compostos cel·lulars, entre aquests, els lípids de membrana quan l'òrgan es troba en condicions d'estrès, com l'emmagatzematge a baixes temperatures. Per tant, en conjunt dificulten l'aparició de danys per fred. Diversos estudis confirmen la reducció de danys per fred a través de l'aplicació de tractaments exògens com la melatonina (Kong et al., 2020), 1-MCP (Zhang et al., 2020b) o glicina-betaïna (Yao et al., 2018) i tractaments tèrmics de calor (Endo et al., 20189) que estimulen l'activitat antioxidant, tant enzimàtica com no-enzimàtica a la cèl·lula.


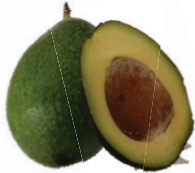
5. Model d'estudi: *Persea americana* Mill. cv. Bacon

L'alvocat (*Persea americana* Mill.) pertany a la família de les Lauraceae i és típic de climes tropicals i subtropicals. El cultiu d'aquest fruit de baia té origen a Mèxic i Centre Amèrica on el seu consum data més enllà dels 8000-7000 AC sent sempre un important component de la dieta (Chen et al., 2009). Englobant l'espècie *Persea americana*, es poden diferenciar tres races que difereixen entre diversos aspectes pertanyents a la floració, la fulla i els fruits; són la mexicana, guatemalenca i antillana (Paull i Duarte, 2010). Malgrat aquest fet, no hi ha barreres d'esterilitat entre les races i, per tant, diverses tècniques d'hibridació al llarg del temps han donat lloc a noves varietats dintre d'aquesta espècie. Generalment, el fruit procedent de races mexicanes o guatemalenques té més èxit comercial. Destaquen en el mercat varietats com 'Hass', 'Lamb Hass', 'Fuerte', 'Pinkerton', 'Bacon', 'Zutano' i 'Ettinger', entre d'altres (Hurtado-Fernández, 2018) però sens dubte, la varietat 'Hass' és la que ha tingut més èxit en el seu cultiu i comerç gràcies a la seva fàcil manipulació al llarg de la cadena de producció i adequació al consumidor per la seva petita mida.

Així com les diferents varietats es diferencien entre orígens, cadascuna també divergeix en aspectes transversals sobre el seu cultiu i desenvolupament com el temps de floració, de formació i producció de fruits, l'extensió del temps de producció i el temps de maduració (Hurtado-Fernández, 2018). Respecte al fruit, la varietat d'alvocat 'Bacon' difereix lleugerament de la varietat 'Hass' no només en la mida, forma, coloració i textura de la pell, sinó també en el temps de producció, essent tots dos complementaris en el mercat (Taula 1). Així mateix, 'Bacon' es

considera un bon candidat per a la pol·linització de 'Hass', donat que difereixen en el tipus de floració, sent 'Hass' de tipus A i 'Bacon' de tipus B i, a més, aquesta etapa de floració es solapa més entre aquestes dues varietats que amb la 'Fuerte', sent aquestes les més comercialitzades (Hormaza, 2003).

Taula 1. Diferències entre les varietats comercials d'alvocats 'Hass' i 'Bacon'.

	'Hass' 	'Bacon' 
Origen	Mèxic x Guatemala	Mèxic x Guatemala
Pes	100-250g	180-350g
Color de la pell	Negre	Verd
Forma	Pera	Oval
Tolerància al fred	Baixa	Alta
Producció	Hivern/primavera	Tardor
Floració	Tipus A	Tipus B
Taxa quallat del fruit	0.07-0.14%	0.03%

Generalment, els alvocats són fruits molt apreciats pels consumidors donades les seves propietats organolèptiques com el gust, aromes i la textura. I una extrema rellevància s'ha atribuït en els últims anys a les propietats nutritives del fruit, entre les que destaquen el contingut d'àcid grassos – majoritàriament àcid oleic (18:1) –, de les vitamines E, C, A i les del grup B, així com de fitoesterols i nivells elevats de fibra (USDA, 2011). Així mateix, els darrers anys se li ha prestat especial atenció a la relació entre el consum d'alvocats i una millora en la salut humana. A la ingesta d'alvocat s'atribueixen propietats beneficioses per la salut molt diverses i moltes es relacionen amb la reducció del risc de patir malalties coronàries i càncer (Dreher i Davenport, 2013). D'aquesta manera, la demanda i la producció mundial d'alvocats està en increment, tot i que el cultiu se segueix focalitzant a Mèxic amb gairebé 2M tones de producció durant l'any 2018 (FAO, 2018). Espanya ocupa la quinzena posició en la producció mundial d'alvocat, el qual és majoritàriament exportat a Europa. De forma similar a Mèxic, la producció a Espanya ha anat creixent els últims

anys així com el valor del fruit i el volum i pes d'exportació. Tot i així, per raons econòmiques donat que el preu de l'alvocat Espanyol és elevat per a la resta d'Europa, les importacions d'alvocats a Espanya encara superen a les exportacions (MAPAMA, 2019). Donada aquesta dinàmica de producció i consum d'alvocat mundial, la indústria agroalimentària intenta avançar cap a un model econòmic circular basat en l'ús dels residus i, per aquesta raó s'investiga sobre pràctiques d'extracció en residus d'alvocats aprofitant els polifenols de l'os i la pell dels fruits per emprar-los en la indústria cosmètica i alimentària (Gómez et al., 2014; Segovia et al., 2016).

L'arbre d'alvocat té una producció molt reduïda i, generalment, sols un 0,1% de les flors es desenvolupen com a fruit. La fructificació depèn de molts factors ambientals com la temperatura, disponibilitat d'aigua i nutrients, o la radiació solar entre altres, que controlaran la resposta hormonal que es donarà per induir aquest procés. El fruit d'alvocat es caracteritza per la seva maduració climatèrica estretament dependent de l'etilè (Seymour i Tucker, 1993). El procés de maduració comercial té lloc un cop el fruit s'ha collit de l'arbre i transcorre molt ràpidament, fet que deriva en la sobre-maduració promovent processos de degradació on es comencen a perdre propietats beneficioses, succeeixen canvis organolèptics poc atractius i es redueix ràpidament la integritat del fruit, esdevenint un fruit molt perible (Hiwasa-Tanase i Ezura, 2014; Iqbal et al., 2017). A més a més, durant la post-collita succeeixen pèrdues en la producció al voltant del 5% i 50% depenent el país, ja sigui per manipulació, danys mecànics, estressos abiòtics o biòtics o per sobre-maduració, fet que evidencia la necessitat d'estratègies de conservació durant aquesta fase en la cadena de producció (Hofman et al., 2002). Així, en alvocats s'implementa l'estratègia de l'emmagatzematge a baixes temperatures per retardar la producció d'etilè i, en conseqüència, la maduració comercial tot allargant la vida útil del fruit. No obstant, aquesta tècnica pot derivar en una pèrdua de les propietats que tant beneficien als consumidors i, fins i tot, donar lloc a una maduració comercial no uniforme o, en alguns casos, desencadenar danys per fred. El fenomen conegut com a danys per fred en alvocats es desencadena quan els fruits són emmagatzemats a baixes temperatures i se sobrepassen els límits de temps (entre 2 i 4 setmanes) o de temperatura per sobre de la qual la varietat del fruit en qüestió ja no pot tolerar, generalment per sota de 5°C (Bill et al., 2014). En el fruit d'alvocat, els danys per

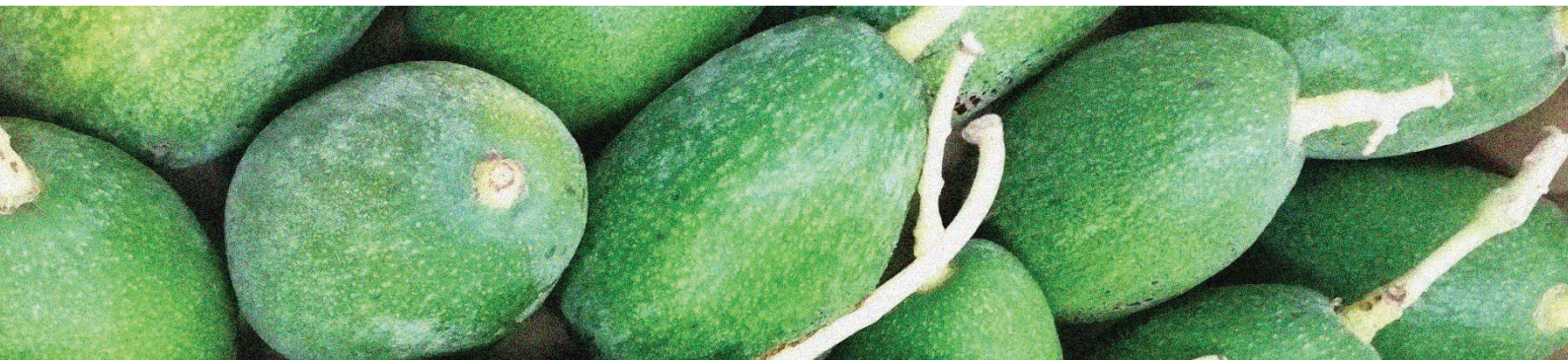
fred poden afectar tant a la pell com al mesocarpi i es distingeix per l'aparició de zones negres en la pell o enfosquiment i decoloració del mesocarpi. Així com la tria d'alvocats amb pell afectada és fàcil, la identificació d'alvocats amb mesocarpi afectat és impossible sense l'ús d'un mètode destructiu i, per tant, acaba generant un gran rebuig en els consumidors creant un impacte negatiu en la comercialització (Razeto et al., 2004).



OBJECTIUS

L'objectiu principal de la tesi és l'estudi de processos fisiològics desencadenats en resposta a l'exposició a baixes temperatures en fruits d'alvocat de la varietat 'Bacon' (*Persea americana* Mill. cv. Bacon) i determinar l'impacte en la qualitat antioxidant, així com proposar estratègies per augmentar la qualitat del fruit quan es conserva durant llargs períodes de temps en cambres fredes. A més a més, com a objectius específics es pretén:

- Identificar el contingut de tococromanols en la varietat comercial d'alvocat 'Bacon'.
- Estudiar l'impacte de l'emmagatzematge en fred a curt i llarg termini sobre l'acumulació de vitamina E.
- Determinar com està regulat el procés de maduració comercial en el fruit i l'efecte del fred sobre el procés.
- Conèixer la resposta hormonal que es desencadena en fruits emmagatzemats a baixes temperatures.
- Quantificar els nivells de vitamina B₆ en diferents varietats d'alvocat i establir tècniques per augmentar-ne considerablement el seu contingut endogen en varietats deficientes o amb continguts baixos.
- Analitzar els possibles efectes d'aplicacions exògenes de PLP per immersió sobre la qualitat i la maduració comercial del fruit.
- Determinar els efectes de tractaments exògens de PLP sobre la qualitat de fruits emmagatzemats a temperatures baixes.
- Avaluar l'eficiència de l'ús de metil jasmonat per esprai sobre fruits d'alvocat en la post-collita per reduir els danys per fred en fruits emmagatzemats a baixes temperatures.
- Determinar el mecanisme de regulació dels danys per fred en el fruit d'alvocat tractat amb metil jasmonat.



INFORME DEL DIRECTOR DE TESI



Barcelona, 5 de gener de 2022

El Dr. Sergi Munné Bosch, com a director de la Tesi Doctoral titulada “**Vida post-collita i millora de la qualitat en fruits climatèrics: estudi en alvocats Bacon (*Persea americana* Mill. cv. Bacon)**” presentada per la doctoranda Celia Vincent Sánchez,

INFORMA sobre el factor d'impacte i la participació de la doctoranda en cadascun dels articles inclosos en la memòria d'aquesta Tesi Doctoral

Capítol 1. Article “**Identification of a new variety of avocados (*Persea americana* Mill. CV. Bacon) with high vitamin E and impact of cold storage on tocochromanols composition**”, publicat per C. Vincent, T. Mesa i S. Munné-Bosch a la revista *Antioxidants*, índex d'impacte (2020) de 6.313 i posicionat en el Q1 en Ciència i Tecnologia dels Aliments. En aquest treball es fa un estudi dels nivells de vitamina E, els quals són analitzats per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i la seva identificació confirmada per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS), en diverses varietats d'alvocats (incloent també diversos orígens en algunes d'aquestes varietats) i la seva resposta a l'emmagatzematge en fred. Es descriu de forma original que la varietat “Bacon” és entre les varietats estudiades la que conté continguts més alts de vitamina E, fins i tot més que la varietat “Hass” que és la varietat més utilitzada comercialment, i es descriuen així mateix els efectes de l'emmagatzematge en fred sobre els continguts d'aquesta vitamina. La doctoranda 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 primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball, així com un excel·lent maneig en els mostrejos i una excel·lent predisposició en la introducció a l'ús de l'HPLC i la LC-MS/MS per a les anàlisis de vitamina E. La doctoranda demostra també una gran capacitat d'anàlisi i interpretació dels resultats.

Capítol 2. Article “**Hormonal interplay in the regulation of fruit ripening and cold acclimation in avocados**”, publicat per C. Vincent, T. Mesa i S. Munné-Bosch a la revista *Journal of Plant Physiology*, índex d'impacte (2020) de 3.549 i posicionat en el Q1 en Biologia Vegetal. En aquest treball s'examinen les variacions en els continguts endògens de fitohormones, amb un èmfasi especial en la possible funció de l'àcid abscísic i dels jasmonats en la regulació de la tolerància al fred en alvocats en post-collita. Cal destacar la importància de l'estudi en quan a la dificultat d'analitzar diferents fitohormones simultàniament per LC-MS/MS en mostres complexes, com ara el mesocarpi de l'alvocat en diferents estadis de maduració. Es descriu per primera vegada la importància de diverses hormones, més enllà de l'etilè, en el



control de la maduració en alvocats, així com el paper de diverses hormones en la tolerància al fred en la vida post-collita de l'alvocat. La doctoranda 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 primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball, així com excel·lents aptituds en l'anàlisi estadístic i interpretació de les dades i elaboració de models de regulació hormonal.

Capítol 3. Article "**Quality determination of avocado fruit immersed in a pyridoxal 5'-phosphate solution**", redactat per C. Vincent i S. Munné-Bosch i acceptat i en revisió a la revista *Journal of Food Composition and Analysis*, índex d'impacte (2020) de 4.556 i posicionat en el Q1 en Ciència i Tecnologia dels Aliments. En aquest treball es descriu, entre altres aspectes, la importància de l'aplicació de vitamina B₆ per immersió per a la millora de la qualitat dels alvocats en post-collita. Cal destacar l'aproximació experimental, amb un caire molt més enfocat en l'àmbit de l'alimentació que en els anteriors capítols, original i amb un alt valor científic, ja que es demostra per primera vegada que l'aplicació de piridoxal 5'-fosfat per immersió pot tenir efectes positius no només per augmentar els baixos nivells de vitamina B₆ en alvocats de la varietat "Bacon" sinó també per augmentar els continguts de tococromanols durant llargs períodes d'emmagatzematge en fred. La doctoranda ha realitzat tots els mostreigs i anàlisis de les mostres, ha realitzat 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 primera autora del treball. La doctoranda demostra una gran capacitat de treball, així com d'anàlisi i interpretació dels resultats en el camp de l'alimentació, a més d'un excel·lent maneig al laboratori.

Capítol 4. Article "**Methyl jasmonate application reduces chilling injury in 'Bacon' avocado (*Persea americana* Mill. cv. Bacon)**", enviat per C. Vincent, C. Mirabent i S. Munné-Bosch a la seva publicació a la revista *Plant Physiology and Biochemistry*, índex d'impacte (2020) de 4.270 i posicionat en el Q1 en Biologia Vegetal. En aquest darrer treball experimental es descriu la importància i mecanismes d'acció de l'aplicació de metil jasmonat per a millorar la qualitat en la vida post-collita dels alvocats emmagatzemats en fred. La doctoranda ha realitzat tots els mostreigs, 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 primera autora del treball. La doctoranda ha demostrat una gran capacitat de treball i ha participat també activament en la redacció de l'article com en els altres capítols de la tesi. La doctoranda demostra un excel·lent grau de maduresa científica.

I, per que així consti als efectes oportuns,

SERGI MUNNE Firmado digitalmente por
BOSCH - DNI SERGI MUNNE BOSCH -
38092418W DNI 38092418W
Fecha: 2022.03.08
20:22:30 +01'00'

Dr. Sergi Munné Bosch



RESULTATS

Capítol 1.

Identificació d'una nova varietat d'alvocat (*Persea americana* Mill. CV. Bacon) amb alt contingut de vitamina E i impacte de l'emmagatzematge en fred en la composició de tococromanols

Chapter 1.

Identification of a new variety of avocados (*Persea americana* Mill. CV. Bacon) with high vitamin E and impact of cold storage on tocopherols composition

Celia Vincent, Tania Mesa i Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals i Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Espanya

Publicat en *Antioxidants* (2020) 9, 403

RESUM

Els tococromanols són un grup de compostos liposolubles que inclouen la vitamina E (tocoferols i tocotrienols) i el plastocromanol-8 i, només un alvocat ja pot contenir fins un 20% de la ingesta diària recomanada. Els anàlisis de HPLC i LC-MS/MS es van realitzar en alvocats de diverses varietats i orígens per identificar i quantificar els tocoferols, tocotrienols i plastocromanol-8 al mesocarpi. Després de la selecció de la varietat amb més vitamina E es va avaluar l'impacte de l'emmagatzematge en fred a curt (4h) i llarg (10d) termini sobre l'acumulació de tococromanols. Els anàlisis revelen que els alvocats 'Bacon' (*Persea americana* Mill. cv. Bacon) van ser els més rics en vitamina E comparat amb altres varietats (inclosa la varietat 'Hass' altament comercialitzada) i que aquests no només van acumular tocoferols (amb 110 µg d'α-tocoferol per g pes sec) sinó també tocotrienols (majoritàriament, en forma de γ-tocotrienol, amb 3 µg per g pes sec) i plastocromanol-8 (4.5 µg per g pes sec). Mentre que l'emmagatzematge en fred a curt termini no va afectar negativament el contingut d'α-tocoferol, va augmentar els nivells de γ-tocoferol, γ-tocotrienol i plastocromanol-8 i va disminuir els de δ-tocotrienol. A més, l'emmagatzematge dels alvocats 'Bacon' durant 10 dies va suposar la reducció del 20% del contingut d'α-tocoferol mentre que el contingut d'altres tocoferols, de tocotrienols i de plastocromanol-8 no va ser afectat. Es conclou que els alvocats 'Bacon' (i) són molt rics en α-tocoferol, (ii) no només contenen tocoferols sinó també tocotrienols i plastocromanol-8, i (iii) el valor nutricional degut a la vitamina E es veu negativament influenciat per l'emmagatzematge en fred durant llargs períodes de temps.



Article

Identification of a New Variety of Avocados (*Persea americana* Mill. CV. Bacon) with High Vitamin E and Impact of Cold Storage on Tocochromanols Composition

Celia Vincent ^{1,2} , Tania Mesa ^{1,2} and Sergi Munne-Bosch ^{1,2,*}

¹ Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain; cevisa96@gmail.com (C.V.); tmesapar7@alumnes.ub.edu (T.M.)

² Research Institute of Nutrition and Food Safety (INSA), University of Barcelona, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

* Correspondence: smunne@ub.edu; Tel.: +34-934-021-480

Received: 21 April 2020; Accepted: 6 May 2020; Published: 9 May 2020



Abstract: (1) Background: Tocochromanols are a group of fat-soluble compounds including vitamin E (tocopherols and tocotrienols) and plastochromanol-8, and just one avocado can contain up to 20% of the required vitamin E daily intake. (2) Methods: HPLC and LC-MS/MS analyses were performed in avocados of various varieties and origin for the identification and quantification of tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8. After selection of the variety with the highest vitamin E content, we evaluated to what extent short- (4 h) and long-term (10 d) cold storage influences the accumulation of tocochromanols. (3) Results: Analyses revealed that “Bacon” avocados (*Persea americana* Mill. cv. Bacon) were the richest in vitamin E compared to other avocado varieties (including the highly commercialized Hass variety), and they not only accumulated tocopherols (with 110 µg of α-tocopherol per g dry matter), but also tocotrienols (mostly in the form of γ-tocotrienol, with 3 µg per g dry matter) and plastochromanol-8 (4.5 µg per g dry matter). While short-term cold shock did not negatively influence α-tocopherol contents, it increased those of γ-tocopherol, γ-tocotrienol, and plastochromanol-8 and decreased those of δ-tocotrienol. Furthermore, storage of Bacon avocados for 10 d led to a 20% decrease in the contents of α-tocopherol, whereas the contents of other tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 were not affected. (4) Conclusions: It is concluded that Bacon avocados (i) are very rich in α-tocopherol, (ii) not only contain tocopherols, but also tocotrienols and plastochromanol-8, and (iii) their nutritional vitamin E value is negatively influenced by long-term cold storage.

Keywords: avocados (*Persea americana* Mill.); low temperatures; plastochromanol-8; tocotrienols; tocopherols; tocochromanols

1. Introduction

Tocochromanols are a group of amphiphilic molecules that includes tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 [1,2]. These are all composed by a polar chromanol head and a highly apolar polyprenyl side chain that provide them with the capacity to exert an antioxidant function in membranes, from cyanobacteria and plants where they are synthesized until a variety of tissues in animals and humans, which incorporate tocochromanols regularly from their daily dietary intake [1,2]. While tocopherols have a saturated phytyl-derived side chain, tocotrienols and plastochromanol-8 tails are more unsaturated since they derive from geranylgeranyl-diphosphate and solanesyl-diphosphate,

respectively [3]. Both tocopherols and tocotrienols include various homologues according to the position and methylation degree in the chromanol head, thus identifying four different molecules for each group (α -, β -, γ - and δ -tocopherols and -tocotrienols). All tocochromanols exert an efficient antioxidant activity by inhibiting the propagation of lipid peroxidation through scavenging lipid peroxy radicals and by preventing it through the (physical) quenching and (chemical) scavenging of singlet oxygen, not only in plant tissues where they are synthesized, but also in humans, although such a role is mainly generally attributed to α -tocopherol in the human body, since this is the major form transported by a specific protein [4].

While α -tocopherol is a universal molecule found in plants, animals and humans, tocotrienols have not been described in all photosynthetic tissues; rather, they accumulate in seeds and fruits of some plant species only [5,6]. Similarly, plastochromanol-8 is not present universally, despite being found in many plant tissues such as seeds, leaves, buds, flowers and fruits of several species [2,7,8]. Interestingly, *in vitro* studies in hydrophobic solvents show a higher antioxidant activity against singlet oxygen for tocotrienols and plastochromanol-8 than for tocopherols, which has been attributed to their more apolar structure of the side chain [2]. New nutraceutical functions have been recently attributed to tocotrienols. For instance, antiangiogenic properties against osteoporosis, atherosclerosis, inflammatory processes and many types of cancer (like colorectal, prostate, lung and pancreas cancer) have been reported, mainly for δ - and γ -tocotrienol forms [9]. Otherwise, despite not being considered a molecule belonging to the vitamin E family, the antioxidant activity of plastochromanol-8 is of great relevance in plants and it may also probably display beneficial properties in humans, although to our knowledge this has not been studied thus far in detail.

Cold storage of fruits is an effective means to prevent food deterioration, particularly in climacteric fruits such as avocados (*Persea americana* Mill), where low temperatures reduce ethylene production and therefore inhibit fruit over-ripening [10,11]. Indeed, introducing avocado fruits in cold chambers is a common technique implemented for preventing their early deterioration, thus increasing fruit marketability. However, the cellular redox balance in fruits may be threatened by the extent of low temperature exposure in storage chambers before fruits reach the consumers. Indeed, low temperature shocks or long-term cold exposure can cause a loss of cellular antioxidant defenses in fruits [12–14]. As a result, oxidative reactions may occur in an uncontrolled manner resulting in sustained oxidative stress and tissue damage [13]. To fight against oxidation reactions at low temperatures, tocopherols, mainly α -tocopherol, have been suggested to be essential for attaining acclimation in plants [3]. Additionally, some studies have reported that tocotrienols may be as effective as tocopherols in protecting leaves from photooxidation processes under low temperatures [1]. Although several studies have been performed in leaves of *Arabidopsis* and other model plant species to link tocopherol accumulation and low temperature acclimation [15–18], very few studies have investigated thus far the influence of cold temperature storage on the accumulation of tocochromanols in fruits; except for an increase in tocopherols upon 3 d of storage at cold temperatures in sweet cherries, which is a fruit with low concentrations of fatty acids and vitamin E [19] and a maintenance of constant α -tocopherol contents in oil of Fuerte avocados upon exposure to 5 °C for three weeks [20]. To our knowledge, the effects of low temperatures on the accumulation of tocochromanols in other avocado varieties, and of tocotrienols and plastochromanol-8 in fruits in general have not been investigated thus far.

Avocados (*Persea americana* Mill) are highly valuable fruits with increasing interest for consumers thanks to their nutraceutical properties due to antioxidant contents, such as ascorbate (vitamin C, 8.8 mg/100 g) and B-type vitamins (such as vitamin B₆, 0.29 mg/100 g), fiber (6.8 g/100 g), phytosterols (83.1 mg/100 g), monounsaturated fatty acids (9.8 g/100 g) and vitamin E (2.36 mg/100 g) [21]. These are originally from Mexico where tropical environmental conditions permitted hybridization techniques that have led to the wide number of varieties currently found worldwide [22]. Nevertheless, the main producing countries are still those with warm climates which export a huge percentage of their production to other continents [23]. Hass is the most widely produced and commercialized avocado variety worldwide, while Bacon, a hybrid variety originally cultivated in 1954 by James Bacon in

California, occupies the third position (after Hass and Fuerte) in terms of agricultural production in Spain, the main avocado producer in Europe [24]. Here, avocado fruits (*Persea americana* Mill) were investigated aiming to determine (i) the amounts and composition of tocopherols in the edible part of various avocado varieties and (ii) how cold storage in the short and long term influences tocopherol contents in Bacon avocados. This study shows to what extent cold storage implemented along the supply chain can negatively influence the nutritional quality of avocados in terms of vitamin E accumulation.

2. Material and Methods

2.1. Plant Material and Samplings

Avocados (*Persea americana* Mill.), either collected at commercial harvest maturity in the field or purchased from supermarkets in a non-ripe stage (depending on the experiments, see details below), were immediately brought to the laboratory at the University of Barcelona (Barcelona, NE Spain) and used for assays. In all cases, fruits were selected for homogeneity according to their size and lack of pathogen symptoms. Three independent experiments were performed.

For the identification of tocopherols in various avocado varieties and origins (experiment 1), fruits were purchased in local supermarkets or markets, as follows. Non-ripe Hass avocados originated from Brazil, Perú and Spain, and identified as such in their label, were obtained from a supermarket in Barcelona (NE Spain) and immediately transported at room temperature by car to the laboratory. Non-ripe Hass and Fuerte avocados from Chile and Govín avocados from Cuba were obtained from local markets and transported by plane and car to the laboratory. Finally, Bacon avocados were obtained from a commercial orchard in Málaga (south Spain) at a mature stage and brought to the laboratory after 12 h of transportation at 8–10 °C. All fruits were then exposed to room temperature in the laboratory at the University of Barcelona and when firmness attained levels of 3N for all fruits from all varieties and origins, then the mesocarp tissue of four fruits per variety and origin was sampled and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until analyses. With these samples, tocopherols were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) and identification of compounds confirmed by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry in tandem (LC-ESI-MS/MS).

The influence of short-term, cold shock exposure on tocopherol accumulation in Bacon avocados (experiment 2) was examined by performing samplings just before and after 4 h of cold shock of fruits at 4 °C in a cold storage chamber (Frimatic, S.A., Barcelona, Spain). Samples from 18 randomly selected fruits at each time point including 0 h and 4 h were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until analyses. With these samples, tocopherols were quantified by HPLC while the extent of lipid peroxidation and changes in photosynthetic pigments were estimated spectrophotometrically, as described below.

The influence of long-term exposure to low temperatures on tocopherol accumulation in Bacon avocados (experiment 3) was examined by performing samplings just before and during exposure for a period of 10 d of cold storage of fruits at 4 °C using the same cold chamber (Frimatic, S.A.). Mesocarp samples from 18 randomly selected fruits at times including 0 d, 2 d, 5 d, 7 d and 10 d of low temperature exposure were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until analyses. With these samples, tocopherols were quantified by HPLC while the extent of lipid peroxidation and changes in photosynthetic pigments were estimated spectrophotometrically, as described below.

2.2. Tocopherol Analyses

The quantification of the different tocopherol forms, including tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8, was performed as described previously [25] with some modifications. One-hundred mg of avocado (mesocarp) sample was extracted with 1 mL of methanol containing 0.01% (*w/v*) butyl-hydroxytoluene (BHT) and 5 ppm (*w/v*) of tocol as an internal standard. Extraction was performed

using 30 min of ultrasonication (Bransonic ultrasonic bath 2800, Emerson Industrial, Danbury, CT, USA) just after vortexing for 20 s. Then, samples were centrifuged at 600 g during 10 min at 4 °C to subsequently recover supernatants with a hydrophobic PTFE filter 0.22 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Tocochromanols were separated by HPLC at room temperature using an Inertsil 100A column (5 µm, 30 × 250 mm, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan). Quantification was performed using a Jasco fluorescence detector (FP-1520, Tokyo, Japan) and a calibration curve established with each of the tocochromanols analyzed and corrected with the tocol recovery, which was always above 97%.

The identification of tocochromanols was confirmed by using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry in tandem (LC-ESI-MS/MS) as described previously [26]. Methanolic extracts were obtained as described before for the HPLC analyses and used here for the identification of tocochromanols by LC-ESI-MS/MS. Tocochromanol separation was performed with an Inertsil 100A column (5 µm, 30 × 250 mm, GL Sciences Inc. (Tokyo, Japan), and an isocratic flow of hexane:dioxane (95.5:4.5 *v/v*) mobile phase. The MS acquisition was performed using negative ionization between *m/z* 100 and 650, with the Turbo Ionspray source. In addition, quadrupole time-of-flight (QqToF) mass spectrometry was used to obtain product ion information. The MS parameters were: ion spray voltage, −4200; declustering potential (DP), −40; focusing potential (FP), −150; declustering potential two (DP2), −10; ion release delay (IRD), 6 V; ion release width (IRW), 5 ms; nebulizer gas, 50 (arbitrary units); curtain gas, 60 (arbitrary units), and auxiliary gas N₂, 6000 cm³ min^{−1} heated at 500 °C.

2.3. Lipid Peroxidation Assays

To determine the extent of lipid peroxidation, primary (lipid hydroperoxide) and secondary (malondialdehyde, MDA) lipid peroxidation products were analyzed, as follows. For lipid hydroperoxides analyses, frozen samples (100 mg) were repeatedly (three times) extracted with 1 mL methanol + 0.01% BHT (*w/v*) at 4 °C using 30 min of ultrasonication (Bransonic ultrasonic bath 2800). After centrifugation, supernatants were collected, combined and used for analyses using the Fox-2 reagent (consisting in a solution of 90% methanol (*v/v*) containing 25 mM sulfuric acid, 4 mM butylhydroxyltoluene (BHT), 250 µM iron sulfate ammonium (II) and 10 µM xylenol orange) as described in Bou et al. [27]. Absorbances were measured at 560 nm and 800 nm. A calibration curve using hydrogen peroxide 37% (*v/v*) was used for quantification.

For estimation of the MDA content, the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay, which considers the possible influence of interfering compounds, was used [28]. In short, 100 mg of sample was extracted with 3 mL of ethanol 80% (*v/v*) containing 0.01% (*w/v*) BHT, vortexed for 20 s and exposed to ultrasonication for 15 min (Bransonic ultrasonic bath 2800). After centrifuging at room temperature for 13 min at 600 g, the supernatant was recovered, and the pellet re-extracted twice using the same procedure. Then, two tubes were used: (a) − TBA, with 1 mL extract + 1 mL 20% trichloroacetic acid (*w/v*) with 0.01% BHT (*w/v*) and (b) + TBA, with 1 mL extract + 1 mL 20% trichloroacetic acid (*w/v*), 0.01% BHT (*w/v*) and 0.65% thiobarbituric acid (*w/v*). Tubes were incubated for 25 min at 95 °C and then the reaction was stopped by maintaining them at 4 °C for 10 min. After centrifugation at 600 g at room temperature for 5 min, MDA content in samples were analyzed by spectrophotometry at 440, 532 and 600 nm and quantified using the equations developed by Hodges et al. [28].

2.4. Chlorophyll Content

To determine total chlorophyll content, samples (100 mg) were extracted in 1 mL of methanol + 0.01% BHT as explained before, using vortex and ultrasonication for 30 min at 4 °C. Supernatants were collected after centrifugation for 10 min at 600 g and 4 °C. Chlorophylls were measured spectrophotometrically reading absorbances at 653, 666 and 750 nm and measuring chlorophyll content as described [29].

2.5. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed by one-way ANOVA and Tukey posthoc tests were used for multiple comparisons among time (IBS SPSS Statistics 19; SPSS Inc., Chicago, IL., USA). Differences were considered significant when p values were under the significance level $\alpha = 0.05$.

3. Results

3.1. Identification of Tocochromanols in Various Avocado Varieties

In order to determine the presence and amount of tocochromanols in the mesocarp (edible part of the fruit) of different avocado varieties, HPLC and LC-ESI MS/MS analyses were performed. Among the various varieties and origins tested, Bacon avocados from Spain showed the largest amount of vitamin E (Table 1A). Bacon avocados contained 2.4 mg α -tocopherol per 100 g of edible fruit, which coincided with a very low quantity of its precursor γ -tocopherol in the tissue (Table 1A). Bacon was the variety with the highest tocochromanol content among all studied varieties. By contrast, Govín from Cuba, Hass from Brazil and Hass from Perú were the avocados showing the lowest amounts of total tocochromanols.

Table 1. Contents of tocochromanols in different avocado varieties, including various origins.

(A) Tocochromanol ($\mu\text{g}/100 \text{ g FW}$)							
	α -T	β -T	γ -T	γ -TT	δ -TT	PC-8	Total TCs
Bacon Spain	2371 \pm 148 ^c	140.3 \pm 22.7 ^d	50.3 \pm 11.2	42.2 \pm 3.3	47.7 \pm 5.7	191 \pm 23 ^b	2848 \pm 181 ^c
Fuerte Chile	2190 \pm 52 ^{bc}	79.8 \pm 4.9 ^{bcd}	29.9 \pm 4.5	32.1 \pm 5.0	ND	192 \pm 17 ^b	2524 \pm 53 ^{abc}
Hass Chile	2068 \pm 48 ^{bc}	88.4 \pm 7.6 ^{cd}	51.4 \pm 5.1	27.4 \pm 3.8	ND	300 \pm 18 ^{cd}	2535 \pm 61 ^{bc}
Govín Cuba	2004 \pm 129 ^{bc}	ND	25.5 \pm 5.5	29.6 \pm 1.8	ND	93 \pm 4 ^a	2152 \pm 133 ^a
Hass Spain	1997 \pm 211 ^{bc}	57.9 \pm 8.2 ^{abc}	50.5 \pm 4.3	39.2 \pm 3.7	ND	284 \pm 21 ^c	2434 \pm 296 ^{abc}
Hass Perú	1592 \pm 225 ^b	14.1 \pm 8.2 ^a	36.4 \pm 3.4	32.1 \pm 11.5	ND	378 \pm 22 ^d	2062 \pm 224 ^{ab}
Hass Brazil	816 \pm 209 ^a	18.0 \pm 6.8 ^{ab}	31.8 \pm 4.7	42.9 \pm 6.3	ND	226 \pm 12 ^b	1138 \pm 217 ^{ab}
(B) Tocochromanol ($\mu\text{g}/\text{g DW}$)							
	α -T	β -T	γ -T	γ -TT	δ -TT	PC-8	Total TCs
Bacon Spain	127.3 \pm 10.7 ^c	7.5 \pm 1.2 ^b	2.7 \pm 0.6 ^b	2.2 \pm 0.1 ^{bc}	2.5 \pm 0.3	10.3 \pm 1.4 ^b	153 \pm 13 ^b
Fuerte Chile	47.3 \pm 4.8 ^{ab}	1.7 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.1 ^a	ND	4.2 \pm 0.7 ^a	54 \pm 5 ^a
Hass Chile	60.4 \pm 1.6 ^{ab}	2.6 \pm 0.3 ^a	1.5 \pm 0.2 ^{ab}	0.8 \pm 0.1 ^a	ND	8.8 \pm 0.6 ^{ab}	74 \pm 2 ^a
Govín Cuba	174.2 \pm 16.2 ^d	ND	2.2 \pm 0.4 ^a	2.6 \pm 0.2 ^c	ND	8.1 \pm 0.8 ^{ab}	187 \pm 17 ^a
Hass Spain	62.3 \pm 5.2 ^{ab}	1.8 \pm 0.2 ^a	1.6 \pm 0.05 ^a	1.2 \pm 0.09 ^{ab}	ND	9.0 \pm 1.0 ^{ab}	76 \pm 5 ^a
Hass Perú	78.4 \pm 9.8 ^b	0.7 \pm 0.4 ^a	1.8 \pm 0.08 ^a	1.7 \pm 0.6 ^{abc}	ND	18.7 \pm 0.6 ^c	102 \pm 10 ^a
Hass Brazil	33.5 \pm 8.4 ^a	0.7 \pm 0.3 ^a	1.3 \pm 0.2 ^a	1.8 \pm 0.4 ^{abc}	ND	9.4 \pm 0.5 ^b	47 \pm 8 ^a

(A) Per 100 g fresh weight and (B) per g dry weight (DW). Data, which were obtained using the mesocarp of fruits in their optimum stage of ripening, show the mean of $n = 4$ fruits. Lower case letters (a–d) indicate differences between avocado varieties when $p < 0.05$. Trace amounts of δ -tocopherol and α -tocotrienol could not be properly quantified and are not shown here. T, tocopherol; TT, tocotrienol; PC-8, plastochochromanol-8; ND, not detected.

A comparison of four origins of Hass avocados (Chile, Spain, Perú and Brazil) revealed that the origin had a very strong effect on tocochromanol contents, including α -tocopherol (Table 1). All avocado varieties behaved similarly to Bacon avocados from Spain in terms of accumulating most of the tocochromanols in the form of α -tocopherol but both Bacon from Spain and Govín from Cuba presented a larger amount of α -tocopherol than the highly commercialized Hass variety irrespective of

its origin. Furthermore, although plastochochromanol-8 was present in all avocado varieties, its contents were higher in Hass varieties (irrespective of the origin) than in Bacon and Govín (from Spain and Cuba, respectively). Notably, δ -tocotrienol seemed to be exclusively present in Bacon (Table 1A). Results differed slightly when comparing the vitamin E amounts per unit of dry weight in different varieties; Bacon occupied the second position in terms of vitamin E accumulation, just after Govín, as the contents of α -tocopherol were higher in these two varieties than in Hass or Fuerte (Table 1B). Moreover, total tocochromanol contents were also higher in Bacon when compared to the other highly commercialized varieties, except for Govín which occupied the first position just before Bacon variety (Table 1B).

The major tocochromanol present in the mesocarp (edible tissue) of Bacon avocados was α -tocopherol (with an 87.8%), as clearly observed in the HPLC chromatogram (Figure 1A), followed by plastrochochromanol-8, β - and γ -tocopherols, and δ - and γ -tocotrienols (Table 1A). HPLC identification by retention time was confirmed by LC-ESI MS/MS using the corresponding authentic standards, which showed exactly the same fragmentation patterns as the corresponding peaks in the samples (Figure 1). This tocochromanol profile in Bacon avocados, enriched in the α -tocopherol form and with the presence of δ -tocotrienol, is different from that found for the Hass variety (Table 1, see also [30,31]).

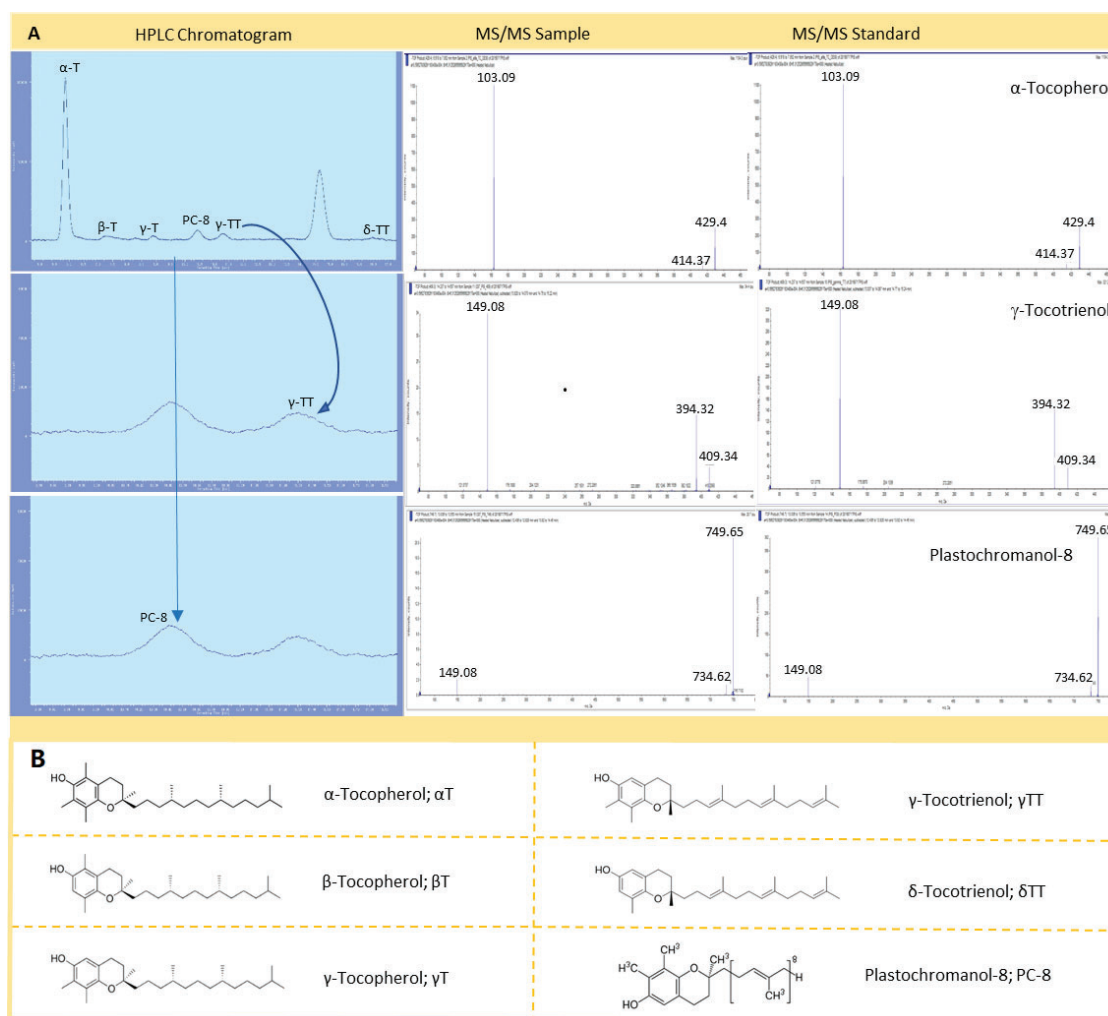


Figure 1. (A): Separation (by HPLC, left) and identification (by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry in tandem [LC-ESI-MS/MS], center and right) of tocochromanols in Bacon avocados. (B): Chemical formula of tocochromanols identified in Bacon avocados.

3.2. Cold-induced Changes in Tocochromanol Composition in Bacon Avocados

After a low temperature shock for 4 h, the contents of the major tocochromanol present in the mesocarp of Bacon avocados, α -tocopherol, were not altered (Figure 2). The same was observed for β -tocopherol, but not for the other tocochromanols. While the contents of plastochromanol-8, γ -tocopherol and γ -tocotrienol increased, those of δ -tocotrienol decreased, with the latter showing a reduction by 60% under cold treatment (Figure 2). This cold-induced shift in the tocochromanol composition was accompanied by an increase in the extent of lipid peroxidation, as indicated by 60% increases in lipid hydroperoxides and malondialdehyde contents, while chlorophyll levels and the chlorophyll a/b ratio remained unaltered (Figure 3).

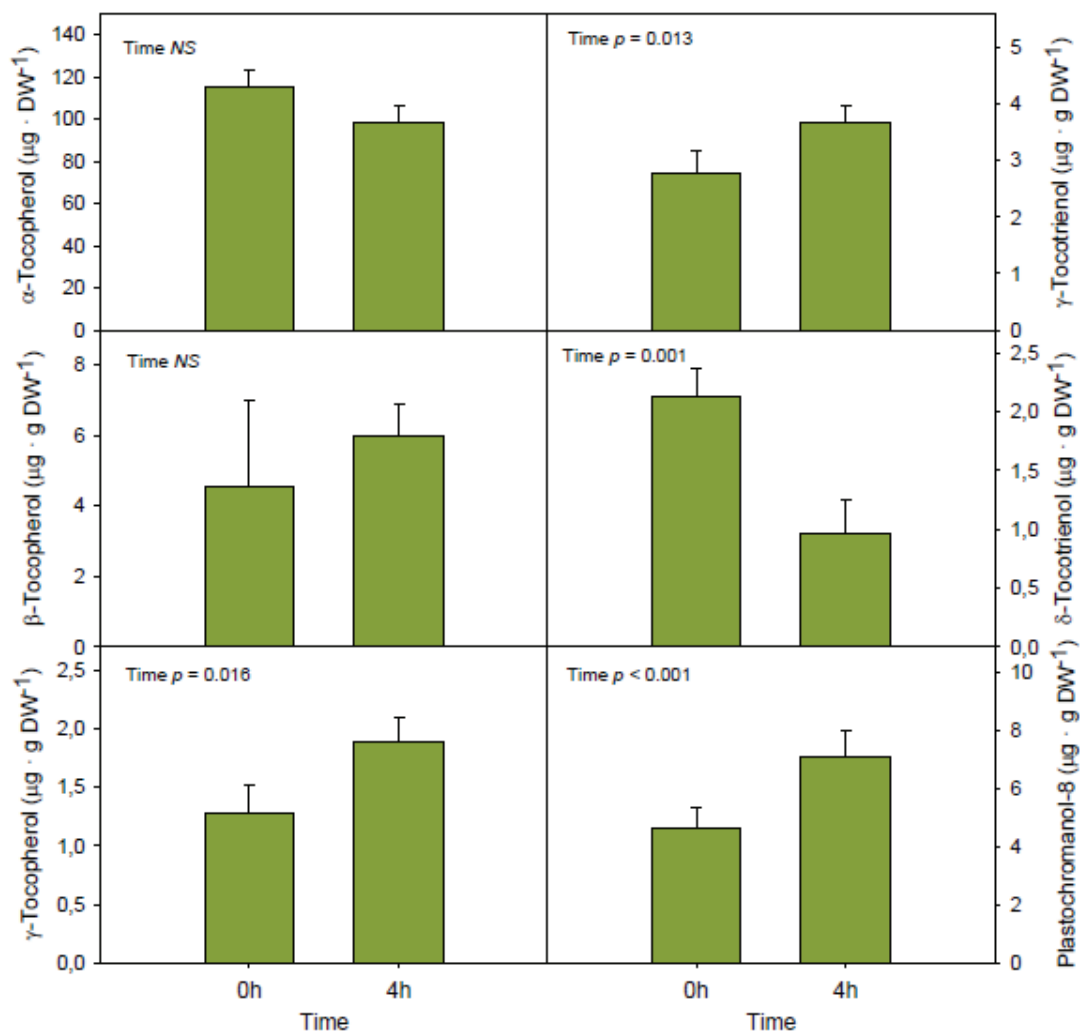


Figure 2. Influence of short-term (4 h) exposure of Bacon avocados to cold temperatures (4 °C) in the contents of tocochromanols. Data represent the mean \pm SE of $n = 18$ fruits. Differences were considered significant when $p < 0.05$. DW, dry weight.

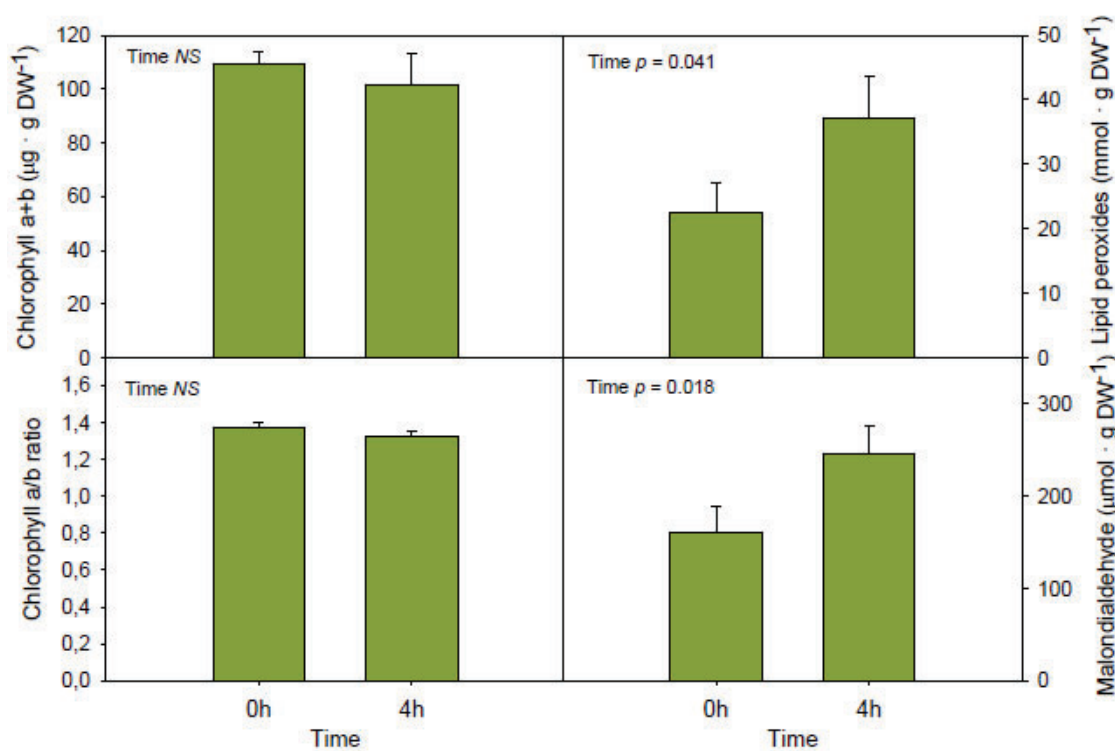


Figure 3. Influence of short-term (4 h) exposure of Bacon avocados to cold temperatures (4 °C) in the contents of chlorophylls, chlorophyll a/b ratio and the extent of lipid peroxidation (estimated as the contents of lipid hydroperoxides and malondialdehyde, as indicators of primary and secondary lipid peroxidation, respectively). Data represent the mean \pm SE of $n = 18$ fruits. Differences were considered significant when $p < 0.05$. DW, dry weight.

Total tocopherol contents showed a decrease by 16% after 10 d of storage at low temperatures, which was mostly due to a significant decrease in tocopherols but not tocotrienols (Figure 4). Part of this loss was related to the decrease in the major tocopherol form in Bacon avocados, α -tocopherol, which decreased by 20% after 10 d of cold storage (Figure 4). When α -tocopherol contents were expressed on a fresh weight basis (either per 100 g FW, per fruit, half fruit or serving), a decrease in its contents was also observed, thus offering a lower amount (by 15%) of α -tocopherol per amount of fruit consumed (Figure 4). This reduction in vitamin E contents occurred progressively over time, as revealed by the time-course evolution of α -tocopherol contents (Figure S1), but most particularly between 5 d and 10 d of cold storage. In contrast to short-term exposure to cold temperature, the other tocopherol forms were not clearly affected by long-term cold storage, although γ -tocopherol and δ -tocotrienol showed slight variations over time (Figure S1). Reductions of α -tocopherol during long-term storage at low temperatures was coincident with a 3.4-fold increase in malondialdehyde contents after 10 d of cold storage (Figure S2).

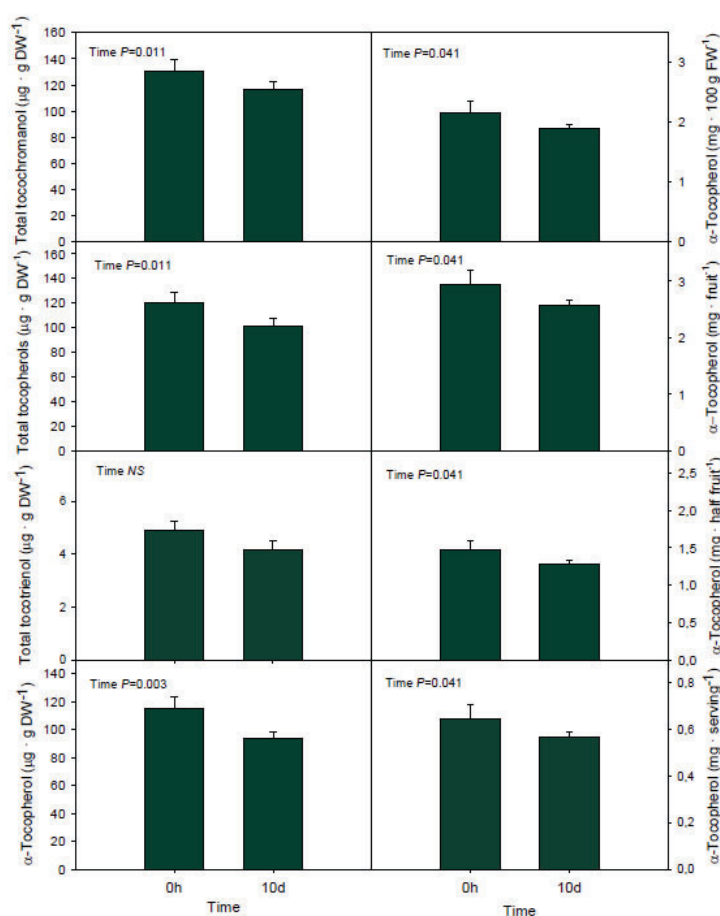


Figure 4. Influence of long-term (10 d) storage of Bacon avocados at cold temperatures (4 °C) in the contents of total tocochromanols, tocopherols, tocotrienols and α -tocopherol. Contents of α -tocopherol are also shown in mg per 100 g of mesocarp in fresh weight (FW), per one fruit (136 g FW), per a half (68 g FW) and per serving according to the Nutrition Labelling and Education Act (NLEA; corresponding to 30 g FW). Data represent the mean \pm standard error of $n = 18$ fruits. Differences were considered significant when $p < 0.05$. DW, dry weight.

4. Discussion

4.1. Bacon is a Variety of Avocados with High Tocochromanol Contents

Among the avocado varieties examined in our study, Bacon from Spain was the one showing the highest vitamin E content. All varieties showed a similar tocochromanol composition, so that the major tocochromanol was α -tocopherol, except Bacon, which also accumulated some amounts of δ -tocotrienol. Hence, tocochromanols composition was in general enriched in α -tocopherol, with a diminished accumulation of other tocopherols and tocotrienols, with the overall most notable exception of γ -tocochromanols in all varieties and additionally of δ -tocotrienol in Bacon. Varietal differences might be associated not only with the geographical origin of the fruit, as shown in our results, but also with the highly heterozygous genetic origin of avocado races. *Persea americana* includes *P. americana* var. *drymifolia* (commonly known as Mexican race), var. *guatemalensis* (known as Guatemalan race) and var. *americana* (or West Indian race). While Bacon is obtained from the hybridization of Mexican x Guatemalan races, Hass variety is generally reported to have a pure Guatemalan origin [32]. However, breeding strategies, cross- and self-pollination techniques, different strategies of cultivation and the posterior selection according to farmer preferences, like high yield, fruit quality and long shelf life, usually give rise to quite heterogenic crops in the same variety, which might lead to the observed

differences in the Hass avocados from different origins studied here that showed notable differences in the accumulation of tocochromanols.

Plastochromanol-8 accumulation in fruits may be of particular relevance since this is also a powerful antioxidant, even showing higher antioxidant activity than α -tocopherol in hydrophobic environments due to its more highly unsaturated prenyl chain [2]. Plastochromanol-8 was found in mesocarp tissue of avocado fruit at relatively low amounts compared to α -tocopherol, but some differences between cultivars were observed. In this case, Hass was the variety with the greatest amount of this compound compared to the other studied varieties, including Bacon. Furthermore, we reported here on the accumulation of tocotrienols in avocados, which contrasts with a recent report [8] showing the accumulation of plastochromanol-8 but not of tocotrienols in Hass avocado. Our study shows that tocotrienols may accumulate in avocado fruits, in particular in some varieties such as Bacon. Notably, δ -tocotrienol was only found in Bacon among all studied varieties. Beneficial properties for humans have recently been attributed to this compound, in particular to help in the prevention of the development of various cancers, including breast, colorectal, lung and many other types of cancer, apart from providing anticholesterolemic and antidiabetic benefits [33–35]. Although the contents of δ - and γ -tocotrienols were relatively low compared to that of α -tocopherol in Bacon avocados, these compounds might, to some extent, exert an additional beneficial response in the human body, an aspect that deserves further investigations.

4.2. Effects of Short and Long-Term Storage on Tocochromanol Contents

While a low temperature shock for 4 h did not alter α -tocopherol contents in the mesocarp of Bacon avocados, long-term storage for 10 d led to significant decreases in vitamin E contents. In contrast to unaltered contents of tocopherols after 4 h of low temperature exposure, the contents of plastochromanol-8, γ -tocopherol and γ -tocotrienol increased, and those of δ -tocotrienol decreased, the latter showing a reduction by 60% under cold treatment. Therefore, cold shock led to significant reductions in the levels of δ -tocotrienol and the cold-induced shift in the tocochromanol composition was accompanied by an increase in the extent of lipid peroxidation, as indicated by 60% increases in lipid hydroperoxides and malondialdehyde contents. Interestingly, chlorophyll contents were unaltered during the same period and Bacon avocados stored for 5d did not show alterations in the extent of lipid peroxidation, as indicated by the same measurements. This suggests that the cold-induced shift in tocochromanol composition was mainly due to metabolic alterations that resulted in transient lipid peroxidation, but this was not accompanied with a quality loss. In contrast, α -tocopherol contents decreased during long-term storage of Bacon avocado fruits at low temperatures, a decrease that was accompanied by an increase in the extent of lipid peroxidation, which was reflected by an increase in malondialdehyde. This result contrasts with a previous study [20] showing that α -tocopherol in oil obtained from Fuerte avocados keeps stable after 3 weeks of storage at 5 °C. This difference may be due to different reasons, including not only the study of a different variety (Fuerte in [20] and Bacon in our study), but also to a higher stability of α -tocopherol in oil at 5 °C [20] than in entire fruits at 4 °C in our study. Unfortunately, little research has been performed thus far to evaluate how cold storage temperature influences tocochromanol composition in vitamin E-rich fruits and further studies are required to better understand the causes of vitamin E instability in avocado fruits and oils.

4.3. Balance between Storage and Nutritional Value

According to the Nutritional Labelling and Education Act (NLEA) and the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), the serving of avocado is recommended to be of 30 g or half of an avocado, respectively, which corresponds to an intake of 0.59 mg and 1.34 mg of α -tocopherol, respectively. Interestingly, when the nutritional value in terms of vitamin E was measured over time of cold storage, a decrease in tocochromanols occurred, which was mostly attributed to a progressive drop in α -tocopherol content, so that the daily vitamin E intake is significantly lower if avocados are stored for 10 d at 4 °C. In contrast, other tocochromanols were not affected. According to the results

presented in our study, avocados stored for 10 d at low temperatures start to suffer oxidation processes, which might be related to the stress situation experienced by the mesocarp due to cold temperatures, which can lead to oxidative damage. Indeed, α -tocopherol levels dropped up to 20% after 10 d of cold storage, and this loss of α -tocopherol contents may slightly contribute to a lesser intake and absorption of vitamin E in the human diet under the levels of reference [36]. Furthermore, the loss in detoxifying oxygen radicals function by a loss of antioxidants such as vitamin E due to cold storage of fruits for long periods may contribute to a higher risk of suffering from cardiovascular diseases like atherosclerosis, cancer and cataracts, among other diseases related to degenerative processes [37–40].

5. Conclusions

In conclusion, Bacon has been shown to be the variety with very high tocochromanol contents relative to other studied varieties, presenting values greater than those of the highly commercialized Hass variety. Furthermore, Bacon variety marketing should be fostered not only because of the high amounts of vitamin E but also because it was the only variety showing δ -tocotrienol, a compound that might have additional beneficial effects. Moreover, according to procedures implemented along the supply chain which consist of introducing fruits into cold chambers, our study showed that 10 d might be the threshold where cold stress is starting to induce losses in vitamin E, hence decreasing nutritional value and fruit quality.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3921/9/5/403/s1>, Figure S1: Variations in the contents of tocochromanols during long-term (10 d) storage of “Bacon” avocados at cold temperatures (4 °C), Figure S2: Variations in the contents of chlorophylls, chlorophyll a/b ratio and the extent of lipid peroxidation (estimated as the contents of lipid hydroperoxides and malondialdehyde, as indicators of primary and secondary lipid peroxidation, respectively) during long-term (10 d) storage of “Bacon” avocados at cold temperatures (4 °C).

Author Contributions: Conceptualization, C.V. and S.M.-B.; methodology, C.V. and T.M.; software, C.V.; validation, C.V., T.M. and S.M.-B.; formal analysis, C.V.; investigation, C.V. and T.M.; resources, S.M.-B.; data curation, C.V.; writing—original draft preparation, C.V. and S.M.-B.; writing—review and editing, C.V., T.M. and S.M.-B.; visualization, C.V.; supervision, S.M.-B.; project administration, S.M.-B.; funding acquisition, S.M.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Generalitat de Catalunya, grant number 2017 SGR 980.

Acknowledgments: We are very grateful to Paula Muñoz and Maren Müller for their help in the quantification and identification of tocochromanols, respectively, to Camila Ribalta for providing the avocados from Chile, and to Marina Pérez and Andrea Casadesús for their help in samplings.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Falk, J.; Munné-Bosch, S. Tocochromanol functions in plants: Antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 1549–1566. [[CrossRef](#)]
2. Kruk, J.; Szymanska, R.; Cela, J.; Munné-Bosch, S. Plastochromanol-8: Fifty years of research. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 9–16. [[CrossRef](#)]
3. Menné-Saffrané, L.; DellaPena, D. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, *48*, 301–309. [[CrossRef](#)]
4. Kono, N.; Ohto, U.; Hiramatsu, T.; Urabe, M.; Uchida, Y.; Satow, Y.; Arai, H. Impaired a-TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science* **2013**, *340*, 1106–1110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Müller, M.; Cela, J.; Asensi-Fabado, M.; Munné-Bosch, S. Tocotrienols in plants: Occurrence, Biosynthesis and Functions. In *Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols*, 2nd ed.; Tan, B., Ed.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2013.
6. Chun, J.; Lee, J.; Ye, L.; Exler, J.; Eitenmiller, R.R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 196–204. [[CrossRef](#)]
7. Georgiadou, E.C.; Goulas, V.; Ntourou, T.; Manganaris, G.A.; Kalaitzis, P.; Fotopoulos, V. Regulation of on-tree vitamin E biosynthesis in olive fruit during successive growing years: The impact of fruit development and environmental cues. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Trela, A.; Szymanska, R. Less widespread plant oils as a good source of vitamin E. *Food Chem.* **2019**, *296*, 160–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tan, B.; Watson, R.R.; Preedy, V.R. *Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols*; CRC Press Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2013.
10. Kassim, A.; Workneh, T.S.; Bezuidenhout, C.N. A review on postharvest handling of avocado fruit. *Afr. J. Agric. Res.* **2013**, *8*, 2385–2402. [[CrossRef](#)]
11. Arpaia, M.L.; Collin, S.; Sievert, J.; Obenland, D. ‘Hass’ avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. *Postharvest Biol. Technol.* **2018**, *140*, 76–84. [[CrossRef](#)]
12. Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 179–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Foyer, C.H.; Noctor, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: Signalling, acclimation, and practical implications. *Antiox. Redox Signal.* **2009**, *11*, 861–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Das, K.; Roychoudhury, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* **2014**, *2*, 53. [[CrossRef](#)]
15. Leipner, J.; Fracheboud, Y.; Stamp, P. Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. *Environ. Exp. Bot.* **1999**, *42*, 129–139. [[CrossRef](#)]
16. Maeda, H.; Song, W.; Sage, T.L.; DellaPenna, L. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem leading in Arabidopsis. *Plant Cell* **2006**, *18*, 1710–1732. [[CrossRef](#)]
17. Gabruk, M.; Habina, I.; Kruk, J.; Dluzewska, J.; Szymanska, R. Natural variation in tocopherols content in *Arabidopsis thaliana* accessions – the effect of temperature and light intensity. *Physiol. Plant.* **2016**, *157*, 147–160. [[CrossRef](#)]
18. Xiang, N.; Li, C.; Li, G.; Yu, Y.; Hu, J.; Guo, X. Comparative evaluation on vitamin E and carotenoid accumulation in sweet corn (*Zea mays* L.) seedlings under temperature stress. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 9772–9781. [[CrossRef](#)]
19. Tijero, V.; Teribia, N.; Muñoz, P.; Munné-Bosch, S. Implication of abscisic acid on ripening and quality in sweet cherries: Differential effects during pre- and post-harvest. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 602. [[CrossRef](#)]
20. Prabath Pathinara, U.A.; Sekozawa, Y.; Sugaya, S.; Gemma, H. Changes in lipid oxidation stability and antioxidant properties of avocado in response to 1-MCP and low oxygen treatment under low-temperature storage. *Int. Food Res. J.* **2013**, *20*, 1065–1075.
21. USDA (US Department of Agriculture). Avocado, almond, pistachio and walnut composition. In *Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24*; US Department of Agriculture: Washington, DC, USA, 2011.
22. Yahia, E.M. Avocado. In *Crop Post-Harvest: Science and Technology*, 1st ed.; Rees, D., Ed.; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK, 2013.
23. FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture Database. 2014. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on 20 February 2020).
24. Diaz-Robledo, J. An update of the spanish avocado industry. In *Proceedings of Second World Avocado Congress*; Lovatt, C.J., Ed.; University of California: Riverside, CA, USA, 1991; pp. 647–651.
25. Amaral, J.S.; Casal, S.; Torres, D.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 1545–1548. [[CrossRef](#)]
26. Soba, D.; Müller, M.; Aranjuelo Munné-Bosch, S. Vitamin E in legume nodules: Occurrence and antioxidant function. *Phytochemistry* **2020**, *172*, 112261. [[CrossRef](#)]
27. Bou, R.; Codony, R.; Tres, A.; Decker, E.A.; Guardiola, F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: A review of the factors that influence the method’s performance. *Anal. Biochem.* **2008**, *377*, 1–15. [[CrossRef](#)]
28. Hodges, D.M.; DeLong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **1999**, *207*, 604–611. [[CrossRef](#)]
29. Wang, W.; Bostic, T.R.; Gu, L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chem.* **2010**, *122*, 1193–1198. [[CrossRef](#)]

30. Vinha, A.F.; Moreira, J.; Barreira, S. Physicochemical parameters, phytochemical composition and antioxidant activity of the algarvian avocado (*Persea americana* Mill.). *J. Agric. Sci.* **2013**, *5*, 100–109. [[CrossRef](#)]
31. Corral-Aguayo, R.D.; Yahia, E.M.; Carrillo-Lopez, A.; González-Aguilar, G. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10498–10504. [[CrossRef](#)]
32. Lahav, E.; Lavi, U. Avocado: Genetics and breeding. In *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*; Jain, S.M., Priyadarshan, P.M., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009.
33. Guthrie, N.; Gapor, A.; Chambers, A.F.; Carroll, K.K. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 544S–548S. [[CrossRef](#)]
34. Qureshi, A.A.; Mo, H.; Packer, L.; Peterson, D.M. Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3130–3140. [[CrossRef](#)]
35. Nakagawa, K.; Shibata, A.; Yamashita, S.; Tsuzuki, T.; Kariya, J.; Oikawa, S.; Miyazawa, T. In vivo angiogenesis is suppressed by unsaturated vitamin E, tocotrienol. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 1938–1943. [[CrossRef](#)]
36. Dreher, M.L.; Davenport, A.J. Hass avocado composition and potential health effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *53*, 738–750. [[CrossRef](#)]
37. Thorin, E. Vascular disease risk in patients with hypertriglyceridemia: Endothelial progenitor cells, oxidative stress, accelerated senescence and impaired vascular repair. *Can. J. Cardiol.* **2011**, *27*, 538–540. [[CrossRef](#)]
38. Reiner, Z. Hypertriglyceridaemia and risk of coronary arteria disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2017**, *14*, 401–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Saha, S.K.; Lee, S.B.; Won, J.; Choi, H.Y.; Kim, K.; Yang, G.M.; Dayem, A.A.; Cho, S. Correlation between oxidative stress, nutrition and cancer initiation. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7915–7922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítol 2. Interacció hormonal en la regulació de la maduració comercial en fruits i aclimatació al fred en alvocats

Chapter 2. Hormonal interplay in the regulation of fruit ripening and cold acclimation in avocados

Celia Vincent, Tania Mesa i Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals i Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Espanya

Publicat en **Journal of Plant Physiology** (2020) 251, 153225

RESUM

Els avocats (*Persea americana* Mill.) són fruits climatèrics amb un procés de maduració comercial durant la post-collita que té lloc a temperatura ambient i depèn estretament de l'etilè. Toti així, es coneix molt poc sobre la implicació d'altres fitohormones en la modulació de la maduració comercial en la post-collita de l'alvocat. L'estat òptim de la maduració comercial en l'alvocat s'aconsegueix pocs dies després de la collita segons el genotip, regió de cultiu i estat inicial de maduració i, les baixes temperatures d'emmagatzematge s'implementen comunament en la post-collita per tal de retardar la maduració comercial. En aquest estudi es va hipotetitzar que la maduració comercial de l'alvocat a temperatura ambient podria estar no només regulada per l'etilè sinó també per altres fitohormones. Amb aquest objectiu, es va analitzar el perfil hormonal del fruit d'alvocat emmagatzemat a 4°C i mantingut a temperatura ambient al llarg de 10 dies després de la post-collita. Es va observar una resposta bifàsica durant la maduració comercial dels avocats a temperatura ambient. Mentre que l'etilè semblava que modulés, individualment, la maduració comercial del fruit des de la transferència de temperatures de refrigeració a temperatura ambient, una interacció hormonal complexa sembla que moduli el procés de maduració comercial de l'alvocat derivant a una progressiva pèrdua de fermesa a temperatura ambient. Apart de l'etilè, les auxines, les GAs, els jasmonats i l'àcid abscísic semblen estar implicats en aquesta resposta hormonal relacionada amb la maduració comercial. L'emmagatzematge en fred per un període de 10 dies va inhibir aquesta resposta hormonal associada a la maduració comercial. A més, els avocats emmagatzemats a baixes temperatures van patir una ràpida resposta de tolerància a l'estrès tot modulant canvis en l'àcid abscísic i l'àcid jasmònic. Es conclou que, en comptes d'una regulació individual per part de l'etilè, una interacció hormonal complexa regula la maduració comercial en l'alvocat durant la post-collita i que l'emmagatzematge a baixes temperatures es pot aplicar de forma eficient com a tècnica per evitar la ràpida maduració comercial dels avocats gràcies als mecanismes de tolerància en resposta a l'estrès per fred que es desencadenen en els fruits a través de regulacions hormonals múltiples.



Hormonal interplay in the regulation of fruit ripening and cold acclimation in avocados



Celia Vincent^{a,b}, Tania Mesa^{a,b}, Sergi Munné-Bosch^{a,b,*}

^a Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain

^b Research Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Abscisic acid
Avocado (*Persea americana* Mill.)
Cold tolerance
Hormonal interaction
Jasmonates
Postharvest

ABSTRACT

Avocados (*Persea americana* Mill.) are climacteric fruits, the ripening of which during postharvest at room temperature is strongly ethylene dependent. However, the role of other phytohormones in the modulation of postharvest ripening of avocados is still poorly understood. The optimal ripening state of avocados is attained a few days after harvest depending on the genotype, growing region and initial maturity stage of the fruit, and cold temperature storage is commonly used to delay this process. Here, we hypothesized that the ripening of avocados at room temperature may be governed not only by ethylene, but also by other phytohormones. With this aim, we analyzed the hormonal profiling of avocados subjected to either 4 °C and 25 °C during 10 days of postharvest. A biphasic response was observed during postharvest ripening of avocados at room temperature. While ethylene alone appeared to govern fruit ripening during the first transfer from cold to room temperature, a complex hormonal interplay occurred during ripening of avocados leading to a progressive fruit softening at room temperatures. Aside from ethylene, auxin, gibberellins, jasmonates and ABA appeared to be involved in avocado fruit ripening during postharvest at room temperature. Cold storage for a period of 10 days inhibited this hormonal response related to ripening. Furthermore, avocados stored at cold temperatures underwent a quick response in order to tolerate cold stress leading to changes in endogenous ABA and jasmonates. We conclude that a complex hormonal interplay, rather than ethylene alone, modulates postharvest ripening of avocados and that cold storage can effectively be employed as a technique to prevent avocados from a rapid ripening thanks to the cold stress tolerance mechanisms deployed by fruits through multiple hormonal regulation.

1. Introduction

Avocados (*Persea americana* Mill.) are fruits originated in Mexico, where the technologies for their cultivation started around 500 BC. Since then, many hybridization techniques have allowed the development of the wide variety of high-quality cultivars that are currently exploited worldwide (Yahia, 2012). Due to the climacteric nature of avocados, their ripening occurs rapidly in time, once the fruit is collected from the tree, attaining the optimal ripening state a few days after harvest; contrarily, fruit does not ripe when attached to the tree (Kassim et al., 2013). Avocado horticultural maturity can be manipulated by delaying harvest time and, depending on whether the harvest is on the early or late season, fruit properties like oil content, texture and

flavor may vary (Zafar and Sidhu, 2011). The high content of bioactive compounds in these fruits provides beneficial effects for human health, which make them to be highly appreciated by consumers worldwide (Dembitsky et al., 2011; Dreher and Davenport, 2012). The interest in avocado production and postharvest technologies has indeed considerably increased during the last years because of the nutraceutical properties that have been attributed to its consumption (Dreher and Davenport, 2012). For this reason, avocados are highly valuable in the market and many countries are implementing optimization procedures for their cultivation and postharvest treatment, being Mexico the main producer for both importation and exportation, with a 28 % of the world market (FAOSTAT, 2018).

Avocados have since long been considered a good model for

Abbreviations: ABA, abscisic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ERF, ethylene response factor; GAs, gibberellins; IAA, indole-3-acetic acid; JA-Ile, jasmonoyl-isoleucine; JA-Met, jasmonoyl-methionine; JA-Phe, jasmonoyl-phenylalanine; JA-Val, jasmonoyl-valine; OPDA, 12-oxo-phytyldienoic acid; UHPLC-MS/MS, ultra-high-performance-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

* Corresponding author at: Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain.

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

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153225>

Received 7 February 2020; Received in revised form 16 May 2020; Accepted 26 June 2020

Available online 04 July 2020

0176-1617/ © 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

climacteric fruits, in particular for the clear role of ethylene in its ripening (Biale, 1941; Adato and Gazit, 1977; Jeong and Huber, 2004; Kumar et al., 2014). However, recent progress indicates that ripening of climacteric fruits, such as tomatoes, is not only due to ethylene, but to a cross-talk with other phytohormones, so that abscisic acid (ABA), auxin, jasmonates, brassinosteroids and cytokinins may be acting as signaling molecules stimulating ripening in tomato through the induction of ripening-related gene expression (Kumar et al., 2014). However, to our knowledge nothing is still known about the putative role of hormones other than ethylene in the ripening of avocado fruits, except that ABA seems also to be involved (Meyer et al., 2017).

Cold storage has been demonstrated to efficiently reduce the climacteric phase and consequently the ripening rate of many climacteric fruits, thus reducing fruit deterioration (Kassim et al., 2013). Hence, rapidly introducing fruits harvested from the commercial field into cold chambers is a common procedure in order to prolong avocados shelf life and increase economic benefits. It has been demonstrated that cold temperatures could be blocking or reducing ethylene production rate in avocado (Arpaia et al., 2018; Han and Fu, 2019), thus delaying avocado ripening-associated processes like softening through the stabilization of plant cell wall pectins (Rivera et al., 2017) and influencing sugar and fatty acid metabolism (Salcedo et al., 2018; Patil et al., 2019; Pedreschi et al., 2019). Otherwise, cold storage can also cause an increase of ABA concentration in other fruits during postharvest by inducing a chilling tolerance response (Carvajal et al., 2017). Moreover, it has been suggested that the cold inhibition of ethylene signalling could be due to a reduction in jasmonates, since both ethylene and jasmonates interact at the transcription factor level (Qi et al., 2016; Nham et al., 2017).

Here, we aimed at determining whether phytohormones other than ethylene might play a role in avocado ripening during postharvest at room temperatures, and how these fruits respond to low temperature stress during cold storage. We hypothesized that postharvest ripening of avocados may be under the control of ABA aside from ethylene, and that low temperature treatment may inhibit the ripening process by reducing the endogenous contents of ABA in the fruit.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and samplings

Avocados (*Perseaamericana* Mill. cv. Bacon) were collected at commercial harvest maturity (considering optimal firmness and peel coloration) from a commercial orchard in Málaga (south Spain) and immediately brought to the laboratory at the University of Barcelona (Barcelona, NE Spain) after 12 h of transportation at 8–10 °C (air temperature). Avocados were selected for homogeneity according to their size, maturation stage (according to firmness) and lack of pathogen symptoms. Fruits were then divided into two groups by subjecting them to two storage conditions: (i) fruits stored at room temperature (25 °C) to stimulate ripening, and (ii) fruits kept under cold storage temperatures (4 °C), not only as a control treatment, but also to examine cold acclimation over time. Both groups were always kept in darkness throughout the study. Relative humidity of the air at room temperature and under cold storage was of 36 ± 1% and 30 ± 1%, respectively. Samplings from the mesocarp of 18 biological replicates per treatment and time point (with one fruit per biological replicate) were performed at 0 h, 4 h, 2 d, 5 d, 7 d and 10 d from the start of the experiment. For each sampling time, avocados were weighed, and the peel and seed removed. Then, the tissue was cut into pieces, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C until analyses.

2.2. Fruit firmness and chlorophyll content

Firmness is an important characteristic of avocado fruit as it is one of the most reliable methods of determining if the fruit is ripe and ready to eat. Fruit firmness testing was used as a measure of ripeness by using

a FT 327 penetrometer (QA Supplies, Norfolk, VA, USA) by pushing the cone into the avocado mesocarp while avoiding contact with the seed.

To determine total chlorophyll content, mesocarp samples (100 mg) were repeatedly extracted in 1 mL of methanol, using vortex and ultrasonication. Supernatants were collected after centrifugation for 10 min at 600g and 4 °C. Chlorophylls were measured with a spectrophotometer as described by Wang et al. (2010), reading absorbances at 653, 666 and 750 nm and measuring chlorophyll content as follows:

$$Chl a = (12.21 \cdot Abs_{666} - 2.81 \cdot Abs_{653}) - Abs_{750}$$

$$Chl b = (20.13 \cdot Abs_{653} - 5.03 \cdot Abs_{666}) - Abs_{750}$$

2.3. Hormone profiling

Endogenous content of hormones, including those of auxin, cytokinins, gibberellins, ABA, the ethylene precursor, 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), salicylic acid and jasmonates, were measured using ultra-high-performance-liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem (UHPLC-ESI MS/MS) as described by Müller and Munné-Bosch (2011). Fifty mg of mesocarp sample for each biological replicate was extracted with 400 µL methanol:isopropanol:acetic acid 50:49:1 (v/v/v) using vortex and ultrasonication (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, Danbury, CT, USA) for 30 min. During the extraction process, deuterium labelled hormones (d₄-SA, d₆-ABA, d₅-JA, d₅-IAA, d₂-GA₁, d₂-GA₄, d₂-GA₇, d₄-ACC, d₆-2IP, d₆-IPA, d₅-Z and d₅-ZR) were added acting as internal standards in order to quantify hormone contents in each sample. Two re-extraction steps were conducted as described before obtaining again the supernatant after a 10 min centrifuge at 600 g and 4 °C, to finally filter the extract using a 0.22 µm PTFE (Waters, Milford, MS, USA) filter before UHPLC-ESI MS/MS analyses. UHPLC and MS/MS conditions for hormone separation and quantification were the same as those described by Müller and Munné-Bosch (2011). Quantification of hormones was performed considering recovery rates for labelled hormones in each sample (for jasmonate conjugated forms that of d₅-JA was used). Calibration curves for each analyte were generated using Analyst™ software (Applied Biosystems, Inc., California, USA).

2.4. Statistics

Statistical analyses were performed by two-way ANOVA and Tukey posthoc tests were used (IBS SPSS Statistics 22 software). Differences were considered significant when *P* values were under the significance level (α) of 0.05.

3. Results

3.1. Fruit ripening at room temperatures

To characterize the ripening process during transfer and storage of the fruits at 25 °C relative to the fruit kept at 4 °C, fruit biomass, hydration and firmness were evaluated (Fig. 1A–C). A significant decrease of firmness with time was observed, being 5 days the time when fruit firmness adjusted more to the consumer organoleptic requirements in this variety of avocado (between 5–10 N, Fig. 1C, see also Arpaia et al., 2018). Moreover, fruits under cold storage did not show a reduction in firmness at any time indicating that cold temperature storage at 4 °C was very effective in inhibiting the ripening process throughout the study period (Fig. 1C, see also Woolf et al., 1998 and Arpaia et al., 2018 for values of reference). Chlorophyll contents kept unaltered during the initial stage of ripening after 4 h of transfer of fruits from refrigerating conditions to 25 °C (Fig. 1D). During the second phase slight fluctuations in the chlorophyll content were observed over time, with no significant differences between treatments (Fig. 1D). When comparing fruits stored at room temperature with those kept at 4 °C, a peak in the

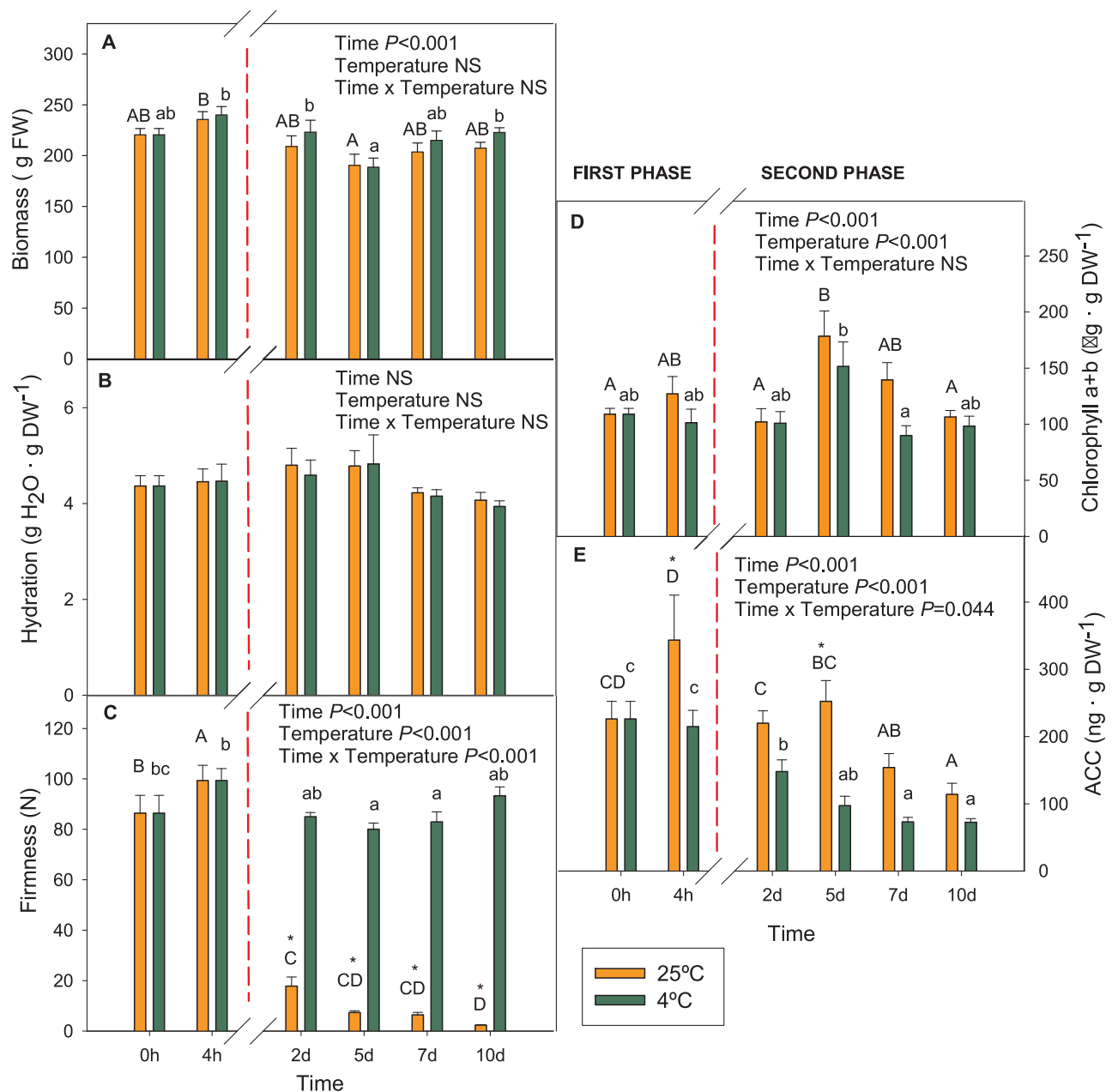


Fig. 1. Characterization of avocado fruit ripening at room temperature and effects of cold storage. (A) Fruit biomass (fresh weight per fruit unit), (B) Fruit hydration, (C) Fruit firmness, (D) Chlorophyll a + b contents, (E) Endogenous contents of the ethylene precursor, 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in the mesocarp of avocados ripening at room temperature (25 °C) compared to those exposed to cold storage conditions (4 °C). Red discontinuous line is shown to indicate the separation between the first phase and the second phase of ripening at room temperature. Data represent the mean \pm standard error of $n = 18$ fruits. Differences between treatments over time were analyzed using a two-way ANOVA with Tukey *posthoc* tests. Asterisks show significant differences for each parameter between treatments in each time. Different lower case and capital letters indicate significant differences over time within each treatment (4 °C and 25 °C, respectively). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

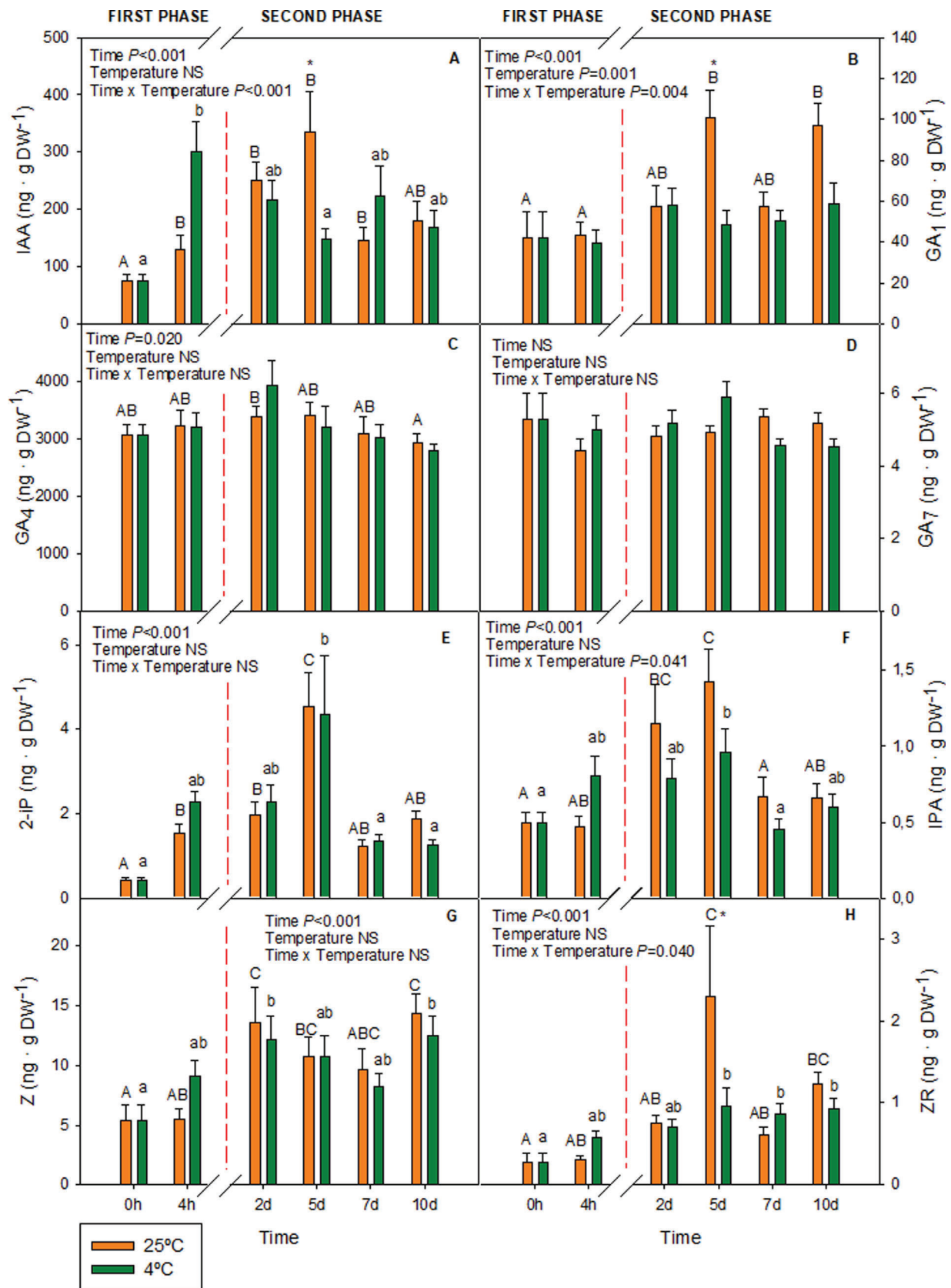
contents of the ethylene precursor, ACC was observed both at 4 h and 5 d (Fig. 1E)

3.2. Impact of ripening and cold storage on hormone profiling

A transient increase of the contents of the auxin, indole-3-acetic acid (IAA) was observed as the fruit ripened at 25 °C, compared to the non-ripened fruit at 4 °C, with maximum differences at day 5 (Fig. 2A). Auxin increases occurred concomitantly with the increase in ACC contents during the second phase of ripening. Interestingly, the same occurred for GA₁ content in fruits at 25 °C, with maximum differences between treatments at day 5. All other studied GAs were not altered

(Fig. 2C, D). Moreover, no differences were observed in the contents of GAs during cold storage (Fig. 2C, D). The contents of cytokinins, including isopentenyl adenine (2-iP) and its precursor isopentenyl adenosine (IPA), as well as *trans*-zeatin riboside (ZR) showed an abrupt peak at 5 d during fruit ripening at 25 °C to decrease thereafter, as it occurred with auxin and GA₁ (Fig. 2A, B). Under cold treatment, ZR contents increased until 5 d to remain constant until the end of the study, while *trans*-zeatin (Z) contents attained maximum contents at day 2 and 10 d (Fig. 2E–G). Nonetheless, only ZR presented a peak at 5 d in fruit undergoing ripening compared to cold-stored fruits (Fig. 2H).

ABA contents increased during fruit ripening at 25 °C until day 2 to remain constant thereafter. Cold-treated avocados also showed an



(caption on next page)

Fig. 2. Changes in the endogenous contents of auxin (A), gibberellins (B-D) and cytokinins (E-H) during avocado fruit ripening at room temperature and effects of cold storage. Results indicate hormonal changes in the mesocarp of avocados during their ripening at room temperature (25 °C) compared to fruits exposed to cold storage conditions (4 °C). Red discontinuous line is shown to indicate the separation between the first phase and the second phase of ripening at room temperature. Data represent the mean ± standard error of n = 18 fruits. Differences between treatments over time were analyzed using a two-way ANOVA with Tukey posthoc tests. Asterisks show significant differences for each parameter between treatments in each time. Different lower case and capital letters indicate significant differences over time within each treatment (4 °C and 25 °C, respectively). IAA: indole-3-acetic acid; GA: gibberellin; 2-iP: 2-isopentenyl adenine, IPA: isopentenyl adenosine, Z: *trans*-zeatin and ZR: *trans*-zeatin riboside. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

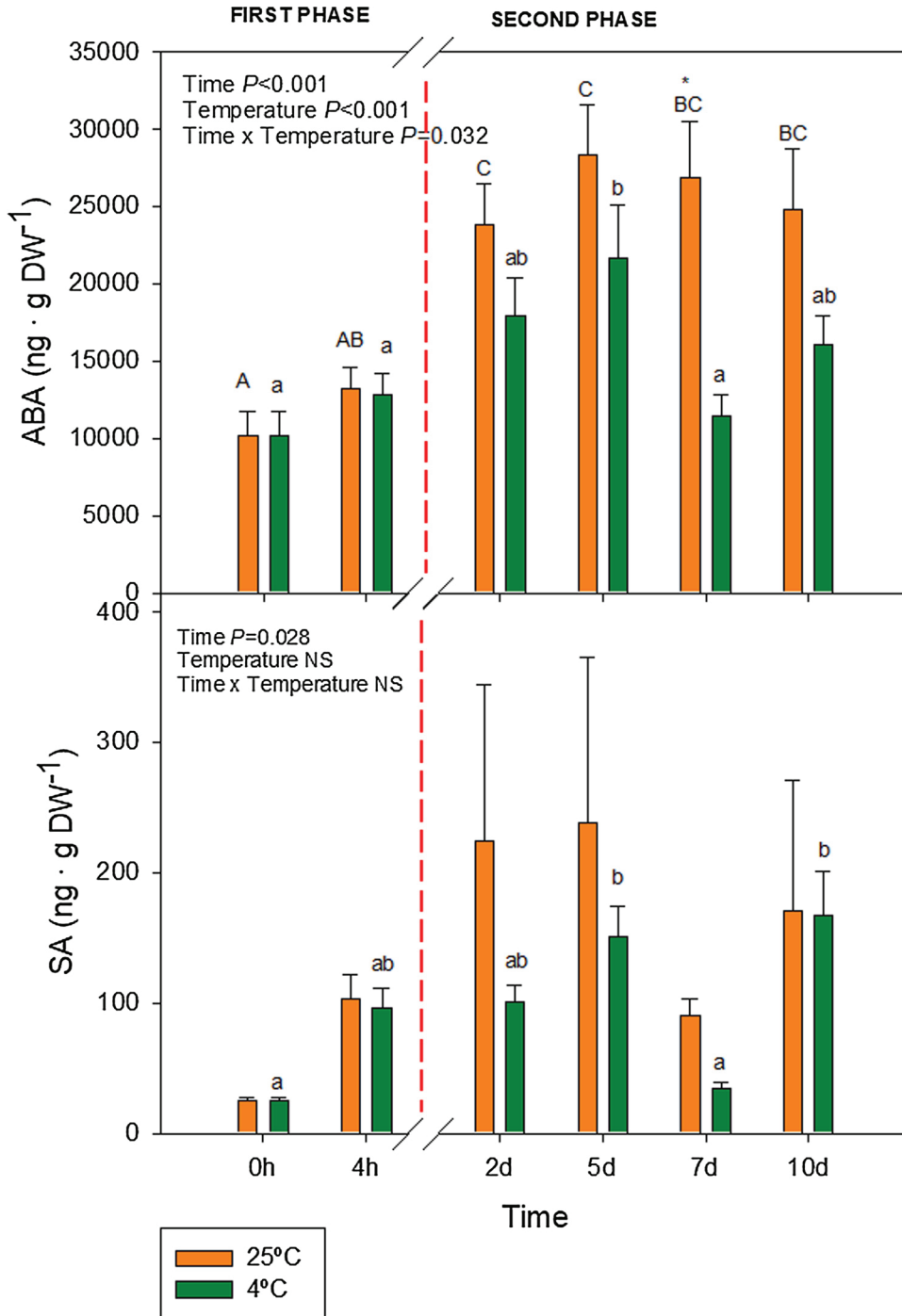


Fig. 3. Changes in the endogenous contents of abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) in the mesocarp of avocados during their ripening at room temperature (25 °C) compared to fruits exposed to cold storage conditions (4 °C). Red discontinuous line is shown to indicate the separation between the first phase and the second phase of ripening at room temperature. Data represent the mean ± standard error of n = 18 fruits. Differences between treatments over time were analyzed using a two-way ANOVA with Tukey posthoc tests. Asterisks show significant differences for each parameter between treatments in each time. Different lower case and capital letters indicate significant differences over time within each treatment (4 °C and 25 °C, respectively). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

increase in ABA contents showing a maximum at 5 d. Between temperature treatments, ABA contents were significantly different at day 7 (Fig. 3), two days later than auxin, GA₁ and tZR (Fig. 2). While salicylic acid contents did not differ between temperature treatments (Fig. 3), a progressive increase during ripening was observed for 12-oxo-

phytodienoic acid (OPDA) contents, with no difference over time in cold-stored fruit and with differences between treatments being significant at days 7 and 10 (Fig. 4). As it occurred with OPDA, the contents of jasmonoyl-phenylalanine (JA-Phe) increased at 25 °C but they decreased to initial values after day 5. No differences were observed in

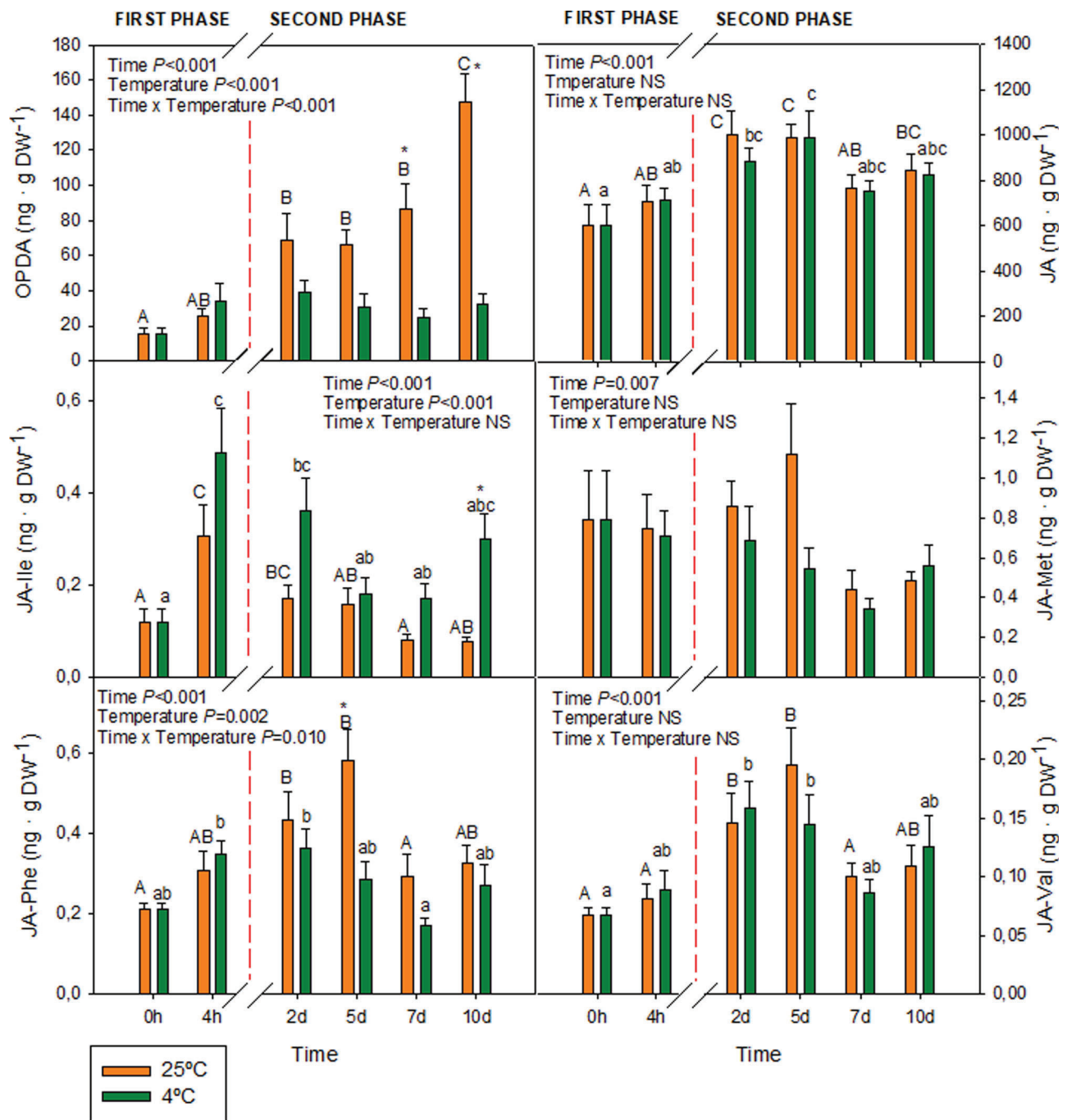


Fig. 4. Jasmonate profiling, including changes in the endogenous contents of jasmonic acid (JA), its precursor, 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) and jasmonic acid amino acid conjugates, during avocado fruit ripening at room temperature and effects of cold storage. Results indicate hormonal changes in the mesocarp of avocados during their ripening at room temperature (25 °C) compared to fruits exposed to cold storage conditions (4 °C). Red discontinuous line is shown to indicate the separation between the first phase and the second phase of ripening at room temperature. Data represent the mean \pm standard error of $n = 18$ fruits. Differences between treatments over time were analyzed using a two-way ANOVA with Tukey posthoc tests. Asterisks show significant differences for each parameter between treatments in each time. Different lower case and capital letters indicate significant differences over time within each treatment (4 °C and 25 °C, respectively). JA-Ile: jasmonoyl-isoleucine; JA-Met: jasmonoyl-methionine; JA-Phe: jasmonoyl-phenylalanine; JA-Val: jasmonoyl-valine. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

JA-Phe contents over time at 4 °C. Consequently, JA-Phe content was higher at 25 °C compared to 4 °C at day 5 as for auxin, GA₁ and tZR. The content of jasmonic acid increased at 25 °C until day 5 to decrease later. Jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) contents increased abruptly for both treatments at 4 h to decrease thereafter, but levels kept higher at 10 d for avocados stored at 4 °C. Jasmonoyl-valine (JA-Val) contents increased until day 5 to decrease afterwards in both treatments, but no differences were observed between temperatures over time.

Overall, ripening indicators (firmness and ACC contents, Fig. 1) and hormonal profiling (Figs. 2–4) indicated a completely different scenario for an initial phase of ripening (initiation of the process just after a few hours of transition from cold storage to room temperatures, which was characterized here by sampling at 4 h) and a second phase of ripening (in which ripening at room temperatures was executed with a peak at 5 days and being here followed up to 10 days compared to fruit kept at 4 °C). While the first, initial phase was characterized by a sharp increase

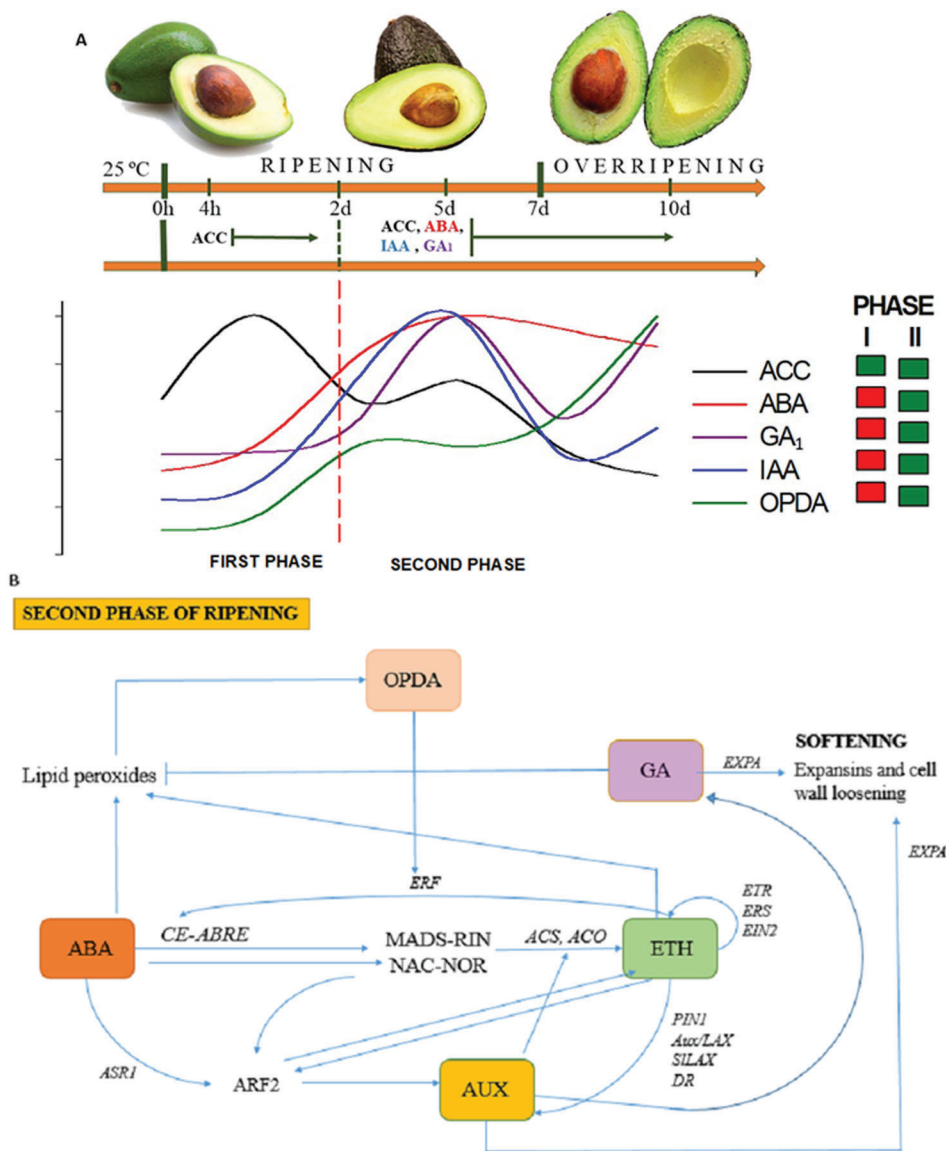


Fig. 5. Time-course evolution of the hormonal profiling during avocados ripening and overripening during postharvest, and proposed model to explain their hormonal regulation. (A) Hormonal profiling of the biphasic avocados ripening response at postharvest. Note that the first phase corresponds to the hormonal changes occurring during transfer of fruits from refrigerating conditions to room temperature within the first hours, while the second phase is characterized by hormonal changes modulating both ripening and overripening. (B) Proposed model of the putative hormonal regulation of avocados postharvest ripening presenting the complex hormonal interaction occurring between gibberellins, auxin, ABA, jasmonates and ethylene during the second phase of ripening at 25 °C. ACC: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ACS: ACC synthase; ACO: ACC oxidase; ARF: auxin response factor; ASR1: Abscisic acid stress ripening 1; AUX: auxin; Aux/IAA: auxin/indole-3-acetic acid; CE: cis-element; EIN2: ethylene insensitive2; ETH: ethylene; ERF: ethylene response factor; ETR/ERS: ethylene receptor; EXPA: expansins; GA: gibberellin; LAX: like aux1 influx carrier; OPDA: 12-oxo-phytodienoic acid; PIN: pin-formed1 auxin transporter protein.

in ACC contents, the second phase was characterized by a complex variation in the hormonal balance that operated in a time-controlled manner (Fig. 5A). The second phase was characterized by an increase not only of ACC contents, but also of auxin, GA₁, tZR and JA-Phe at day 5, ABA at day 7 and OPDA at days 7 and 10 (Fig. 5A).

Once the transfer of fruits from refrigerating conditions during transport at 8–10 °C to cold storage conditions at 4 °C occurred, avocados underwent a complex response to acclimate to these environmental conditions through inducing hormonal changes (Fig. 6A). A rapid increase in the contents of JA-Ile and 2-iP was observed after 4 h of storage. While JA-Ile contents decreased thereafter, 2-iP increased showing a peak at day 5, which also was observed for ABA, jasmonic acid and the cytokinin precursors IPA and ZR. The Z peak appeared before that of its precursor at day 2 of storage (Fig. 6A).

4. Discussion

The climacteric phase in avocados begins after harvest and it is characterized by an ethylene *de novo* biosynthesis concomitant to a respiration peak (Kassim et al., 2013). Although the optimal ripening stage is quite variable among genotypes, growing regions and maturity stages, avocados from the variety Bacon usually attain the optimum ripening stage after 5 days of storage at room temperature (Kassim

et al., 2013). Ethylene production occurs in parallel to ACC accumulation and increases in ACC synthase and ACC oxidase, so that increases in endogenous ACC contents are always concomitant and follow immediately thereafter with an increased ethylene production (Gouble et al., 1995; Owino et al., 2002). This process is known to be inhibited by cold storage after harvest of the fruit (Zamorano et al., 1994; Woolf et al., 2003; Defilippi et al., 2018; Albornoz et al., 2019). Consequently, avocados kept at 25 °C are expected to ripen while those stored at 4 °C are not, as it occurred in our study. According to our results, however, not only ethylene (as indicated by variations in its immediate precursor ACC), but also other hormones, such as ABA, jasmonates, gibberellins and auxin, might be involved in the modulation of avocados ripening at room temperature, particularly during the second phase of fruit ripening.

A biphasic response was indeed observed during ripening, which was characterized by (i) a simultaneous, transient increase in ethylene production capacity (as indicated by enhanced ACC contents) occurring as a result of transfer of fruits from refrigeration conditions to room temperatures, most likely as a signaling mechanism for ripening induction (first phase) and (ii) a subsequent phase of ripening with a sustained reduction in fruit firmness due to the maintenance of fruits at the ripening-promoting temperature of 25 °C (second phase). The second phase was characterized by variations in the endogenous

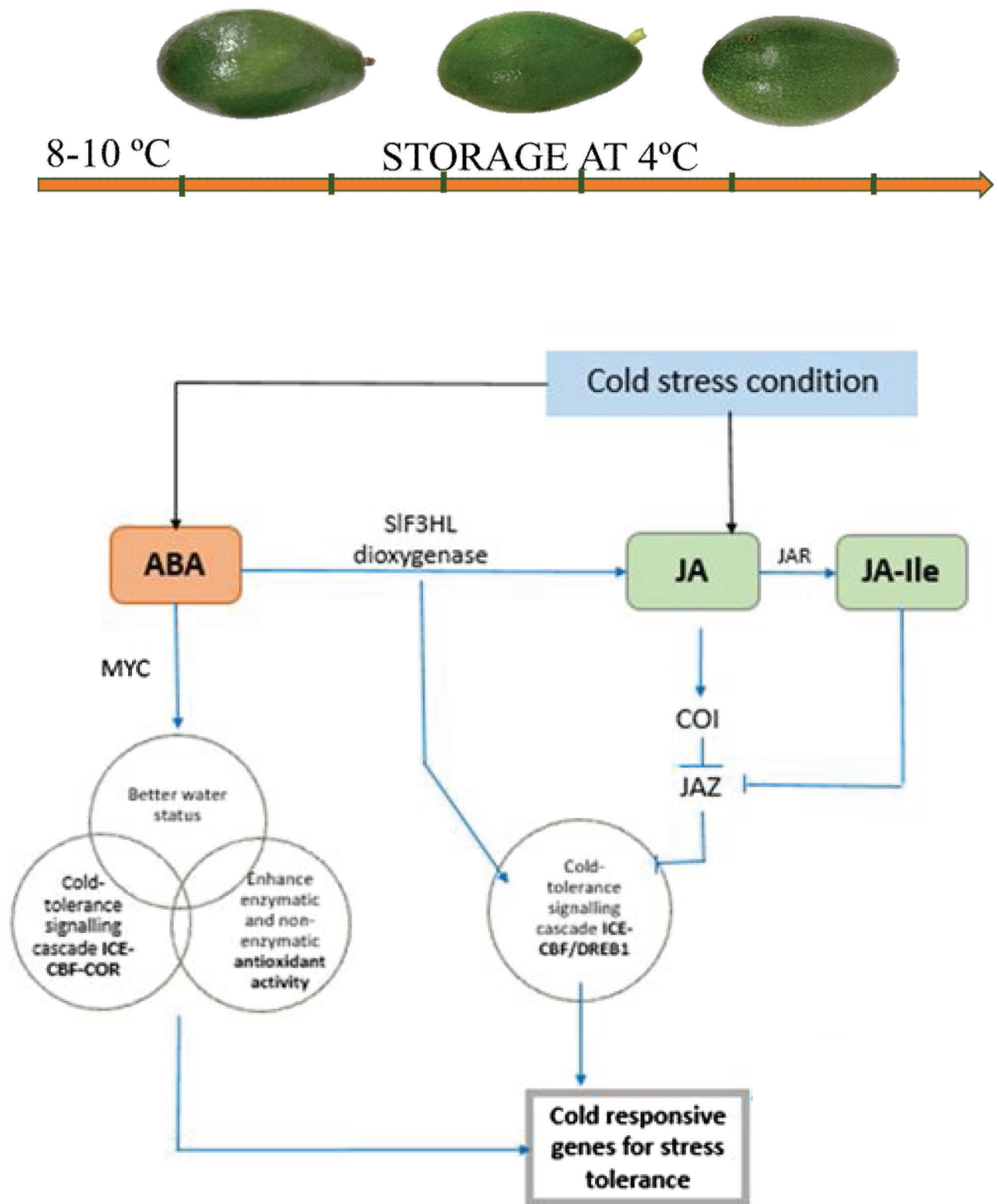


Fig. 6. Putative model of cold acclimation through hormonal regulation during the storage of avocados at 4 °C. AOS: allene oxide synthase; AOC: allene oxide carboxylase; CBF: C-repeat binding factor; COI: coronatine insensitive; COR: cold-responsive genes; DREB: Dehydration-responsive element binding protein; ICE: inducer of CBF expression; JA: jasmonic acid; JA-Ile: jasmonoyl-isoleucine; JAR: jasmonate-amido synthetase; JAZ: jasmonate Zim domain; MYC: cis-acting element of dehydration-responsive genes; OPR: 12-oxo-phytodienoic acid reductase; SIF3HL: 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase-encoding gene.

contents of various hormones, in which not only ethylene (Feng et al., 2000; Arpaia et al., 2018; Gwanpua et al., 2018), but also auxins, GAs, ABA and jasmonates (Fig. 5A, B) might be involved in the process. More specifically, auxin and GAs could be inducing fruit softening during

ripening at room temperatures interacting in a positive feedback, possibly between them and more specifically auxin with ethylene, at day 5 (Fig. 5B), which might be associated with significant reductions in fruit firmness between day 2 and day 10 (Fig. 1C). While ethylene may

induce poligalacturonidase, pectin methylesterase and β -galactosidase enzyme activity, thus inducing the solubilization and degradation of polysaccharides of cellulose and pectins in the cell wall (Tucker and Laties, 1984; Tateishi et al., 2007; Yahia, 2012; Defilippi et al., 2018); auxin and GAs might be stimulating softening through the activation of expansins and other expansion-promoting enzymes, while GAs biosynthesis may in turn, be stimulated by auxin (McQueen-Mason et al., 1992; Català et al., 2000; Trainotti et al., 2007; Tadiello et al., 2016; Busatto et al., 2019). Furthermore, an auxin- and ABA-related promotion of ethylene production and an ethylene-induced production of ABA operating in a positive feedback may promote to a higher extent and very quickly the loss of firmness in ripe fruit (Brenner et al., 2005; Lee et al., 2010; Chen et al., 2016; Meyer et al., 2017; Wang et al., 2019). The biosynthetic pathways of various hormones would therefore be highly stimulated thanks to the positive feedback between auxins and ABA with ethylene, thus leading to signaling mechanisms executing ripening-related processes (Fig. 6B).

Jasmonates also appeared to have a role in the control of ripening in avocados stored at room temperature. OPDA, the precursor of jasmonic acid, is produced from the oxidation of poly-unsaturated fatty acids in lipid membranes (Gfeller et al., 2010; Dave and Graham, 2012), and reduced levels of OPDA have been related to a higher capacity of protection from lipid peroxidation (Hazman et al., 2015). Accordingly, the increase in OPDA with ripening and over-ripening could be associated to a loss of this detoxifying function that would lead to tissue damage and other physiological processes related to fruit deterioration during over-ripening. Among JA conjugated forms, only JA-Phe content increased during fruit ripening. Despite not being described profoundly as an active molecule, JA-Phe has been suggested to act in pathogen response since its levels increase in response to leaf wounding and fungal diseases in *Arabidopsis thaliana* (Raacke et al., 2006). Recent research indicates as well that OPDA could play a role by itself, or through ABA, ethylene (Varsani et al., 2019) and redox signaling (Toshima et al., 2014; Müller et al., 2017) interaction, in biotic plant defense (Stintzi et al., 2001; Dave and Graham, 2012; Goetz et al., 2012; Scalschi et al., 2015; Gleason et al., 2016). It appears that OPDA is exerting a differential function to other jasmonates during fruit ripening, since the observed rise in OPDA contents did not relate to an increase in any free nor conjugated jasmonate form over time in avocados. The role of cytokinins appeared to be less clear during ripening. Cytokinins have been described to delay ripening and in our study differences between treatments were observed for ZR only. ZR is the precursor of the active Z and it is thought to have little activity by itself (Takei et al., 2001; Spíchal et al., 2004; Hirose et al., 2008), thus further investigations are required to unravel the possible role of cytokinins in avocados ripening at room temperature.

After the transfer from refrigerating temperatures during the transport to cold-storage conditions, avocados showed a rapid hormonal response in order to counteract very low temperature conditions. JA-Ile increased abruptly after 4 h of storage at 4 °C before free jasmonic acid increased, probably associated with paralleled increases in auxin contents, in agreement with previous studies showing that JAR1, which encodes for a jasmonate-amido synthetase converting JA to JA-Ile, is induced by auxin (Staswick and Tiriyaki, 2004). It appears that all the synthesized jasmonic acid was being converted to the active conjugated form JA-Ile. JA-Ile has been described to act in many biotic and abiotic stress defense responses such as salinity, drought and extreme temperatures (Howe et al., 2018; Hazman et al., 2019). Although further research is required to support this finding, increases in jasmonic acid contents could therefore be related to a positive, acclimation response to cold temperatures, as it occurs in other study models (Wang et al., 2016). Moreover, increases in jasmonate contents at day 5 could also be due to an ABA increase, which it is known to stimulate SLF3HL dioxygenase activity (Hu et al., 2019), so that an interplay between jasmonates and ABA could activate the expression of cold-responsive genes by mediating the ICE-CBF/DREB1 signaling cascade (Wang et al.,

2016), an aspect that warrants further investigations. Again, the possible role of cytokinins in inhibiting ripening during cold storage was less clear. Although the contents of cytokinins tended to increase in avocados exposed to low temperatures, this response was not associated with an inhibition of chlorophyll loss and no difference in bioactive cytokinins were observed between treatments. To sum up, results suggest a complex hormone regulation of cold acclimation in avocados in which ABA and jasmonates seem to be actively implicated (Fig. 6B).

Considering the hormonal regulation of the aforementioned physiological processes (ripening and over-ripening at 25 °C and cold acclimation at 4 °C) and considering the rapid climacteric nature of avocado ripening, it is important to translate this knowledge to implement techniques along the supply chain to further delay or inhibit ripening. Up to date, 1-methylcyclopropane (1-MCP) applications and heat-shock treatments have been performed to delay ripening in avocados (Woolf et al., 2005; Jeong and Huber, 2004; Arpaia et al., 2018; Defilippi et al., 2018; Cordenunsi-Lysenko et al., 2019), and it has been shown that ethylene biosynthesis can be decelerated by fruit storage in cold temperatures (Woolf et al., 2003; Zamorano et al., 1994; Defilippi et al., 2018; Albornoz et al., 2019), a simple technique commonly implemented worldwide to delay avocados ripening. According to our results, cold temperatures could not only be blocking ethylene production (as indicated by reduced ACC contents) but also increase jasmonate signaling (through an increase in JA-Ile), for ripening-inhibition (Pedreschi et al., 2016). Moreover, the increase in ABA contents might be related to an avoidance response to dehydration processes (Ma et al., 2018), which might allow keeping a better water status in the fruit, thus preventing softening-related processes during cold storage up to 10 days. These results pave the way to study the possible cross-talk between ethylene and other hormones and how this is inhibited at low temperatures during the postharvest of avocados. Further studies using combined temperatures and 1-MCP applications will undoubtedly provide new hints towards better understanding this hormonal cross-talk.

It is concluded that apart from the already known climacteric changes in fruit metabolism occurring during avocado ripening, which has been widely studied for years, other plant hormones such as ABA, jasmonates, auxin and GAs may also be involved in the regulation of this physiological process. Our initial hypothesis that postharvest ripening of avocados may be under the control of ABA aside from ethylene resulted to be too simplistic, since other hormones such as jasmonates, auxin and gibberellins, might also play a role. Additionally, it has been shown that cold temperatures as a storage technique could be efficiently inhibiting ripening-related processes through hormonal changes, mainly related to jasmonates and ABA, without inducing a cold injury to the fruit. Our hypothesis that low temperature treatment may inhibit the ripening process by reducing the endogenous contents of ABA in the fruit resulted to be wrong, since endogenous contents of ABA increased upon cold storage, suggesting that this hormone may play a role, together with jasmonates in cold acclimation and the inhibition of ripening at low temperatures. Further research is however needed to better understand the molecular mechanisms underlying hormonal interactions occurring both during avocado postharvest ripening at low temperatures and acclimation to low temperatures during cold storage.

Author contributions

C.V. and S.M.B. designed the study; C.V. and T.M. conducted the experiments; C.V. performed the data analysis; C.V. and S.M.B wrote the manuscript.

CRedit authorship contribution statement

Celia Vincent: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing -

original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision. **Tania Mesa:** Methodology, Validation, Investigation, Writing - review & editing, Visualization. **Sergi Munné-Bosch:** Conceptualization, Validation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was funded by 2017 SGR 980 grant from Generalitat de Catalunya.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153225>.

References

- Adato, I., Gazit, S., 1977. Changes in the initiation of climacteric ethylene in harvested avocado fruits during their development. *J. Sci. Food Agric.* 28, 240–242.
- Albornoz, K., Cantwell, M.I., Zhang, L., Beckles, D.M., 2019. Integrative analysis of postharvest chilling injury in cherry tomato fruit reveals contra punctual spatio-temporal responses to ripening cold stress. *Sci. Rep.* 9, 2795. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38877-0>.
- Arpaia, M.L., Collin, S., Sievert, J., Obenland, D., 2018. ‘Hass’ avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. *Postharvest Biol. Tec.* 140, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.015>.
- Biale, B.J.B., 1941. The climacteric rise in respiration rate of the Fuerte avocado fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 39, 137–142.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L., Schmülling, T., 2005. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J.* 44, 314–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02530.x>.
- Busatto, N., Farneti, B., Tadiello, A., Oberkofler, V., Cellini, A., Biasioli, F., Delledonne, M., Castaro, A., Noutsos, C., Costa, F., 2019. Wide transcriptional investigation unravel novel insights of the on-tree maturation and postharvest ripening of ‘Abate Fetele’ pear fruit. *Hortic. Res.* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0115-1>.
- Carvajal, F., Palma, F., Jiménez-Muñoz, R., Jamilena, M., Pulido, A., Garrido, D., 2017. Unravelling the role of abscisic acid in chilling tolerance of zucchini during postharvest cold storage. *Postharvest Biol. Tec.* 133, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.07.004>.
- Català, C., Rose, J.K.C., Bennett, A.B., 2000. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 122, 527–534. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.527>.
- Chen, J., Mao, L., Lu, W., Ying, T., Luo, Z., 2016. Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. *Planta* 243, 183–197. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2402-5>.
- Cordenunsi-Lysenko, B.R., Nascimento, J.R.O., Castro-Alves, V.C., Purgatto, E., Fabi, J.P., Peroni-Okyta, F.H.G., 2019. The starch is (not) just another brick in the wall: the primary metabolism of sugars during banana ripening. *Front. Plant Sci.* 10, 391. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00391>.
- Dave, A., Graham, I.A., 2012. Oxylipin signaling: a distinct role for the jasmonic acid precursor *cis*-(+)-12-*oxo*-phytyldienoic acid (*cis*-OPDA). *Front. Plant Sci.* 3, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00042>.
- Defilippi, B.G., Ejsmentewicz, T., Covarrubias, M.P., Gudenschwager, O., Campos-Vargas, R., 2018. Changes in cell wall pectins and their relation to postharvest mesocarp softening of ‘Hass’ avocados (*Persea americana* Mill.). *Plant Physiol. Biochem.* 128, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.018>.
- Dembitsky, V.M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S., Gorinstein, S., 2011. The multiple nutrition properties of some exotic fruit: biological activity and active metabolites. *Food Res. Int.* 44, 1671–1701. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.003>.
- Dreher, M.L., Davenport, A.J., 2012. Hass avocado composition and potential health Effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 738–750. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.556759>.
- FAO, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture Database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Feng, X., Apelbaum, A., Sisler, E.C., Goren, R., 2000. Control of ethylene responses in avocado with 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Tec.* 20, 143–150. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00126-5).
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., Farmer, E.E., 2010. Jasmonate biochemical pathway. *Sci. Signal.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3109cm3>.
- Gleason, C., Leelarasamee, N., Meldau, D., Feussner, I., 2016. OPDA has key role in regulating plant susceptibility to the root-knot nematode *Meloidogyne heplia* in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 7, 1565. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01565>.
- Goetz, S., Hellwege, A., Stenzel, I., Kutter, C., Hauptmann, V., Forner, S., McCaig, B., Hause, G., Miersch, O., Wastemack, C., Hause, B., 2012. Role of *cis*-12-*oxo*-phytyldienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiol.* 158, 1715–1727. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192658>.
- Goube, B., Fath, D., Soudain, P., 1995. Nitrous oxide inhibition of ethylene production in ripening and senescing climacteric fruits. *Postharvest Biol. Tec.* 5, 311–321.
- Gwanpua, S.G., Qian, Z., East, A.R., 2018. Modelling ethylene regulated changes in ‘Hass’ avocado quality. *Postharvest Biol. Tec.* 136, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.10.002>.
- Han, Y.C., Fu, C.C., 2019. Cold-inducible MaC2H2s are associated with cold stress response of banana fruit via regulating *MaICE1*. *Plant Cell Rep.* 38, 673–680. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02399-w>.
- Hazman, M., Hause, B., Eiche, E., Nick, P., Riemann, M., 2015. Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice ALLENE OXIDE CYCLASE mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity. *J. Exp. Bot.* 66, 3339–3352. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv142>.
- Hazman, M., S'hnel, M., Schäfer, S., Zumsteg, J., Lesot, A., Beltran, F., Marquis, V., Herrgott, L., Miesch, L., Riemann, M., Heitz, T., 2019. Characterization of jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) hormonal catabolic pathways in rice upon wounding and salt stress. *Rice* 12, 45. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0303-0f>.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., Sakakibara, H., 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* 59, 75–83. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm157>.
- Howe, G.A., Major, I.T., Koo, A.J., 2018. Modularity in jasmonates signaling for multistress resilience. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 387–415. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040047>.
- Hu, T., Wang, Y., Wang, Q., Dang, N., Wang, L., Liu, C., Zhu, J., Zhan, X., 2019. The tomato 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase gene *SlF3HL* is critical for chilling stress tolerance. *Hortic. Res.* 6, 45. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0127-5>.
- Jeong, J., Huber, D.J., 2004. Suppression of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit softening and changes in cell wall matrix polysaccharides and enzyme activities: differential responses to 1-MCP and delayed ethylene application. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129, 752–759.
- Kassim, A., Workneh, T.S., Bezuidenhout, C.N., 2013. A review on postharvest handling of avocado fruit. *Afr. J. Agric. Res.* 8, 2385–2402. <https://doi.org/10.24018/ejers.2018.3.12.992>.
- Kumar, K., Khurana, A., Sharma, A.K., 2014. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruit. *J. Exp. Bot.* 65, 4561–4575. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru277>.
- Lee, S.J., Park, J.H., Lee, M.H., Yu, J.H., Kim, S.Y., 2010. Isolation and functional characterization of CE1 binding proteins. *BMC Plant Biol.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-277>.
- Ma, X., Zhang, J., Burgess, P., Rossi, S., Huang, B., 2018. Interactive effects of melatonin and cytokinin on alleviating drought-induced leaf senescence in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environ. Exp. Bot.* 145, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.010>.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* 4, 1425–1433. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.11.1425>.
- Meyer, M.J., Chope, G.A., Terry, L.A., 2017. Investigation into the role of endogenous abscisic acid during ripening of imported avocado cv. Hass. *J. Sci. Food Agric.* 97, 3656–3664. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8225>.
- Müller, M., Munné-Bosch, S., 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Meth.* 7, 37. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-37>.
- Müller, S.M., Wang, S., Telman, W., Liebthal, M., Schnitzer, H., Viehhauser, A., Syicht, C., Delatorre, C., Wirtz, M., Hell, R., Dietz, K.J., 2017. The redox-sensitive modulator cyclophilin 20-3, 2-cysteine peroxidoxin and cysteine synthase integrates sulfur metabolism and oxylipin signaling in the high light acclimation response. *Plant J.* 91, 995–1014. <https://doi.org/10.1093/pcp/cw031>.
- Nham, N., Macnish, A.J., Zakharov, F., Mitcham, E.J., 2017. ‘Barlett’ pear ruit (*Pyrus communis* L.) ripening regulation by low temperatures involves gene associated with jasmonic acid, cold response, and transcription factors. *Plant Sci.* 260, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.03.008>.
- Owino, W.O., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A., 2002. Differential regulation of genes encoding ethylene biosynthesis enzymes and ethylene response sensor ortholog during ripening and in response to wounding in avocados. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127, 520–527.
- Patil, A.S., Maurer, D., Feygenberg, O., Alkan, N., 2019. Exploring cold quarantine to mango fruit against fruit fly using artificial ripening. *Sci. Rep.* 9, 1948. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38521-x>.
- Pedreschi, R., Hollak, S., Harkema, H., Otma, E., Robledo, P., Westra, E., Somhorst, D., Ferreyra, R., Defilippi, B.G., 2016. Impacte of postharvest ripening strategies on ‘Hass’ avocado fatty acid profiles. *S. Afr. J. Bot.* 103, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.012>.
- Pedreschi, R., Uarrota, V., Fuentealba, C., Alvaro, J.E., Olmedo, P., Defilippi, B.G., Meneses, C., Campos-Vargas, R., 2019. Primary metabolism in avocado fruit. *Front. Plant Sci.* 10, 795. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00795>.
- Qi, X., Xiao, Y., Fan, Z., Chen, J., Lu, W., Kuang, J., 2016. A banana fruit transcriptional repressor MaERF10 interact with MaJAZ3 to strengthen the repression of JA biosynthetic genes involved in MeJA-mediated cold tolerance. *Postharvest Biol. Tec.* 120, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.001>.
- Raacke, I.C., Mueller, M.J., Berger, S., 2006. Defects in Allene oxide synthase and 12-*oxo*-phytyldienoic acid reductase alter the resistance to *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* (1986) 154, 740–744. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434>.

- 2006.01191.x.
- Rivera, S.A., Ferreyra, R., Robledo, P., Selles, G., Arpaia, M.L., Saavedra, J., Defilippi, B.G., 2017. Identification of preharvest factors determining postharvest ripening behaviors in "Hass" avocado under long term storage. *Sci. Hortic.* 216, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.024>.
- Salcedo, R., Quiñones, Y., Melgarejo, L.M., Hernández, M.S., Fernández-Trujillo, J.P., 2018. Variation in the fatty acid profile and quality of "Hass" avocados preserved during cold storage. *Acta Hortic.* 1194, 143. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1194.143>.
- Scalschi, L., Sanmartin, M., Camanes, G., Troncho, P., Sánchez-Serrano, J.J., García-Agustín, P., Vicedo, B., 2015. Silencing of *OPR3* in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *Plant J.* 81, 304–315. <https://doi.org/10.1111/tpj.12728>.
- Spichal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M., Schmölling, T., 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* 45, 1299–1305. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch132>.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2117–2127.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., Farmer, E.E., 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12837–12842. <https://doi.org/10.1073/pnas.211311098>.
- Tadiello, A., Longhi, S., Moretto, M., Ferrarini, A., Tononi, P., Farneti, B., Bussato, N., Vrhovsek, U., Dal Molin, A., Avanzato, C., Biasoli, F., Cappellin, L., Scholz, M., Velasco, R., Trainotti, L., Delledonne, M., Costa, F., 2016. Interference with ethylene perception at receptor level sheds light on auxin and transcriptional circuits associated with the climacteric ripening of apple fruit (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant J.* 88, 963–975. <https://doi.org/10.1111/tpj.13306>.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., Sugiyama, T., 2001. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize regulator. *Plant Cell Physiol.* 42, 85–93. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce009>.
- Tateishi, A., Shiba, H., Ogihara, J., Isobe, K., Nomura, K., Watanabe, K., Inoue, H., 2007. Differential expression and ethylene regulation of β -galactosidase genes and isozymes isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Postharvest Biol. Tec.* 45, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.009>.
- Toshima, E., Nanjo, Y., Komatsu, S., Abe, T., Matsuura, H., Takahashi, K., 2014. Proteomic analysis of *Physcomitrella patens* treatment with 12-oxo-phytodienoic acid, an important oxylipin in plants. *Biosci. Biotech. Biochem.* 78, 946–953. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.912112>.
- Trainotti, L., Tadiello, A., Casadoro, G., 2007. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruit comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *J. Exp. Bot.* 58, 3299–3308. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm178>.
- Tucker, M.L., Laties, G.G., 1984. Interrelationship of gene expression, polysome prevalence and respiration during ripening of ethylene and/or cyanide-treated avocado fruit. *Plant Physiol.* 74, 307–315. <https://doi.org/10.1104/pp.74.2.307>.
- Varsani, S., Grover, S., Zhou, S., Koch, K.G., Huang, P., Kolomiets, M.V., Williams, W.P., Heng-Moss, T., Sarath, G., Luthe, D.S., Jender, G., Louis, J., 2019. 12-Oxo-phytodienoic acid acts as a regulator of maize defense against corn leaf aphid. *Plant Physiol.* 179, 1402–1415. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01472>.
- Wang, W., Bostic, T.R., Gu, L., 2010. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chem.* 122, 1193–1198.
- Wang, F., Guo, Z., Li, H., Wang, M., Onac, E., Zhou, J., Xia, X., Shi, K., Yu, J., Zhou, Y., 2016. Phytochrome A and B function antagonistically to regulate cold tolerance via abscisic acid-dependent jasmonates signaling. *Plant Physiol.* 170, 459–471. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01171>.
- Wang, X., Zeng, W., Ding, Y., Wang, Y., Niu, L., Yao, J.L., Pan, L., Lu, Z., Cui, G., Li, G., Wang, Z., 2019. Peach ethylene response factor PpeERF2 represses the expression of ABA biosynthesis and cell wall degradation genes during fruit ripening. *Plant Sci.* 283, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.02.009>.
- Woolf, A.B., Bowen, J.H., Ferguson, I.B., 1998. Preharvest exposure to the sun influences postharvest responses of "Hass" avocado fruit. *Postharvest Biol. Tec.* 15, 143–153.
- Woolf, A.B., Cox, K.A., White, A., Ferguson, I.B., 2003. Low temperature conditioning treatments reduce external chilling injury of "Hass" avocados. *Postharvest Biol. Tec.* 28, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.04.015>.
- Woolf, A.B., Requejo-Tapia, C., Cox, K.A., Jackman, R.C., Günson, A., Arpaia, M.L., White, A., 2005. 1-MCP reduces physiological storage disorders of "Hass" avocados. *Postharvest Biol. Tec.* 35, 43–60. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.07.009>.
- Yahia, E.M., 2012. Avocado. In: Rees, D., Farrell, G., Orchard, J. (Eds.), *Post-Harvest: Science and Technology: Perishables*. Blackwell Publishing Ltd., Iowa, USA, pp. 159–186. <https://doi.org/10.1002/9781444354652.ch8>.
- Zafar, T., Sidhu, J.S., 2011. Avocado: production, quality and Major processed products. In: Sinha, N.K. (Ed.), *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*. Blackwell Publishing Ltd., Iowa, USA, pp. 525–543.
- Zamorano, J., Dopico, B., Lowe, A.L., Wilson, I.D., Grierson, D., Merodio, C., 1994. Effect of low temperature storage and ethylene removal on ripening and gene expression changes in avocado fruit. *Postharvest Biol. Tec.* 4, 331–342.

Capítol 3. Determinació de la qualitat de fruits d'alvocat submergits en una solució de piridoxal 5'-fosfat

Chapter 3. Quality determination of avocado fruit immersed in a pyridoxal 5'-phosphate solution

Celia Vincent i Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals i Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Espanya

Acceptat i en revisió a **Journal of Food Composition and Analysis** [Ref: JFCA-D-01731R3] el dia 22 de febrer 2022

RESUM

La vitamina B₆ té una funció crucial en el metabolisme vegetal actuant com a cofactor en més de 140 reaccions enzimàtiques a més d'actuar amb una potent funció antioxidant durant el creixement i desenvolupament d'arrels i fulles, tot i així encara no es coneix el rol de la vitamina B₆ durant la maduració comercial del fruit. En el present estudi s'exploren pràctiques simples per millorar el contingut endogen de vitamina B₆ en alvocats, mesurats amb cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i s'avalua l'impacte i a través de quin mecanisme l'aplicació de piridoxal 5'-fosfat (PLP) pot influenciar a la qualitat del fruit durant la maduració comercial i l'emmagatzematge en fred. S'ha emfatitzat en la possible relació entre la vitamina B₆ i les fitohormones mitjançant anàlisi de perfils hormonals per cromatografia líquida de molt alta resolució acoblada a anàlisi de masses en tàndem (UHPLC Esi-MS/MS). Es va hipotetitzar que el PLP podria millorar paràmetres de qualitat en el fruit i allargar la seva vida útil. L'alvocat 'Bacon' té uns nivells de vitamina B₆ baixos quan es compara amb els de 'Hass' i altres varietats, però estratègies bàsiques com l'emmagatzematge en fred durant un període de temps curt pot doblar els nivells de vitamina B₆. L'aplicació exògena de vitamina B₆ pot endarrerir lleugerament la maduració comercial de l'alvocat a temperatura ambient causant una reducció en l'estovament del mesocarpi, possiblement associat a una resposta hormonal modulada preferiblement per citocinines. En l'emmagatzematge en fred a llarg termini, el PLP indueix l'acumulació de γ -tocotrienol i plastocromanol-8, d'aquesta manera millorant la composició de tococromanols en el fruit. En conclusió, el contingut de vitamina B₆ en l'alvocat de la varietat 'Bacon' pot millorar a través de pràctiques simples i les aplicacions exògenes de PLP poden ser emprades amb l'objectiu de retardar la maduració comercial de l'alvocat a temperatura ambient o d'augmentar el contingut de tococromanols en alvocats emmagatzemats en fred.

Quality determination of avocado fruit immersed in a pyridoxal 5'-phosphate solution

Celia Vincent and Sergi Munné-Bosch*

Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, and Research Institute of Nutrition and Food Safety (INSA), University of Barcelona, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

*Correspondence to: S. Munné-Bosch, *Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, and Research Institute of Nutrition and Food Safety (INSA), University of Barcelona, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain*; Email: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch)

Abstract

Vitamin B6 plays a crucial role in plant metabolism. It acts as a cofactor in over 140 reactions and has a potent antioxidant function, as described in plant growth and development related to root and leaf tissues, but not yet in fruit ripening. Here, we aimed to explore simple practices to improve endogenous content of vitamin B6 in avocados, measured by high-performance liquid chromatography (HPLC), and to evaluate to what extent and through which mechanisms pyridoxal-5'-phosphate (PLP) treatment influences fruit quality during postharvest ripening and cold storage. Emphasis was put on evaluating a possible link between vitamin B6 and phytohormones by performing hormonal profiling analyses using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). We hypothesized that PLP could improve quality parameters and prolong the shelf life of fruit. Results showed that Bacon avocados had a low vitamin B6 content compared to Hass and other varieties. However, basic techniques like short-term cold storage increased the vitamin B6 content 2.5 fold. Exogenous application of vitamin B6 slightly delayed avocado ripening at room temperature and caused reduced softening in the mesocarp, which was related to a hormonal response that was most likely mediated by cytokinins. In long-term cold-stored avocados, PLP treatment triggered γ -tocotrienol and plastoquinone-8 accumulation, which improved the tocopherol composition in the fruit. In conclusion, the vitamin B6 content of Bacon avocados can be improved through simple practices. Exogenous applications of PLP can be used either to delay ripening of avocados at room temperatures or to increase tocopherol content in cold-stored fruit.

Keywords: *Persea americana* Mill.cv. Bacon, cold storage, cytokinins, fruit firmness, fruit ripening, tocopherols, postharvest, vitamin B6

1. Introduction

Vitamin B6 is the generic name of a group of interconverting vitamers, including pyridoxine, pyridoxamine, pyridoxal and their phosphorylated derivatives, whose most active form is pyridoxal 5'-phosphate (PLP). PLP is one of the most versatile organic catalysts, since it acts as a cofactor in over 140 enzymatic reactions of plant metabolism, including reactions catalyzed by oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases and isomerases, which act in diverse reactions such as transamination, racemization, α -decarboxylation, aldol cleavage, and β and γ elimination and replacement (Asensi-Fabado and Munné-Bosch, 2010; Colinas et al., 2016; Drewke and Leinster, 2001; Mooney and Hellman, 2010; Percudani and Peracchi, 2009). Pyridoxine and its vitamers exist in most living organisms, in which synthesis is carried out through the salvage pathway. However, a *de novo* biosynthetic route is described only in some groups, including plants, which represent the main source of vitamin B6 vitamers. Otherwise, animals can exclusively obtain vitamin B6 through exogenous intake with the diet (Mooney and Hellman, 2010). Vitamin B6 plays an essential role in human health in the prevention of a number of diseases (Stach et al., 2021).

Studies on vitamin B6 in plants have been mainly performed in root, shoot and leaf tissues. The results show that pyridoxine and its vitamers play a cofactor role in cell metabolism and exert an important antioxidant role, which is thought to complement that of other vitamins, such as ascorbic acid and α -tocopherol, by quenching and scavenging singlet oxygen and superoxide anion (Bilski et al., 2000; Havaux et al., 2009; Huang et al., 2013; Gorelova et al., 2022). Hence, exogenous application of vitamin B6 has been reported to help in cell protection and photoprotection in leaves as it limits reactive oxygen species (ROS) accumulation and singlet oxygen-mediated oxidative damage (Havaux et al., 2009). Additionally, vitamin B6 is associated with plant growth and

development, since *Arabidopsis thaliana pdx* mutants with pyridoxine deficiency showed impaired ethylene and auxin synthesis in the roots (Boycheva et al., 2015). This suggests that PLP cofactor activity is necessary for the metabolism of phytohormones. Importantly, both biotic and abiotic stress tolerance improve through overexpression of vitamin B6 biosynthesis-related genes, and vitamin B6-deficient plants show higher rates of ROS production and eventually oxidative damage (Bagri et al., 2018). Moreover, vitamin B6 has been reported to act in plant disease resistance against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* (Zhang et al., 2014; 2015). However, although knowledge of this vitamin is extensive in plant roots and leaves, very little is known about its function in fruit and particularly in fruit ripening. To our knowledge, the latter has been investigated in one previous study only, in which an increase in soluble sugars and β -carotene was observed after exogenous pyridoxine treatments during banana ripening (Lo'ay and EL-Khateeb, 2019).

Avocados are highly appreciated by consumers due to their organoleptic and nutraceutical properties. They have high amounts of α -tocopherol, a characteristic fatty acid composition, and relatively high vitamin B6 content compared to other fruit (USDA, 2018). Several avocado varieties are now available on shop shelves due to hybridization and pollination techniques that have been performed over time from the original Mexican cultivars. This has led to a great diversity and heterogeneity in the fruit (Yahia, 2013). Currently, avocados are commercialized worldwide and a range of storage techniques and other post-harvest treatments have been implemented to prolong their shelf life. Among them, cold storage is one of the most common and simple strategies that has been developed so far. It prevents rapid climacteric ripening of the fruit and the consequent waste due to fruit over-ripening (Arpaia et al., 2018).

Here, we aimed to explore various simple strategies to increase vitamin B6 content in avocado and gain new insights into our understanding of the role of vitamin B6 in avocado ripening. We studied the effects of vitamin B6 on fruit ripening at room temperature and how PLP influences fruit quality during cold storage for 30 days. Special emphasis was given to mechanisms of action of PLP in relation to its antioxidant function or possible link with phytohormones by performing hormonal profiling analyses using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). We hypothesized that PLP could improve quality parameters and prolong the shelf life of avocados.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Pyridoxine and PLP ($\geq 98\%$ purity in both cases) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and VWR (Barcelona, Spain), respectively. All vitamin E (tocopherols and tocotrienols) standards were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Tocol internal standard ($\geq 98\%$ purity) was obtained from Universal Biologicals (Cambridge, UK). Phytohormone standards and deuterium-labelled hormones for UHPLC-MS/MS analyses were purchased from Olchemim (Olomouc, Czech Republic). Methanol, acetonitrile, isopropanol, *n*-hexane and dioxane of HPLC grade were obtained from VWR (Barcelona, Spain). All other chemicals and reagents were of analytical quality grade.

2.2 Experimental design, treatments and samplings

To evaluate the effect of avocado varieties on vitamin B6 accumulation (Experiment 1), fruit from *Persea americana* Mill. of different varieties, including Hass, Fuerte, Bacon and Govín, were purchased from local suppliers and supermarkets. We also examined the effect of origin in Hass avocados by comparing Hass avocados from Spain, Brazil, Chile

and Peru. Hass avocados from Spain, Brazil and Peru, identified as such on their labels, were obtained from a supermarket in Barcelona (NE Spain). Hass avocados from Chile were obtained from a local market in their country of origin and transported to the laboratory. Finally, Fuerte avocados from Chile and Govín avocados from Cuba were obtained from local markets in their country of origin, and Bacon avocados were obtained from a commercial orchard in Málaga (south Spain). In all cases, on arrival at the laboratory, the fruit were kept at room temperature ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) until full ripening. When firmness attained 3N, fruit mesocarp was obtained, immediately immersed in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. Four samples of avocado fruit per variety and origin were used in the experiments. For experiments 2, 3 and 4, Bacon avocados were collected at commercial harvest maturity (between 20–24% dry matter) from a commercial orchard in Málaga (south Spain) and brought immediately to the laboratory under a controlled temperature of $8\text{--}10^{\circ}\text{C}$. For Experiment 2, we separately tested the effects of the harvesting campaign, short-term cold storage, and single or multiple PLP application on vitamin B6 content in Bacon avocados. The influence of the harvesting campaign was evaluated by collecting fruit from 2018 and 2020 from the same orchard. The effects of short-term cold storage were evaluated by storing fruit for 2 days at 4°C in a cold chamber and comparing it to non-stored fruit. The effect of single or multiple PLP application was examined by determining the vitamin B6 content of fruit exposed to single or multiple (every 10 days) exogenous PLP treatments, through immersion in a solution containing 9 mM PLP, on cold-stored fruit for up to 30 days. PLP treatment was performed by immersing fruit in a solution containing 9 mM of PLP ($\geq 98\%$ purity) + 0.01% Tween 20 and the results were compared to controls that were immersed in water containing surfactant only.

For Experiment 3, Bacon avocados were divided into two groups: PLP-treated and control fruit. Then, their ripening at room temperature ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) was followed for five days. PLP treatment was performed by immersing fruit in a solution containing 9 mM of PLP ($\geq 98\%$ purity) + 0.01% Tween 20, while control fruit was immersed in water containing surfactant only. Various quality parameters, antioxidant content and hormonal profiling were measured at three physiological states, including harvest (HAR), 2 days after harvest corresponding to optimum ripening (OPT), and 5 days after harvest corresponding to full ripening (FR). Therefore, two factors and their interaction were evaluated (PLP treatment and fruit physiological state).

For Experiment 4, Bacon avocados were divided into two groups: PLP-treated fruit (with a single application) and controls, as described before for Experiment 3. However, in this case, quality parameters, antioxidant content and hormonal profiling were measured at the beginning of the experiment and after 10 days, 20 days and 30 days of cold storage. Therefore, two factors and their interaction were evaluated here (PLP treatment and time of cold storage).

For all experiments, fruit size and maturity did not differ between groups at the start of the experiments, since a previous selection was performed for visual uniformity. In all cases (including all treatments), fruits were kept in the dark throughout the study. All PLP treatments consisted of immersion of fruit in a solution of 9 mM PLP for 30 min. Sampling was always performed using the mesocarp tissue of six fruits per treatment and time of measurement. For each sampling, avocados were weighed and then the peel and stone were removed from half of the fruit. The mesocarp tissue of this half was cut into pieces and immediately frozen in liquid nitrogen. Fruit firmness was always obtained in fresh samples, while all biochemical analyses (vitamin B6, lipid peroxidation, chlorophylls, tocopherols and hormonal profiling) were performed on mesocarp

samples that were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analyses. Before extraction for the biochemical analyses, all the sample material was taken to obtain a pooled sample, from which 100 mg were then used for each analysis (except for hormonal profiling, which was performed with 50 mg of sample).

2.3 Fruit firmness

Fruit firmness testing was used as a measure of ripeness using a FT 327 penetrometer (QA Supplies, Norfolk, VA, USA) with a 6 mm cone. This measurement consisted of pushing the cone into the avocado mesocarp while avoiding contact with the stone and then determining firmness, as recommended by the manufacturer.

2.4 Vitamin B6

Vitamin B6 was determined using HPLC, as described previously (Czégény et al., 2019), with some modifications. In brief, 100 mg of sample was extracted with 1 mL of 50 mM phosphoric acid solution using an ultrasonication bath for 15 min (Bransonic ultrasonic bath 2800, Emerson Industrial, Danbury, CT, USA). Then, the extract was vortexed and centrifuged for 15 min at 9980 g at 4°C using a Hettich Universal 32R centrifuge (Thermo Fischer Scientific, Reinach, Switzerland). The supernatant was collected and re-extraction was performed following the same procedure. The collected supernatants were filtered through a $0.45\ \mu\text{m}$ nylon syringe filter (Phenomenex, Torrance, CA, USA), transferred into vials and analyzed by HPLC. A gradient was employed with two eluents: 50 mM phosphoric acid as eluent A and 100 mM phosphoric acid with acetonitrile (1:1, v/v) as eluent B, at a flow rate of $0.8\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Eluent A started at 100% was run for 10 min, then eluent B was increased linearly up to 100% in 5 min. Subsequently, the column was re-equilibrated for 15 min with eluent A. A Synergy $4\ \mu\text{m}$ Hydro-RP80 Å, 250×4.6 mm, column (Phenomenex, Spain) was used. Quantification was performed using a Jasco fluorescence detector (FP-1520, Tokyo, Japan) programmed at excitation and emission

wavelengths of 290 nm and 395 nm, respectively. Pure PLP and pyridoxine (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) were used as standards to construct the calibration curves for quantification (Table S1).

2.5 Lipid peroxidation

The extent of lipid peroxidation was determined by measuring primary (lipid hydroperoxide) and secondary (malondialdehyde, MDA) lipid peroxidation products, as follows. For lipid hydroperoxide analyses, samples (100 mg) were repeatedly (three times) extracted with 1 mL methanol + 0.01% butylhydroxytoluene (BHT) (w/v) at 4°C using 30 min of ultrasonication (Bransonic ultrasonic bath 2800). After centrifugation, the supernatants were collected, combined and used for analyses using the Fox-2 reagent (consisting of a solution of 90% methanol [v/v] containing 25 mM sulfuric acid, 4 mM BHT, 250 μ M iron sulfate ammonium (II) and 10 μ M xylenol orange), as described (Bou et al., 2008). Absorbances were measured at 560 and 800 nm. A calibration curve using hydrogen peroxide 37% (v/v) was used for quantification.

The thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay, which considers the possible influence of interfering compounds, was used to estimate MDA content (Hodges et al. 1999). In brief, 100 mg of sample was extracted with 3 mL of ethanol 80% (v/v) containing 0.01% (w/v) BHT, using ultrasonication for 45 min (Bransonic ultrasonic bath 2800). After centrifuging at room temperature for 13 min at 12300 g (Hettich Universal 32R centrifuge, Thermo Fischer Scientific), the supernatant was recovered, and the pellet was re-extracted twice using the same procedure. Then, two tubes were used: (a) - TBA, with 1 mL extract + 1 mL 20% trichloroacetic acid (w/v) with 0.01% BHT (w/v) and (b) + TBA, with 1 mL extract + 1 mL 20% trichloroacetic acid (w/v), 0.01% BHT (w/v) and 0.65% thiobarbituric acid (w/v). Tubes were incubated for 25 min at 95°C. Then the reaction was stopped by maintaining them at 4°C for 10 min. After centrifugation at 12300

g at room temperature for 5 min (Hettich Universal 32R centrifuge, Thermo Fischer Scientific), the MDA content in samples was analyzed by spectrophotometry at 440, 532 and 600 nm and quantified using the equations developed previously (Hodges et al., 1999), as follows:

$$\text{Equation A} = [(\text{Abs } 532\text{TBA}+) - (\text{Abs } 600\text{TBA}+) - (\text{Abs } 532\text{TBA} - \text{Abs } 600\text{TBA}-)]$$

$$\text{Equation B} = [(\text{Abs } 440\text{TBA}+) - (\text{Abs } 600\text{TBA}+) * 0.0571]$$

$$\text{MDA (nmol/mL)} = [(A-B)/157000] \times 10^6$$

2.6 Chlorophylls

To determine total chlorophyll content, samples (100 mg) were extracted in 1 mL of methanol + 0.01% BHT using ultracentrifugation, as explained before for the other analyses. Supernatants were collected and centrifuged for 10 min at 20800 g at 4°C (Hettich Universal 32R centrifuge, Thermo Fischer Scientific). Chlorophylls were measured spectrophotometrically by reading absorbances at 653, 666 and 750 nm (modified from Wang et al. 2010), as follows:

$$\text{Chlorophyll a (Chl a)} = [12.21 \times (A_{666} - A_{750})] - [2.81 \times (A_{653} - A_{750})]$$

$$\text{Chlorophyll b (Chl b)} = [20.13 \times (A_{653} - A_{750})] - [5.03 \times (A_{666} - A_{750})]$$

2.7 Tocochromanols

The quantification of tocochromanols was performed as described previously (Fleta-Soriano and Munné-Bosch, 2017), with some modifications. A total of 100 mg of the sample was extracted with 1 mL of methanol containing 0.01% (w/v) BHT and 5 ppm (w/v) of tocol (Universal Biologicals, Cambridge, UK, ≥98% purity) as an internal standard. Samples were vortexed for 20 s and then subjected to 30 min of ultrasonication (Branson ultrasonic bath 2800). Samples were centrifuged for 10 min at 20800 g at 4°C

(Hettich Universal 32R centrifuge, Thermo Fischer Scientific) and the pellet was re-extracted following the same procedure. Supernatants were collected and filtered using a hydrophobic PTFE filter 0.22 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Tocochromanols were separated by HPLC at room temperature using an Inertsil 100A column (5 μm , 30 x 250 mm, GL Sciences Inc., Japan). A Jasco fluorescence detector (FP-1520, Tokyo, Japan) was used for the quantification and a calibration curve was established with each of the tocochromanols analyzed (Extrasynthese, Genay, France, $\geq 98\%$ purity; Table S1) and corrected with the internal standard recovery, which was always above 97%.

2.8 Hormonal profiling

The endogenous content of phytohormones, including auxin, indole-3-acetic acid, cytokinins (*trans*-zeatin, *trans*-zeatin riboside, 2-isopentenyl adenine and isopentenyl adenosine), gibberellins (GA1, GA3, GA4 and GA7), abscisic acid (ABA), the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), salicylic acid and jasmonates (12-*oxo*-phytodienoic acid, jasmonic acid and jasmonoyl-isoleucine), were measured using ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem (UHPLC-ESI MS/MS; Vincent et al., 2020a). Fifty mg of mesocarp sample was extracted with 400 μL methanol:isopropanol:acetic acid 50:49:1 (v/v/v) using vortex and ultrasonication (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, Danbury, CT, USA) for 30 min. During the extraction process, deuterium-labelled hormones (including d₄-SA >97%, d₆-ABA >98%, d₅-JA >95%, d₅-IAA >97%, d₂-GA₁ >90%, d₂-GA₃ >90%, d₂-GA₄ >90%, d₂-GA₇ >90%, d₄-ACC >98%, d₆-2iP >98%, d₆-IPA >98%, d₅-Z >98% and d₅-ZR >97% purity; Olchemim, Olomouc, Czech Republic) were added as internal standards and used subsequently for quantification according to the standard calibration curves of each phytohormone (Tables S2, S3). Two re-extraction steps were conducted as described before, and after collecting and pooling all supernatants, the extract was centrifuged for

10 min at 20800 *g* at 4°C (Hettich Universal 32R centrifuge, Thermo Fischer Scientific), and finally filtered using a 0.22 µm PTFE (polytetrafluoroethylene, Waters, Milford, MS, USA) filter before UHPLC-ESI MS/MS analyses (Vincent et al., 2020a).

2.9 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA for experiment 1 (concerning the determination of vitamin B6 content in the different varieties, Table 1) and for experiment 2, part A (the influence of the harvest year campaign on vitamin B6 levels, Fig. 1A). Two-way ANOVAs with Duncan posthoc tests were used for experiment 2, part B (related to the determination of short-term cold storage influence on vitamin B6 content, Fig. 1B) and part C (effect of single/multiple PLP application on vitamin B6 content in cold-stored avocados, Fig. 1C). Two-way ANOVAs with Duncan posthoc tests were also used for Experiment 3 (Figs. 2 and 3) and Experiment 4 (Figs. 4 and 5). In all experiments, it was indicated with asterisks when treatments differed from controls at each time of measurement (IBS SPSS Statistics 19; SPSS Inc., Illinois, USA). Differences were considered significant when *P* values were under the significance level $\alpha=0.05$.

3. Results

3.1 Cold storage and exogenous PLP treatment are simple strategies to increase vitamin B6 content in avocados

Among the varieties and origins tested, a relatively small amount of total vitamin B6 was detected in Bacon avocados from Spain compared to other varieties (Table 1), with 0.09 mg PLP per 100 g of edible fruit (which corresponds to 4.7 µg per g of dry weight), and 0.004 mg of pyridoxine per 100 g of edible fruit (0.23 µg per g of dry weight). Hass was the variety with the highest vitamin B6 content of all those studied, with values ranging

from 0.19 to 0.45 mg PLP in Hass varieties from Peru and Spain, respectively. The lowest vitamin B6 amounts were found in the Govín variety from Cuba and intermediate levels were found in the Fuerte variety from Chile. Nevertheless, all varieties of avocado from all origins coincided in the preferable accumulation of the active vitamer PLP rather than pyridoxine. The latter was present at very low or even non-detectable levels, depending on the variety and origin (Table 1).

The results showed that the harvest campaign can influence vitamin B6 content and composition in Bacon avocados, since significant differences were observed in total vitamin B6, PLP and pyridoxine content between fruit harvested during 2018 and 2020 (Fig. 1A). However, differences in the harvesting campaign were relatively low compared to differences caused by short-term cold storage. Cold storage for two days at 4°C increased 2.5-fold the vitamin B6 levels, which mainly affected the content of the PLP vitamer (Fig. 1B). A 4-fold increase in PLP was observed when cold-stored avocados were treated with an exogenous application of PLP and kept at low temperatures for long periods of time (up to 30 days). A single application of PLP just before cold storage significantly increased PLP levels for a month, which then decreased at 30 days of cold storage. Only repeated applications of PLP (every 10 days) kept the vitamin B6 content high over time (Fig. 1C).

3.2 Effect of exogenous PLP application on fruit ripening and quality

Once the influence of the exogenous treatment on vitamin B6 content had been determined, the effect on ripening and quality was assessed in Bacon avocados kept at room temperature ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) for 2 and 5 days after harvest. Then, the effects on phenotype were evaluated during ripening progression. This was indicated by firmness and chlorophyll content, together with the MDA and hydroperoxides that are closely associated with lipid peroxidation, which is consistent with ripening evolution. Fruit

softening occurred over time and showed rapid firmness loss the first two days, followed by progressive loss from day 2 to day 5, which corresponded with optimum and full ripening conditions, respectively (Fig. 2A). PLP treatment influenced fruit firmness and reduced softening after two days of ripening, according to the optimum conditions. However, when ripening was complete, the PLP effect was not significant (Fig. 2A). Moreover, PLP did not affect fruit appearance, as indicated by the chlorophyll content (Fig. 2A, 2B). This response coincided with phytohormone changes related with ripening. ACC and ABA were not affected by exogenous PLP treatment, but the contents of isopentenyl adenosine (IPA) and 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA), and the total cytokinin/ACC, IPA/ACC and OPDA/ACC ratios increased in PLP-treated avocados in the optimum condition (Table S4, Figs. S1, S2, S3 and S4). In contrast, *trans*-zeatin riboside (ZR) was lower in PLP-treated fruit than in controls at full ripening, which led to decreases in the ZR/ACC and ZR/ABA ratios (Table S4, Fig. S3). No other parameters related to chlorophyll content, hydration or the extent of lipid peroxidation were influenced by PLP treatment during ripening at room temperature (Fig. 2A).

The effect of PLP treatment on tocochromanols was assessed in Bacon avocado fruit with high vitamin E content undergoing ripening. The application of PLP did not influence α -tocopherol content. However, γ -tocotrienol content varied at full ripening conditions, which showed a two-fold increase in PLP-treated fruit compared to controls (Fig. 3B, 3E). Since γ -tocotrienol was present in relatively low amounts compared to other vitamin E compounds, such as α -tocopherol, the PLP treatment did not have a significant influence on total vitamin E content (Fig. 3A).

3.3 Effects of exogenous PLP application on cold-stored fruit in the long-term

The exogenous application of PLP did not affect fruit firmness, fruit biomass, fruit hydration, total chlorophyll content and the extent of lipid peroxidation, as indicated by MDA and hydroperoxide content, in avocados stored at low temperatures up to 30 days (Fig. 4). PLP treatment did not influence endogenous content of phytohormones in the mesocarp (Table S5). However, the treatment with PLP increased γ -tocotrienol and plastochromanol-8 content relative to controls (Fig. 5). This might be related to better preservation of chloroplast integrity in response to the application of PLP, since chlorophyll content increased in response to the exogenous treatment compared to controls (Fig. 4C).

4. Discussion

4.1 Cold storage and exogenous PLP treatment are simple strategies to improve vitamin B6 content in avocados

The present study found that the Bacon variety contains considerably smaller amounts of vitamin B6 than other varieties like Hass or Fuerte, which are highly relevant varieties in the current avocado market. However, the endogenous vitamin B6 content can be easily manipulated before consumption, for example, by maintaining cold storage for 2 days only. As shown here, this can double the amount of vitamin B6 in Bacon avocados. Since endogenous vitamin E content is not altered by low temperature treatments in the short term (Vincent et al., 2020b), cold storage for two days may be a valuable means of increasing vitamin B6 content, while vitamin E content is kept high in Bacon avocados. Although to a much lower extent, the year of harvest may also be a source of variability in vitamin B6 content and composition in Bacon avocados. Consumers must therefore be informed of the antioxidant composition. Vitamin B6 is beneficial for plants, in which it

acts as a cofactor in many enzymatic reactions (Mooney and Hellman, 2010), has an antioxidant and photoprotective function (Havaux et al., 2009), and increases biotic stress tolerance (Zhang et al., 2014). It also benefits human health, since as a vitamin its intake is essential for human health (Calderón-Ospina and Nava-Mesa, 2019; Jayedi and Zargar, 2018). Fruit can serve as a source of this compound. However, considering the relatively low vitamin B6 content in Bacon avocados, priority should be given to postharvest practices that aim to increase endogenous levels. Furthermore, if avocados are to be conserved for long periods of time at low temperatures, for instance during transportation or storage before they are displayed on supermarket shelves, the combination of cold temperatures with the exogenous application of PLP can significantly increase endogenous vitamin B6 levels. It can even lead to higher levels than Hass avocados and maintain those levels for a long time. This would result in higher daily intake of vitamin B6 if these fruit are consumed. Therefore, the immersion of fruit in PLP solutions could be an effective biofortification method in avocados.

4.2 Effect of exogenous application on fruit ripening and quality

Avocados ripening at room temperature ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) showed a slight delay in the progression of fruit softening when the fruit were treated with PLP. Fruit firmness can be maintained at an optimum state for less than a day but is significant and occurs through a hormonal response. This hormonal response seemed to be related to cytokinin and jasmonate metabolism, since both IPA and OPDA (precursors of active cytokinins and jasmonates, respectively) are related to ripening inhibitory aspects and defense functions, respectively (Sang et al., 2011). These PLP-related differences in endogenous IPA and OPDA might delay ripening events and increase the defense against pathogens through a balance established with ethylene. The balance of these phytohormones with ethylene is reflected as increased IPA/ACC, CKs/ACC and OPDA/ACC ratios that together may

govern some physiological and biochemical aspects related to cell wall modifications and fruit firmness (Ainalidou et al., 2016; Massolo et al., 2014). However, these PLP-induced changes occurred transiently (both PLP-treated and control fruit reached fully ripened stage after 5 days) and we currently know very little about cytokinin and jasmonate signaling related to ripening and PLP. However, PLP treatment led to a slight increase in the accumulation of γ -tocotrienols, which were present in low amounts in avocados but increased in PLP-treated fruit compared to controls. This aspect undoubtedly requires further investigation.

4.3 Effects of exogenous PLP application during long-term cold storage

PLP could be applied for long-term storage of avocados to increase endogenous vitamin B6 content, as described in Section 4.1, if fruit quality is not negatively affected by exogenous PLP treatments. This was the case up to 30 days of cold storage, as shown in our study in which fruit maintained its firmness and a similar extent of lipid peroxidation as the controls. Interestingly, tocopherol content and composition differed between PLP-treated and control fruit, since an increase in γ -tocotrienol and plastochromanol-8 was observed without affecting tocopherol levels during the entire period of storage after PLP treatment. When fruit were stored at low temperatures, PLP treatment enhanced plastochromanol-8 and γ -tocotrienol accumulation in avocado mesocarp. This may have triggered a detoxifying response against ROS generated from cold exposure and stress initiation, which would promote protection in the tissue. Moreover, PLP seems to have a protective function against chlorophyll degradation through oxidative processes mediated by plastochromanol-8 and γ -tocotrienol (Fernández-Marín et al., 2021; Matringe et al., 2008), although further research must be conducted to further elucidate the molecular link between PLP, tocopherols and chlorophylls.

Enhanced tocopherol accumulation in PLP-treated avocados could positively influence human nutrition, since many beneficial properties have been attributed to these antioxidant compounds and more specifically to γ -tocotrienol intake (Eitsuka et al., 2013; Ji et al., 2013; Nawawi et al., 2013). However, the increase in tocopherols was quantitatively very modest and may have little effect on the overall daily intake of these antioxidants. PLP-treated fruit contained much higher amounts of vitamin B6. This has a crucial function related to its neuroprotective and antioxidant effects, and is therefore of paramount importance in the nervous system. Therefore, treating fruit with PLP, which is not a great cost in the supply chain and could probably be assumed by most farmers and supermarkets, may be considered in postharvest processes.

5. Conclusion

Bacon avocados had a lower vitamin B6 content than the Hass variety. However, simple strategies like short-term cold storage and exogenous application of PLP considerably increased endogenous vitamin B6 content while maintaining vitamin E content. Exogenous application of PLP slightly delayed fruit ripening at room temperature by influencing fruit softening through a hormonal effect. Furthermore, application of PLP in cold stored fruit for up to 30 days increased γ -tocotrienol and plastochromanol-8 content. Thus, fruit immersion in a PLP solution enhanced endogenous vitamin B6 and tocopherol content in cold-stored avocados. In conclusion, quality can be improved in avocado fruit immersed in a pyridoxal 5'-phosphate solution.

Acknowledgements

We are very grateful to the avocado suppliers (Hortec, Barcelona, Spain) for treating the fruit carefully. We are also indebted to the technical staff of the *Serveis Científico-Tècnics*

at the University of Barcelona for their help with biochemical analysis. Finally, we also thank Clara Mirabent for her help with samplings and Michael Maudsley for English correction of the manuscript.

References

- Ainalidou, A., Tanou, G., Belghazi M., Samiotaki, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A., Karamanoli, K., 2016. Integrated analysis of metabolites and proteins reveal aspects of the tissue-specific function of synthetic cytokinin in kiwifruit development and ripening. *J. Proteom.* 143, 318–333.
- Arpaia, M.L., Collin, S., Sievert, J., Obenland, D., 2018. ‘Hass’ avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. *Postharvest Biol. Tec.* 140, 76–84.
- Asensi-Fabado, M.A., Munné-Bosch, S., 2010. Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends Plant Sci.* 15, 582-592.
- Bagri, S.D., Upadhyaya, D.C., Kumar, A., Upadhyaya, C.P., 2018. Overexpression of *PDX-II* gene in potato (*Solanum tuberosum* L.) leads to the enhanced accumulation of vitamin B6 in tuber tissues and tolerance to abiotic stresses. *Plant Sci.* 272, 267-275.
- Bilski, P., Li, M.Y., Ehrenshaft, M., Daub, M.E., Chignell, C.F., 2000. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem. Photobiol.* 71, 129–134.
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E.A., Guardiola, F., 2008. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylene orange method: a review of the factors that influence the method’s performance. *Anal. Biochem.* 377, 1-15.
- Boycheva, S., Dominguez, A., Rolcik, J., Boller, T., Fitzpatrick, T.B., 2015. Consequences of a deficit in vitamin B6 biosynthesis de novo for hormones homeostasis and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 167, 102-117.

- Calderón-Ospina, C.A., Nava-Mesa, M.O., 2019. B vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine and cobalamin. *CNS Neurosci. Ther.* 26, 5-13.
- Colinas, M., Eisenhut, M., Tohge, T., Pesquera, M., Fernie, A.R., Weber, A.P.M., Fitzpatrick, T.B., 2016. Balancing of B6 vitamers is essential for plant development and metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28, 439-453.
- Czégény, G., Korösi, L., Strid, Å., Hideg, E., 2019. Multiple roles of vitamin B₆ in plant acclimation to UV-B. *Sci. Rep.* 9, 1259.
- Drewke, C., Leistner, E., 2001. Biosynthesis of vitamin B6 and structurally related derivatives. *Vitam. Horm.* 61, 121–155.
- Eitsuka, T., Nakagawa, K., Miyazawa, T., 2013. Antiangiogenic effects of tocotrienol. In *Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols*, 2nd ed.; Tan, B., Ed.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.
- Fernández-Marín, B., Sáenz-Ceniceros, A., Solanki, T., Robson, T.M., García-Plazaola, J.I., 2021. Alpine forbs rely on different photoprotective strategies during spring snowmelt. *Physiol. Plant.* 172, 1506-1517.
- Fleta-Soriano, E., Munné-Bosch, S., 2017. Enhanced plastochromanol-8 accumulation during reiterated drought in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 112, 283-289.
- Gorelova, V., Colinas, M., Dell' Aglio, E., Flis, P., Salt, D.E., Fitzpatrick, T.B., 2022. Phosphorylated B₆ vitamer deficiency in SALT OVERLY SENSITIVE mutants compromises shoot and root development. *Plant Physiol.* 188, 220-240.

- Havaux, M., Ksas, B., Szewczyk, A., Rumeau, D., Frank, F., Caffarri, S., Triantaphylidès, C., 2009. Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress. *BMC Plant Biol.* 9, 130.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 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.
- Huang, S., Zhang, J., Wang, L., Huang, L., 2013. Effect of abiotic stress on the abundance of different vitamin B6 vitamers in tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 66, 63–67.
- Jayed, A., Zargar, M.S., 2018. Intake of vitamin B6, folate, and vitamin B12 and risk of coronary heart disease: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 2697-2707.
- Ji, X., Goja, A., Gupta, S.V., 2013. Potential of tocotrienols in lung cancer. In *Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols*, 2nd ed.; Tan, B., Ed.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.
- Lo'ay, A.A., EL-Khateeb, A.Y., 2019. Impact of exogenous pyridoxin treatments of “Williams” banana on activities of starch degrading enzymes. *Sci. Hortic.* 243, 48-54.
- Massolo, J.F., Lemoine, M.L., Chaves, A.R., Concellón, A., Vicente, A.R., 2014. Benzyl-aminopurine (BAP) treatments delay cell wall degradation and softening, improving quality maintenance of refrigerated summer squash. *Postharvest Biol. Tec.* 93, 122–129.
- Matringe, M., Ksas, B., Rey, P., Havaux, M., 2008. Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 147, 764-778.

Mooney, S., Hellman, H., 2010. Vitamin B6: Killing two birds with one stone? *Phytochemistry* 71, 495-501.

Nawawi, H.M., 2013. Tocotrienols and atherosclerosis: Potential in cardioprotection. In *Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols*, 2nd ed.; Tan, B., Ed.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.

Percudani, R., Peracchi, A., 2009. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics* 10, 273.

Sang, Y., Locy, R.D., Goertzen, L.R., Rashotte, A.M., Si, Y., Kang, K., Singh, N.K., 2011. Expression, in vivo localization and phylogenetic analysis of a pyridoxine 5'-phosphate oxidase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 88-95.

Stach, K., Stach, W., Augoff, K., 2021. Vitamin B6 in health and disease. *Nutrients* 13, 3229.

USDA (U. S. Department of Agriculture). 2018. Avocado, almond, pistachio and walnut composition. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. U. S. Department of Agriculture. Washington, DC.

Vincent, C., Mesa, T., Munné-Bosch, S., 2020a. Hormonal interplay in the regulation of fruit ripening and cold acclimation in avocados. *J. Plant Physiol.* 251, 153225.

Vincent, C., Mesa, T., Munné-Bosch, S., 2020b. Identification of a new variety of avocados (*Persea americana* Mill. CV. Bacon) with high vitamin E and impact of cold storage on tocopherols composition. *Antioxidants*. 9, 403.

Wang, W., Bostic, T.R., Gu, L., 2010. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chem.* 122, 1193–1198.

Yahia, E.M., 2013. Avocado. In: Rees D (Ed.). Crop Post-Harvest: Science and Technology. 1st Edition. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.

Zhang, Y., Li, L.X., Ouyang, Z., Huang, L., Hong, Y., Zhang, H., Li, D., Song, F., 2014. The de novo biosynthesis of vitamin B6 is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* in tomato. Mol. Plant Microbe Interact. 27, 688-699.

Zhang, Y., Jin, X., Ouyang, Z., Li, X., Liu, B., Huang, L., Hong, Y., Zhang, H., 2015. Vitamin B6 contributes to disease resistance against *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 and *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Physiol. 175, 21-25.

Table 1

Contents of vitamin B6, including the two vitamers pyridoxal 5-phosphate (PLP) and pyridoxine in various avocado varieties of different origins

Variety	Origin	A			B		
		Vitamin B6 ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)	PLP ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)	Pyridoxine ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)	Vitamin B6 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	PLP ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Pyridoxine ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Hass	Spain	447.2 \pm 31.6 ^e	447.3 \pm 31.6 ^e	ND	14.3 \pm 1.6 ^c	14.2 \pm 1.6 ^d	ND
Hass	Brazil	354.1 \pm 3.4 ^d	354.1 \pm 3.4 ^d	ND	14.9 \pm 1.1 ^c	14.9 \pm 1.1 ^d	ND
Hass	Chile	331.2 \pm 44.2 ^{cd}	324.5 \pm 47.2 ^{cd}	6.8 \pm 4.0 ^{ab}	9.7 \pm 1.3 ^b	9.5 \pm 1.4 ^c	0.2 \pm 0.1 ^a
Hass	Perú	187.5 \pm 2.0 ^b	169.4 \pm 26.2 ^b	18.0 \pm 13.1 ^b	9.4 \pm 1.2 ^b	8.5 \pm 1.5 ^{bc}	0.8 \pm 0.6 ^a
Fuerte	Chile	258.9 \pm 42.7 ^{bc}	251.1 \pm 41.2 ^c	7.9 \pm 2.9 ^{ab}	5.5 \pm 0.8 ^a	5.3 \pm 0.8 ^{ab}	0.2 \pm 0.1 ^a
Bacon	Spain	91.0 \pm 7.1 ^a	86.8 \pm 7.5 ^a	4.2 \pm 0.9 ^{ab}	4.9 \pm 0.5 ^a	4.7 \pm 0.5 ^a	0.2 \pm 0.1 ^a
Govín	Cuba	68.5 \pm 15.6 ^a	68.5 \pm 15.6 ^a	ND	6.0 \pm 1.1 ^a	5.8 \pm 1.2 ^{ab}	ND

PLP = pyridoxal 5'-phosphate, ND = not detected

Results are given in μg per 100 g edible fruit (A, n=4) and in μg per gram of dry weight (B, n=4).

Different small letters indicate differences between varieties and/or origin (ANOVA, Duncan posthoc tests, $P < 0.05$).

Figure legends

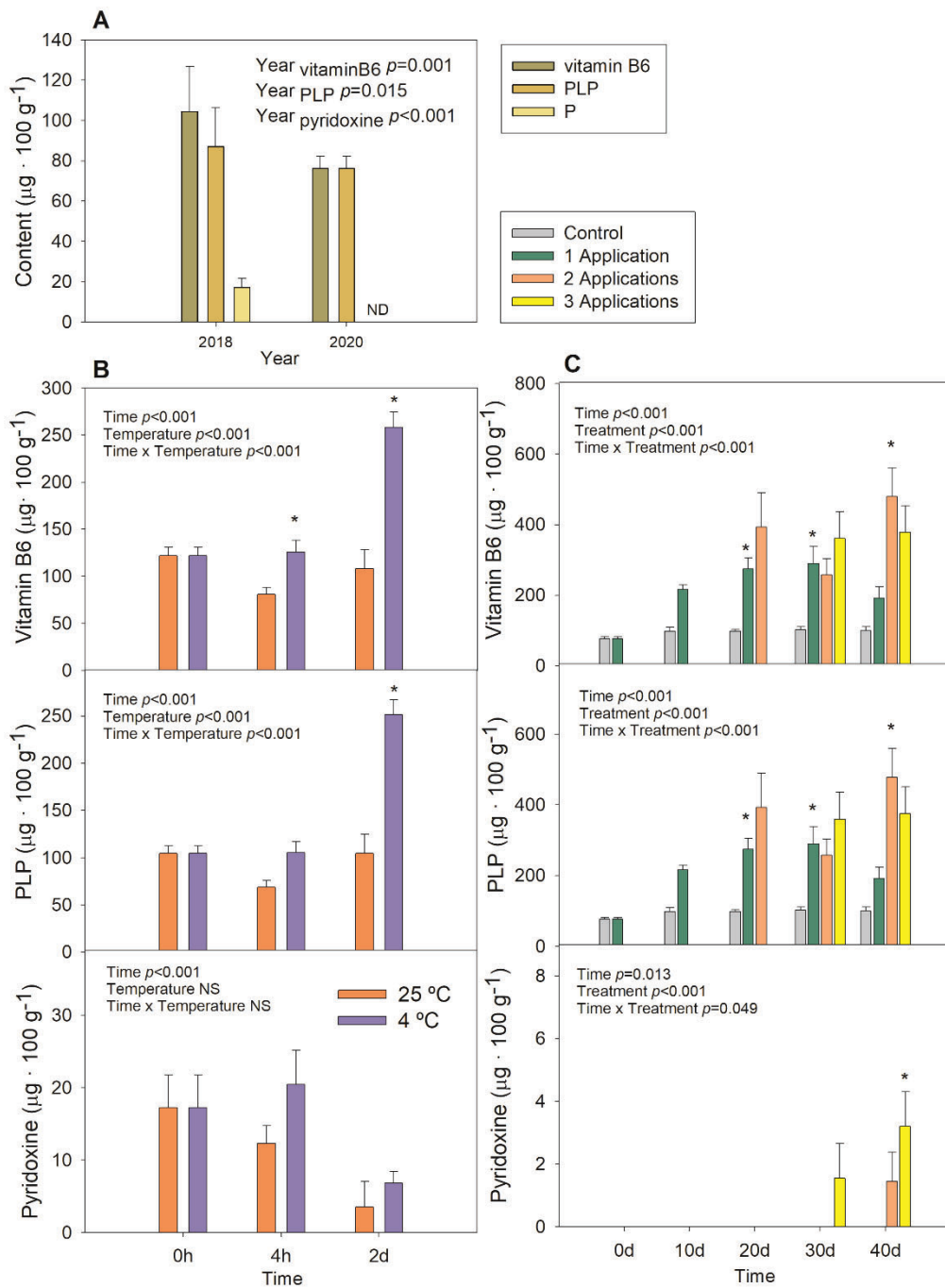


Fig. 1. Variations in the contents of vitamin B₆, including the two vitamers pyridoxal 5'-phosphate (PLP) and pyridoxine (P) in 'Bacon' avocados from different harvest campaigns and stored in cold chambers for short or long periods of time. (A) Variations in vitamin B₆ contents from 'Bacon' avocados harvested during the 2018 and 2020

campaigns in Málaga (Spain). **(B)** Variations in vitamin B₆ contents in avocados from the 2020 campaign after two days of storage at 4°C. **(C)** Variations in vitamin B₆ contents in avocados from the 2020 campaign after 30 days of storage at 4°C either with one, two and three applications of PLP at a dose of 9mM.. Data represent the means of six replicates and standard error. Results of two-way ANOVAs are shown in the inlets. Asterisks indicate significant differences between any of the treatments relative to the control (ANOVA, Duncan posthoc tests, P<0.05). NS, not significant.

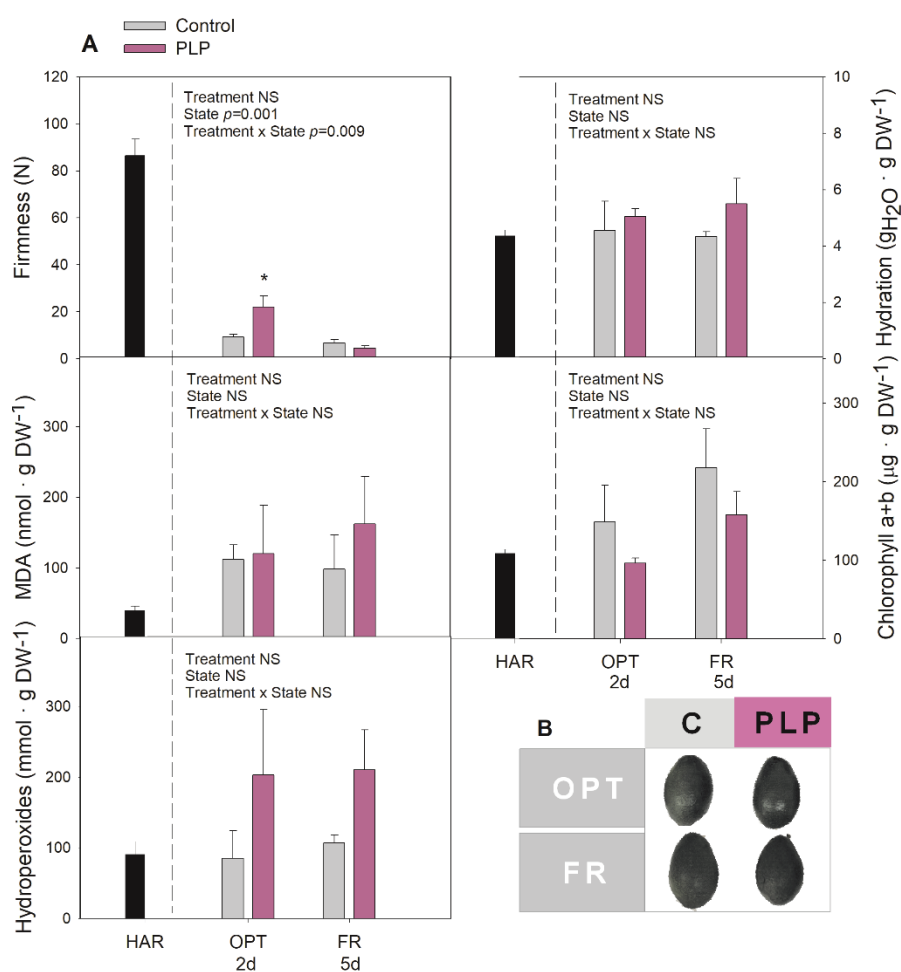


Fig. 2. Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) application delays firmness loss through hormonal effects. **(A)** Effects of PLP application at 9mM on fruit quality parameters, including firmness, accumulation of lipid peroxidation products, hydration and pigment contents, during ripening at room temperature. Data represent the means of six replicates and

standard error. Asterisks indicate significant differences between PLP treatment and control. **(B)** Visual perception of PLP treatment effects. MDA, malondialdehyde; OPT, optimal-ripen fruit, two days after treatment; FR, full-ripen fruit, five days after treatment.

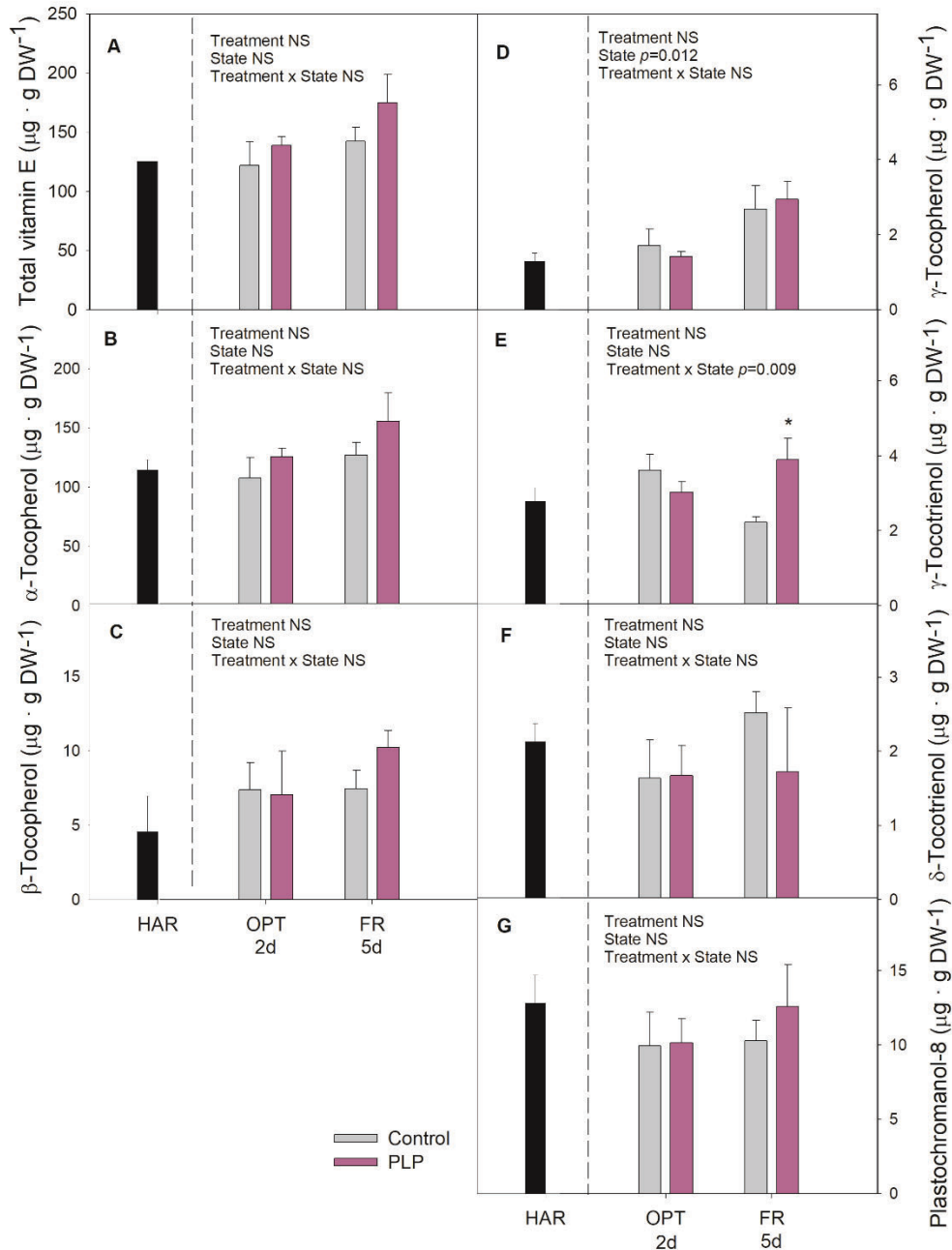


Fig. 3. Antioxidant contents, including those of various vitamin E homologues and plastocholesterol-8 during ripening at room temperature. Data represent the means of six

replicates and standard error. Asterisks indicate significant differences between PLP treatment and control.

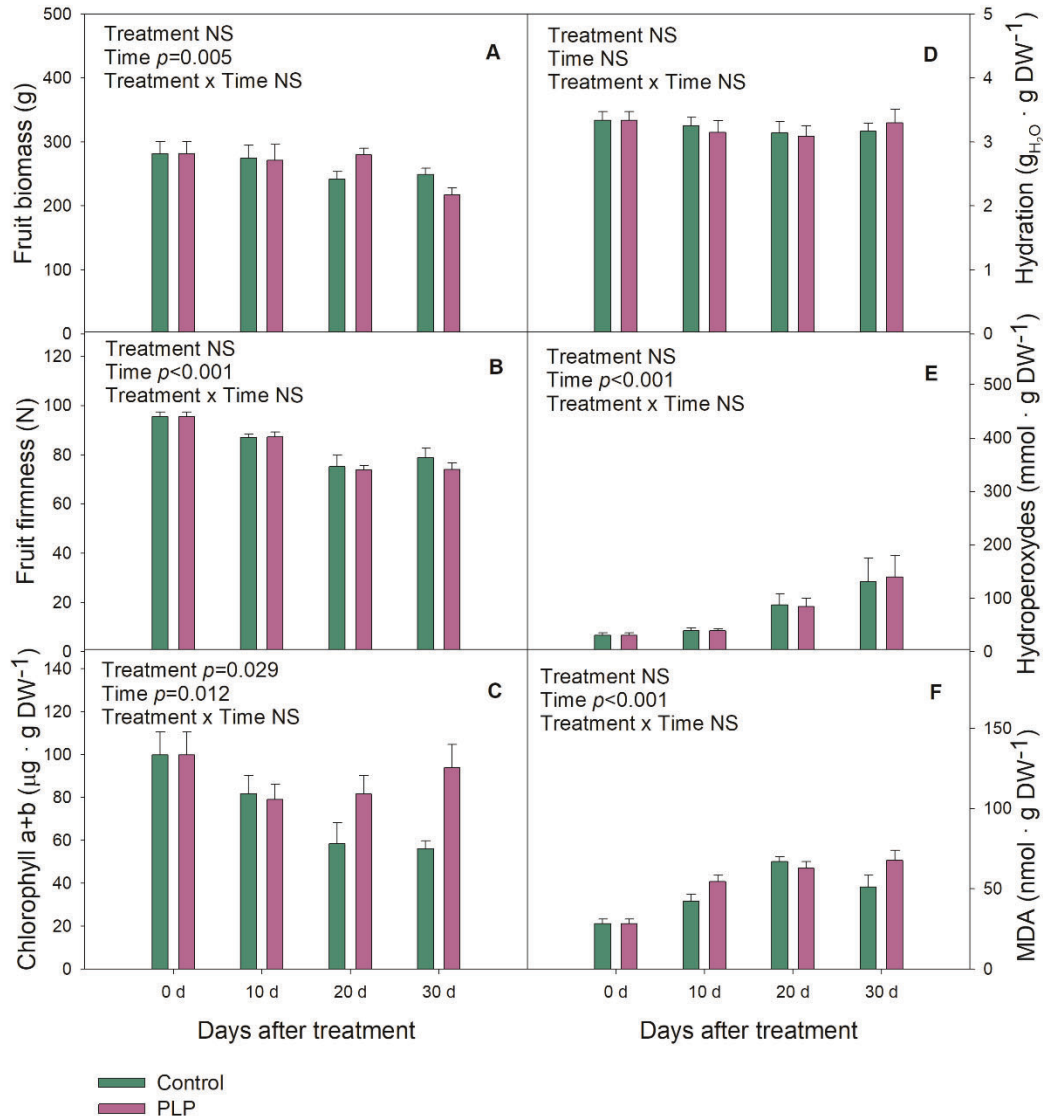


Fig. 4. Effect of pyridoxal 5'-phosphate (PLP) application on fruit quality parameters and endogenous hormone contents. Effects of PLP application at 9mM on fruit quality parameters, including fruit biomass (A), fruit firmness (B), total chlorophyll content (C), hydration (D), and accumulation of lipid peroxidation products (hydroperoxydes in E and MDA in F) during long-term cold storage at 4°C. Data represent the means of six

replicates and standard error. Asterisks indicate significant differences between PLP treatment and control. MDA, malondialdehyde.

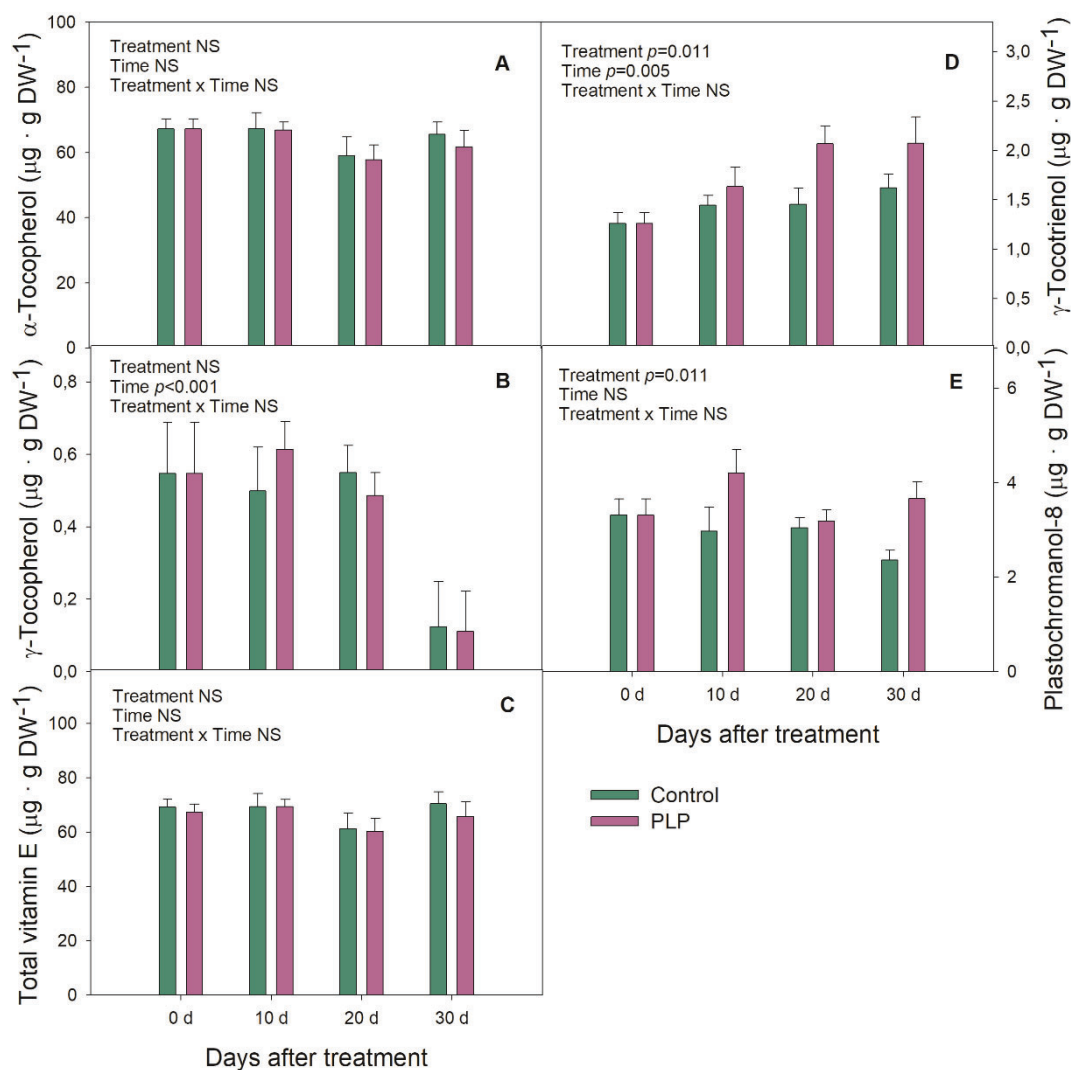


Fig. 5. Effect of pyridoxal 5'-phosphate (PLP) application on antioxidant contents, including those of vitamin E homologues and plastochromanol-8, during long-term cold storage at 4°C. Data represent the means of six replicates and standard error. Results of two-way ANOVAs are shown in the inlets. Although treatment effects were significant for γ -tocotrienol and plastochromanol-8, no significant differences were observed between PLP treatment and control in any of the times of measurement (Duncan posthoc test, $P > 0.05$).

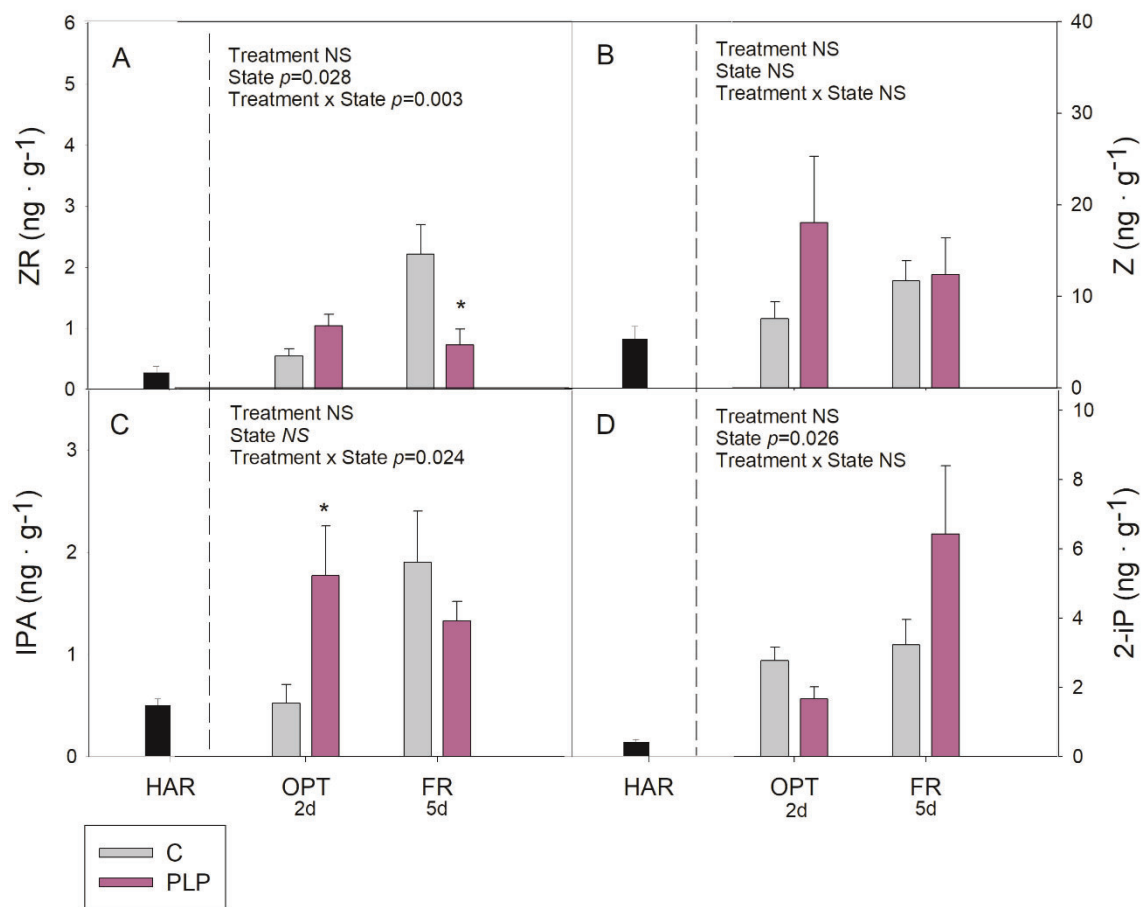


Fig. S1. Cytokinin contents, including those of *trans*-zeatin riboside (ZR), *trans*-zeatin (Z), isopentenyl adenosine (IPA) and 2-isopentenyl adenine (2-iP) at optimum (OPT) and full-ripening (FR) stages, which corresponds to 2 d and 5 d after pyridoxal 5'-phosphate (PLP) treatment, respectively. Data represent the means of six replicates and standard error. Asterisks indicate significant differences between treatments.

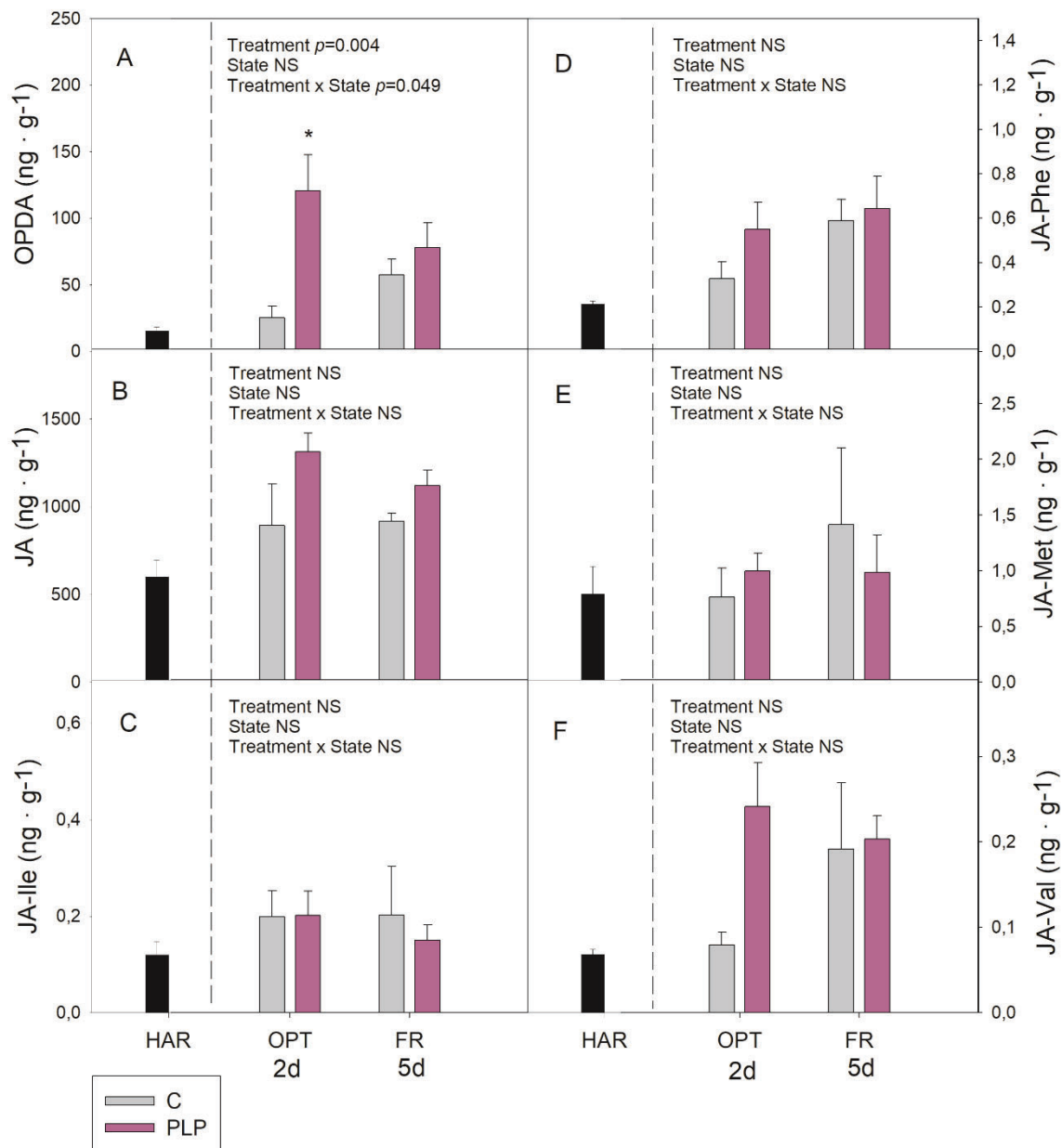


Fig. S2. Jasmonate contents, including those of 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA), jasmonic acid (JA), jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) and other jasmonoyl-amino acid conjugated forms at optimum (OPT) and full-ripening (FR) stages, which corresponds to 2 d and 5 d after pyridoxal 5'-phosphate (PLP) treatment, respectively. Data represent the means of six replicates and standard error. Asterisks indicate significant differences between treatments.

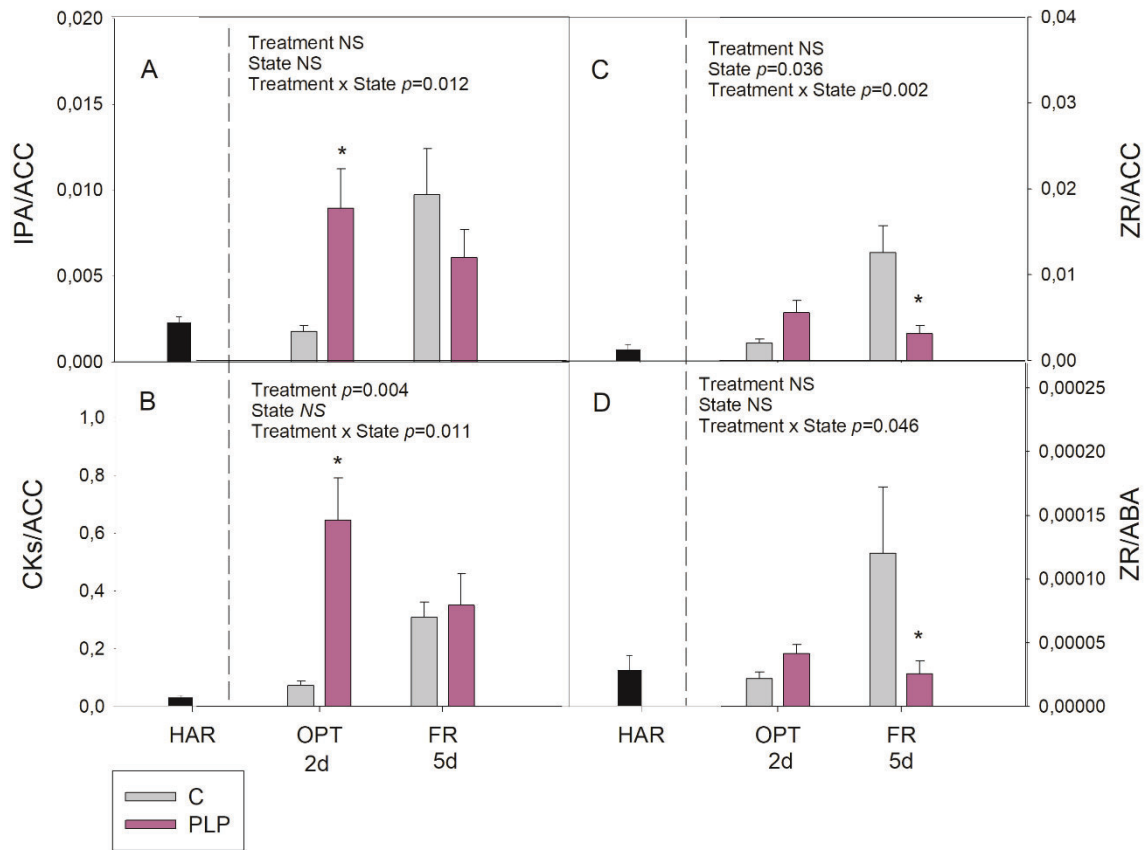


Fig. S3. Phytohormone ratios, including those of isopentenyl adenosine to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (IPA/ACC), total cytokinins to ACC (CKs/ACC), *trans*-zeatin riboside to ACC (ZR/ACC) and ZR/ABA, at optimum (OPT) and full-ripening (FR) stages, which corresponds to 2 d and 5 d after pyridoxal 5'-phosphate (PLP) treatment, respectively. Data represent the means of six replicates and standard error. Asterisks indicate significant differences between treatments.

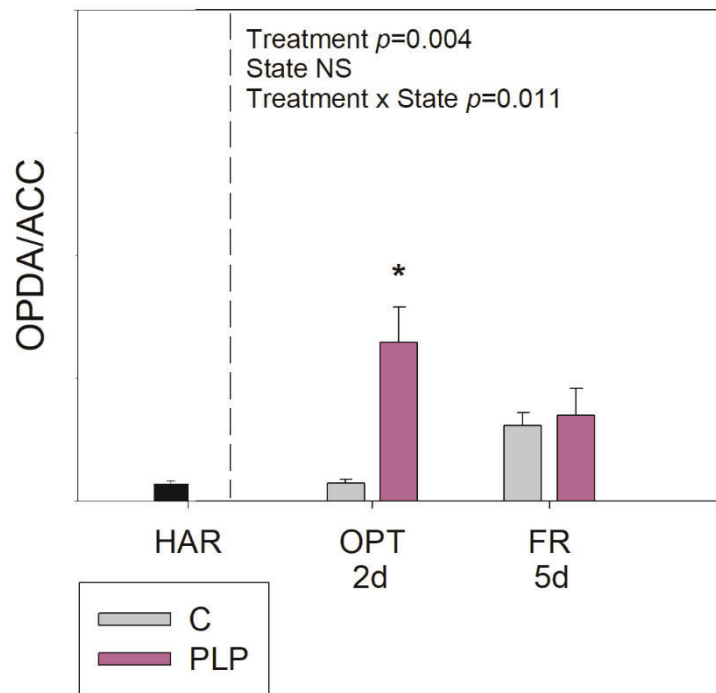


Fig. S4. OPDA/ACC ratio at optimum (OPT) and full-ripening (FR) stages, which corresponds to 2 d and 5 d after pyridoxal 5'-phosphate (PLP) treatment, respectively. Data represent the means of six replicates and standard error. Asterisks indicate significant differences between treatments.

Table S1. Analyte, method and calibration curve for measuring vitamin concentration in samples.

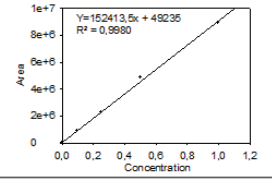
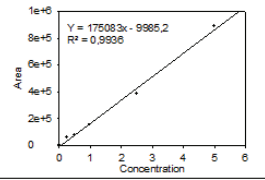
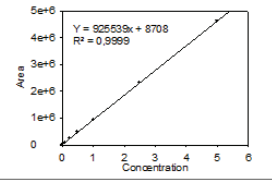
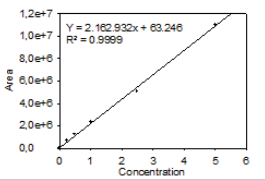
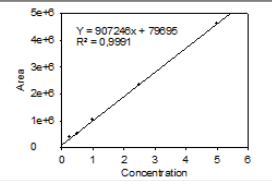
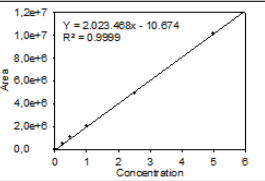
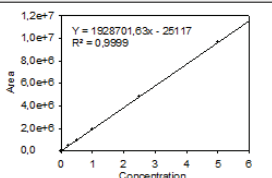
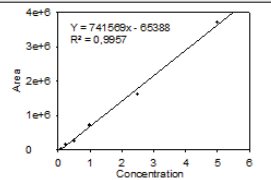
Analyte	Method	Calibration curve	Analyte	Method	Calibration curve
Pyridoxine	HPLC		β - Tocopherol	HPLC	
Pyridoxal 5'-phosphate	HPLC		γ - Tocotrienol	HPLC	
α - Tocopherol	HPLC		δ - Tocotrienol	HPLC	
γ - Tocopherol	HPLC		Plastochromanol-8	HPLC	

Table S2. Analyte, method and calibration curve for measuring phytohormone concentration in samples. 2-iP, isopentenyl adenine; IPA, isopentenyl adenosine; Z, *trans*-zeatin; ZR, *trans*-zeatin riboside; OPDA: 12-*oxo*-phytodienoic acid.

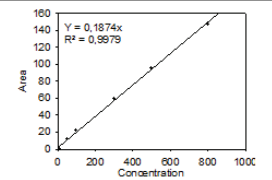
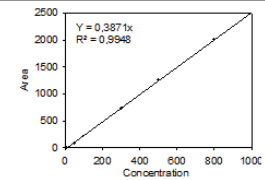
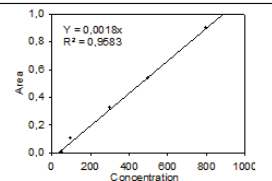
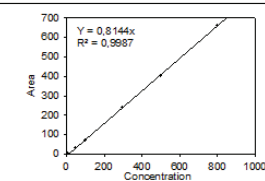
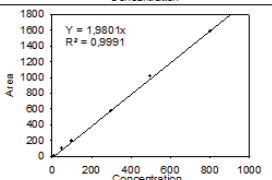
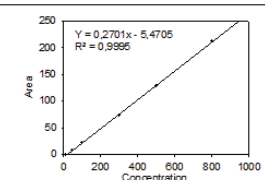
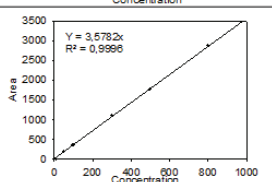
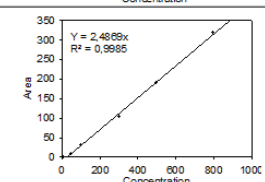
Analyte	Method	Calibration curve	Analyte	Method	Calibration curve
2-iP	UHPLC-ESI MS/MS		Jasmonic acid	UHPLC-ESI MS/MS	
IPA	UHPLC-ESI MS/MS		OPDA	UHPLC-ESI MS/MS	
Z	UHPLC-ESI MS/MS		Jasmonoyl - isoleucine	UHPLC-ESI MS/MS	
ZR	UHPLC-ESI MS/MS		Salicylic acid	UHPLC-ESI MS/MS	

Table S3. Analyte, method and calibration curve for measuring phytohormone concentrations in samples. IAA, indole-3-acetic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; GA, gibberellin.

Analyte	Method	Calibration curve	Analyte	Method	Calibration curve
IAA	UHPLC-ESI MS/MS	<p>Y = 0.5268x R² = 0.9966</p>	GA ₁ , GA ₄ , GA ₇	UHPLC-ESI MS/MS	<p>Y = 1.0036x R² = 0.9232</p>
Abscisic acid	UHPLC-ESI MS/MS	<p>Y = 1.7634x R² = 0.9971</p>	GA ₃	UHPLC-ESI MS/MS	<p>Y = 1.6842x R² = 0.9940</p>
ACC	UHPLC-ESI MS/MS	<p>Y = 2.3247x R² = 0.9982</p>			

Table S4. Summary of changes in the endogenous contents of phytohormones and phytohormone ratios as affected by pyridoxal 5'-phosphate (PLP) treatment relative to controls (green- and red-colored boxes indicate significant increases or decreases, respectively). OPT, ripe fruits under optimal conditions, two days after treatment; FR, full-ripen fruit, five days after treatment. 2-iP, isopentenyl adenine; IPA, isopentenyl adenosine; Z, *trans*-zeatin; ZR, *trans*-zeatin riboside; OPDA, 12-*oxo*-phytodienoic acid; JA, jasmonic acid; JA-Ile, jasmonoyl-isoleucine; Ja-Phe, jasmonoyl-phenylalanine; JA-Met, jasmonoyl-methionine; JA-Val, jasmonoyl-valine; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ABA, abscisic acid; IAA, 3-indoleacetic acid; SA, salicylic acid; GA, gibberellin; MEL, melatonin.

OPT (2d)		FR (5d)	
Phytohormones (ng · g ⁻¹)	Phytohormones ratios	Phytohormones (ng · g ⁻¹)	Phytohormones ratios
2-IP	2-iP/ABA	2-IP	2-iP/ABA
IPA	IPA/ABA	IPA	IPA/ABA
Z	Z/ABA	Z	Z/ABA
ZR	ZR/ABA	ZR	ZR/ABA
OPDA	CKs/ABA	OPDA	CKs/ABA
JA	2-iP/ACC	JA	2-iP/ACC
JA - Ile	IPA/ACC	JA - Ile	IPA/ACC
JA - Phe	Z/ACC	JA - Phe	Z/ACC
JA - Met	ZR/ACC	JA - Met	ZR/ACC
JA-Val	CKs/ACC	JA-Val	CKs/ACC
ACC	OPDA/ACC	ACC	OPDA/ABA
ABA	JA/ABA	ABA	JA/ABA
IAA	JA- Ile /ABA	IAA	JA- Ile /ABA
SA	SA/ABA	SA	SA/ABA
GA ₁	ACC/ABA	GA ₁	ACC/ABA
GA ₄	MEL	GA ₄	MEL

Table S5. Results of two-way ANOVAs evaluating the effects of pyridoxal 5'-phosphate (PLP) treatment and sampling time on the endogenous contents of phytohormones. IAA,

indole-3-acetic acid; ABA, abscisic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; SA, salicylic acid; Z, *trans*-zeatin; ZR, *trans*-zeatin riboside; 2-iP, 2-isopentenyl adenine; IPA, isopentenyl adenosine; GA, gibberellin; OPDA, 12-*oxo*-phytodienoic acid; JA, jasmonic acid; JA-Ile, jasmonoyl-isoleucine; CK, total cytokinins.

Parameter	Treatment	Time	Treatment x time
IAA	NS	0.023	NS
ABA	NS	<0.001	NS
ACC	NS	<0.001	NS
SA	NS	NS	NS
Z	NS	NS	NS
ZR	NS	0.005	NS
2-IP	NS	NS	NS
IPA	NS	0.001	NS
GA ₁	NS	NS	NS
GA ₃	NS	NS	NS
GA ₄	NS	NS	NS
GA ₇	NS	NS	NS
OPDA	NS	NS	0.003
JA	NS	NS	NS
JA-Ile	NS	NS	NS
Z/ACC	NS	0.025	NS
ZR/ACC	NS	<0.001	NS
2-iP/ACC	NS	NS	NS
IPA/ACC	NS	<0.001	NS
CK/ACC	NS	NS	NS
Z/ABA	NS	<0.001	NS
ZR/ABA	NS	<0.001	NS
2-IP/ABA	NS	<0.001	NS
IPA/ABA	NS	0.029	NS
CK/ABA	NS	<0.001	NS
SA/ABA	NS	<0.001	NS
ACC/ABA	NS	<0.001	NS
JA-Ile/ABA	NS	NS	NS

Capítol 4. L'aplicació de metil jasmonat redueix els danys per fred en l'alvocat 'Bacon' (*Persea americana* Mill. cv. Bacon)

Chapter 4. Methyl jasmonate application reduces chilling injury in 'Bacon' avocado (*Persea americana* Mill. cv. Bacon)

Celia Vincent, Clara Mirabent i Sergi Munné-Bosch

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals i Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Espanya

Enviat a **Plant Physiology and Biochemistry** [Ref: PPB-D-21-00765] el
dia 25 de octubre de 2021

RESUM

L'alvocat (*Persea americana* Mill.) és susceptible a patir danys per fred quan s'emmagatzema a baixes temperatures. L'emmagatzematge en fred és una tècnica comú i bàsica implementada al llarg de la cadena de producció dels alvocats per afavorir el transport internacional de fruits però, si els límits de tolerància es sobrepassen, els danys per fred poden afectar als fruits i suposar pèrdues en la qualitat. Amb l'objectiu d'avaluar l'eficiència de l'aplicació de metil jasmonat contra els danys per fred i la influència sobre la qualitat del fruit, es van collir alvocats en estat madur d'un camp comercial i es van dividir en dos grups. Un grup es va espraïar amb una solució de metil jasmonat i l'altre grup amb una solució control. Els dos grups es van emmagatzemar a 4°C per 6 setmanes i periòdicament es van treure per mantenir-los 5 dies a temperatura ambient fins assolir la maduració comercial completa. Els danys per fred en la varietat 'Bacon' es manifesten després de 4 setmanes d'emmagatzematge a 4°C desencadenats per una resposta vinculada a reaccions de peroxidació lipídica. El tractament per esprai de metil jasmonat retarda la peroxidació lipídica prolongant la vida post-collita relacionada amb els símptomes de danys per fred en el mesocarpí sense afectar negativament a paràmetres de qualitat com la fermesa del fruit o l'acumulació de vitamina E. En conclusió, l'aplicació de metil jasmonat per esprai en el fruit incrementa la vida útil de l'alvocat reduint els danys per fred en el mesocarpí alhora que manté les propietats nutricionals com el contingut de vitamina E al llarg de l'emmagatzematge a 4°C.

Methyl jasmonate application reduces chilling injury in ‘Bacon’ avocado (*Persea americana* Mill. cv. Bacon)

Celia Vincent^{1,2}, Clara Mirabent and Sergi Munné-Bosch^{1,2*}

¹ *Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, and*

² *Research Institute of Nutrition and Food Safety (INSA), University of Barcelona, Faculty of Biology, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain*

*Corresponding author.

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

Abstract

Avocado (*Persea americana* Mill.) fruit are prone to chilling injury disorders when stored at low temperatures. Cold storage is a basic and common technique implemented along the supply chain of avocados for international fruit transport but if the threshold of tolerance is surpassed, chilling injury can affect fruit and lead to a loss of quality. Aiming to evaluate the efficiency of methyl jasmonate treatment against chilling injury and the influence on avocado quality, avocados were harvested from a commercial orchard at mature stage and then, divided in two groups. One group was sprayed with a methyl jasmonate solution and the other with a control solution. Both groups were stored for 6 weeks at 4 °C and were periodically withdrawn and maintained for 5 days at room temperature until ripened. Chilling injury in the variety 'Bacon' started to occur after 4 weeks of cold storage at 4 °C mediated by a signaling response due to lipid peroxidation reactions. The methyl jasmonate spray treatment delayed lipid peroxidation events extending postharvest life in terms of reducing chilling injury symptoms in the mesocarp, without negatively influencing quality traits like fruit firmness or vitamin E accumulation. In conclusion, methyl jasmonate sprayed fruit had an increased shelf life in terms of chilling injury symptoms in the mesocarp, while maintaining nutritional properties such as vitamin E contents along the time of storage at 4 °C.

Keywords: methyl jasmonate, chilling injury, avocado, cold storage, tocopherols, postharvest

Abbreviations: ROS: reactive oxygen species; MDA: malondialdehyde; BHT: butylhydroxytoluene; ABA: abscisic acid; ACC: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; UHPLC-ESI MS/MS: ultra-high-performance-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; OPDA: 12-*oxo*-phytodienoic acid

1. Introduction

Avocados (*Persea americana* Mill.) are fruit with high and increasing global economic relevance which day by day is gaining attention of many consumers due to the nutritional and beneficial properties that offers to human health (Araújo et al., 2018). Avocado market has exponentially grown over the last decade corresponding to 600.000 ha and more than 6.000.000 t in cultivation and production, respectively. Great proportion of this production is destined to exportations right from the main cultivation regions located in Central America and South Africa to the United States of America and the European Union (FAO, 2020). Avocados are climacteric fruit which ripening occurs very rapid in time after attaining maturation and once the fruit is harvested from the tree (Bower and Cutting, 1988) then, it is attained in no longer than seven to thirteen days, depending on the variety (Pérez et al., 2004; Kassim et al., 2013). After ripening, overripening is triggered leading to enhanced fruit softening, fungal diseases and loss of quality and properties (Zhang et al., 2013). Postharvest avocado handling overseas lasts over 1 month (Kassim et al., 2013) what requires the implementation of strict techniques to guarantee that fruit arrive at the country of destiny with high quality for consumers.

Although many strategies have been already developed aiming to inhibit fruit ripening, low temperature storage (between 5 °C and 13 °C, depending on the cultivar) is the first technique implemented for extending avocado shelf life and postharvest quality. Cold storage diminishes metabolic processes, thus delaying the characteristic respiratory and ethylene peaks occurring during ripening, therefore prolonging shelf life of avocado (Bill et al., 2014). The great part of commercial varieties, like ‘Hass’ or ‘Fuerte’, are stored around 5 - 7 °C for 2 - 4 weeks (Yahia and Woolf, 2011). Nonetheless, exposure of avocados at those temperatures over longer periods of time or exposure at temperatures below the critical threshold can affect avocado quality by causing chilling injury (Kassim

et al., 2013) that is attributed to great economical losses after fruit harvest, together with mechanical damage, fruit degradation and insect attack (Yahia and Woolf, 2011).

Tropical and subtropical fruit are prone to cold stress and developing chilling injury when exposed to low temperatures (Jackman et al., 1988). Chilling injury associated symptoms can appear both in the interior as the exterior of the fruit presented as pitting and mesocarp decolouration, resulting from oxidative processes (Gómez-López, 2002; Kassim et al., 2013). Stress conditions like low-temperature storage cause a rise in reactive oxygen species (ROS) that induce oxidative stress and trigger lipid peroxidation processes (Gill and Tuteja, 2010). As a result, cell disruption and loss of fruit integrity occurs, which is also attributed to other oxidation events, a drop in antioxidant values and to bad taste that carries the loss of quality in the fruit (Shewfelt and del Rosario, 2000; Prabath Pathirana et al., 2013).

According to the impact of chilling injury on economic losses, different postharvest treatments have been assessed in avocados stored for long periods of time at cold temperatures like controlled atmospheres, hot-air or water treatments and 1-methylcyclopropane (Kassim et al., 2013; Bill et al., 2014). Nevertheless, those treatments have been associated to a negative impact on fruit quality and heterogenous ripening affecting fruit firmness (Meir et al., 1995; Pesis et al., 2002; Woolf et al., 2005). Differently, the use of phytohormones like methyl jasmonate has also been studied related to chilling injury and enhanced shelf life demonstrating its efficiency when applied by immersion or air in ‘Hass’, ‘Ettinger’ and ‘Fuerte’ avocados (Xiang et al., 2020; Wang et al., 2021).

Here, we aimed at better understanding mechanisms underlying chilling injury in avocados, which might be of great interest since chilling injury in this fruit is reported to have a high economic impact in European agriculture and exportation (Bill et al., 2014).

Furthermore, we aim at examining the efficiency of sprayed methyl jasmonate against chilling injury as well as the impact on antioxidant properties and oxidative events related to cold stress in avocado.

2. Material and methods

2.1. Plant material and sampling

Harvested avocados (*Persea americana* Mill. cv. Bacon) at mature but non-ripe stage from a commercial orchard in Málaga (south Spain) were immediately brought to the laboratory at the University of Barcelona (Barcelona, NE Spain) after 12 h of transportation at 8-10 °C (air temperature). After arrival, fruit were selected for homogeneity according to their size, maturation stage and lack of pathogen symptoms. Then, avocados were divided into two groups, the first group was treated with 10^{-4} M methyl jasmonate + 0,01 % Tween 80, and the second one was treated with the control solution consisting in water + 0.01 % Tween 80. Both treatments were applied uniformly over the fruit skin by spraying and then avocados were stored at 4 °C in a cold chamber for 6 weeks. Both groups were always kept in darkness throughout the study. Weekly, some avocados from each group were taken out from the cold chamber and exposed for 5 d at room temperature, so that fruit ripened. Samplings from the mesocarp of 6 ripen fruits per treatment and cold storage time point were performed. For each sampling time, avocados were weighed and cut in halves to posteriorly attribute a value of mesocarp discoloration to each half according to the percentage of area affected related to chilling injury. To follow, the peel and stone were removed of the other half of the fruit and this half corresponding only to mesocarp tissue was cut into pieces and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until analyses.

2.2. *Fruit firmness*

The stage of ripening of fruit was assessed measuring firmness with a FT 327 penetrometer (QA Supplies, Norfolk, VA, USA) with a 6×10^{-3} m cone. The measurement consisted in pushing the cone of the penetrometer into the avocado mesocarp, avoiding the contact with the stone.

2.3. *Lipid peroxidation analyses*

Lipid peroxidation levels were determined by analysing primary (lipid hydroperoxide) and secondary (malondialdehyde, MDA) lipid peroxidation products. First, for evaluating lipid hydroperoxides content, frozen samples were extracted with methanol containing 0.01 % butylhydroxytoluene (BHT; w/v) at 4 °C using 30 min of ultrasonication (Bransonic ultrasonic bath 2800, Emerson Industrial, Danbury, CT, USA) and centrifugation at 1419 g for 10 min at 4 °C. Then, two re-extractions were performed. Supernatants were pooled and used for analyses using the Fox-2 reagent (consisting in a solution of 90 % methanol (v/v) containing 25 mM sulfuric acid, 4 mM BHT, 0.25 mM iron sulphate ammonium (II) and 0.1 mM xylenol orange) as described in Bou et al., (2008). Absorbances were measured at 560 and 800 nm. A calibration curve using hydrogen peroxide 37 % (v/v) was used for quantification.

For determining the MDA content, the thiobarbituric acid-reactive substances assay, was used as in Hodges et al., (1999). In brief, samples were extracted with 80 % (v/v) ethanol containing 0.01 % (w/v) BHT, then vortexed for 20 s and exposed to ultrasonication for 45 min (Bransonic ultrasonic bath 2800). After a centrifugation process at room temperature for 13 min at 1091 g, the supernatant was recovered, and the pellet re-extracted twice using the same procedure. Then, two tubes for sample were used: (a) - TBA, with 1 mL extract + 1 mL 20 % trichloroacetic acid (w/v) with 0.01 % BHT (w/v) and (b) +TBA, with 1 mL extract + 1 mL 20 % trichloroacetic acid (w/v), 0.01 % BHT

(w/v) and 0.65 % thiobarbituric acid (w/v). Tubes were incubated at 95 °C for 25 min. Subsequently, the reaction was stopped by maintaining them at 4 °C for 10 min. After centrifugation at 1091 g at room temperature for 5 min, MDA content in samples were analysed by spectrophotometry and quantified using the equations developed by Hodges et al., (1999).

2.4. Tocochromanols analyses

The quantification of the different isomers of tocochromanols including tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 was performed as follows. Samples were extracted with methanol containing 0,01 % BHT (w/v). Samples were extracted and re-extracted twice using vortex for 20 s followed by 30 min of ultrasonication (Bransonic ultrasonic bath 2800). Then, supernatants were pooled and centrifuged at 1419 g during 10 min at 4 °C before passing them onto a hydrophobic PTFE filter 0.22 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and introducing them into vials. Tocochromanols were separated by HPLC at room temperature using an Inertsil 100A column (5 mm, 0.03 x 0.25 m, GL Sciences Inc., Japan). A Jasco fluorescence detector (FP-1520, Tokyo, Japan) was used for the quantification and a calibration curve established with authentic standards (Sigma) for each of the tocochromanols analysed.

2.5. Hormones determination

Endogenous contents of abscisic acid (ABA), the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), salicylic acid (SA) and jasmonates, were measured using ultra-high-performance-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI MS/MS) as reported by Müller and Munné-Bosch (2011). Samples were extracted with methanol:isopropanol:acetic acid 50:49:1 (v/v/v). During the extraction process, d₄-SA, d₆-ABA, d₅-JA and d₄-ACC deuterium labelled hormones were added as internal standards. After 20 s of vortex, ultrasonication (Branson 2510

ultrasonic cleaner) for 30 min and 10 min centrifugation at 1419 g and 4 °C, the supernatant was obtained. Then, a re-extraction step was performed as described before and the resulting supernatants were combined and filtered using a 0.22 µm PTFE (Phenomenex, Torrance, CA, USA) filter before UHPLC-ESI MS/MS analyses. UHPLC and MS/MS conditions for hormone separation and quantification were the same as those described by Müller and Munné-Bosch (2011).

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed by applying a two-way ANOVA and Duncan *posthoc* test indicating with asterisks when methyl jasmonate treatment differed from control for each cold storage sampling time and capital letters indicate Duncan *posthoc* differences among cold storage times for control treatment only (IBS SPSS Statistics 19; SPSS Inc., Illinois, USA). Differences between methyl jasmonate treatment and control were considered significant when *P* values were below 0.05 ($p < 0.05$). All data are presented on a dry weight basis.

3. Results

3.1. Physiological effects of chilling injury in untreated avocados

Increasing chilling injury incidence was observed in avocado skin from week 3 to week 6 after storage at 4 °C, attaining up to 20 % of affection. In the mesocarp, chilling injury manifested as pulp browning, and it was present from week 4 to the end of the experiment (6 weeks) in controls (Figure 1). This visual effect in the mesocarp may be attributed to oxidative processes, as suggested by enhanced accumulation of both hydroperoxides and MDA contents from week 4 to week 6 of cold storage compared to the initial values (Figure 2). Tocochromanols accumulation in untreated avocados was slightly affected by chilling injury, mainly that of α -tocopherol, which levels increased

after 2 weeks of storage to decrease at week 3 and posteriorly remain similar to initial values (Figure 3).

Stress-related hormones such as ACC, ABA and salicylic acid did not show any modification over time of storage at low temperatures (Figure 4) but, in contrast, jasmonates responded to stress. Total jasmonates content increased significantly from week 2 to week 4 to maintain those high endogenous levels the last weeks of the experiment. Jasmonic acid contents peaked after 3 weeks of storage to posteriorly decrease accompanied with an increase in the amount of OPDA. Jasmonoyl-isoleucine contents remained unaltered during cold storage (Figure 5).

3.2. Methyl jasmonate modulates oxidative events related to chilling injury

Chilling injury was first observed in avocado skin and, posteriorly, affected mesocarp. Fruit started to manifest mesocarp discolouration and browning after 4 weeks of storage at 4 °C. Spray treatment with methyl jasmonate was effective in delaying chilling injury since at 4 weeks no symptoms of chilling injury were appreciated in avocado mesocarp. Symptoms were slightly initiated after 5 weeks of storage (Figure 1). Also, methyl jasmonate treatment did not cause variations in fruit firmness, which ranged between 3 N to 6 N, nor in hydration showing values around 3 kg water · kg⁻¹ dry matter when ripened.

Oxidative events were evaluated according to lipid peroxidation products measured as lipid hydroperoxides and MDA. Hydroperoxides content was enhanced in treated fruit in early weeks after storage, in particular after 2 weeks but lately, untreated avocados had a higher content of hydroperoxides corresponding to 4 weeks and 5 weeks after storage at 4 °C (Figure 2). Similarly, MDA levels were higher in untreated fruit after 5 weeks of

storage, both results corresponding to lower lipid peroxidation rates if avocados were sprayed with methyl jasmonate (Figure 2).

When assessing the influence of methyl jasmonate treatment on tocochromanol contents when fruit were ripened after cold storage, neither tocochromanol content nor composition were affected. This was observed after methyl jasmonate treatment for all vitamin E forms, including α -tocopherol, γ -tocopherol and γ -tocotrienol, and for plastochromanol-8 (Figure 3).

Stress-related hormones were strongly influenced by methyl jasmonate treatment. Salicylic acid showed differences between methyl jasmonate treated fruit and control being higher in untreated fruit after 4 weeks of storage (Figure 4). OPDA content differed between treatments at week 3, being higher under the application of methyl jasmonate. Total jasmonates did not differ between treatments at any time point of measurements (two-way ANOVA, Figure 5), but showed differences between treatments at week 2 according to a *t*-Student test considering $p < 0.05$. Other phytohormones, like jasmonic acid, jasmonoyl-isoleucine, ACC and ABA presented non-significant differences in levels when comparing treated and untreated fruit over storage (Figures 4 and 5).

4. Discussion

Low temperature storage is an effective strategy to maintain postharvest fruit quality and increase shelf life (Bill et al., 2014). Generally, avocados are stored after harvest at temperatures between 5 - 13 °C during two to four weeks depending on the cultivar and ripening stage (Bill et al., 2014). Noteworthy, chilling injury occurs when avocados are stored in colder temperatures and/or longer periods of time leading to irreversible physiological disorders induced by cold stress (Jackman et al., 1988; Yahia and Woolf, 2011). It is shown here that chilling injury in avocados may be delayed by an adequate

abiotic response mediated by jasmonates that regulates oxidation events in the mesocarp. Jasmonates might be exerting a protective role in avocado delaying cold stress-induced damage. Methyl jasmonate treated fruit enhanced jasmonates accumulation, which could be triggering some physiological responses for cold tolerance, what prolongs in time the integrity of membranes, otherwise damaged by ROS, and delays chilling injury.

The production of ROS is constantly occurring in aerobic organisms like plants due to photosynthesis, itself forming ROS that, although being toxic in the cell in high concentrations, low levels can induce signaling for leaves, flowers and fruit development (Muñoz and Munné-Bosch, 2018; He and Ding, 2020). Nonetheless, prolonged cold-temperature exposure of fruit induces a stress that leads to an uncontrolled and excessive ROS production in chloroplasts causing cellular damage due to lipid peroxidation cascades (Gill and Tuteja, 2010), thus resulting in oxidative stress if antioxidant mechanisms are insufficient to inhibit ROS activity. Here, a response to cold storage can be described with two differentiated phases related to the delay of chilling injury in methyl jasmonate treated avocados (Figure 6). During the cold tolerance phase a primary response coinciding with lipid peroxidation reactions might be acting in a signaling mechanism for triggering a tolerance response, with no negative consequences for the fruit (despite the enhanced oxidative stress in the ripen fruit, as shown by slightly increased hydroperoxide contents at week 2 in methyl jasmonate treated fruit compared to controls). In contrast, after several weeks of storage, exogenously applied methyl jasmonate might be exerting a protective role against cold stress by reducing the extent of lipid peroxidation (as observed for hydroperoxide contents at week 4, and both hydroperoxide and MDA accumulation at week 5) in the mesocarp of ripen fruit. In controls (untreated fruit), enhanced production of both hydroperoxides and MDA in ripen fruit might cause cell damage as reflected by chilling injury injuries in the mesocarp of

avocados. Intriguingly, SA contents also increased in ripen fruit of cold-stored untreated avocados at week 4, a response that was inhibited in avocados treated with methyl jasmonate and that coincided with major differences in chilling injury in treated vs. untreated fruit at 4 weeks of cold storage. It may be speculated that methyl jasmonate negatively regulated a SA-related response in ripen fruit after 4 weeks of cold storage, perhaps related to (i) redox processes, (ii) pathogen attack, and/or (iii) cell death processes, an aspect that warrants further investigation. This rise in endogenous SA content in ripen fruit of controls was not observed if fruit were stored for 5 or 6 weeks, which indicates a completely differential response of endogenous hormones in ripen fruit depending on the previous cold storage time.

‘Bacon’ avocados started to develop chilling injury in the mesocarp after 4 weeks of being stored at 4 °C. Methyl jasmonate treatment has been shown in the present study to efficiently reduce and delay chilling injury in avocado when applied through spray, then chilling injury was slightly initiated from week 5 prolonging shelf-life of fruit by at least one week. This extends the results obtained in previous studies where methyl jasmonate was applied through other techniques like submergence or gas in other avocado varieties (Meir et al., 1996; Sivankalyany et al., 2015; Glowacz, et al., 2017). Furthermore, it is shown here for the first time that methyl jasmonate treatment by spray delays the initiation of chilling injury by reducing lipid peroxidation events in the mesocarp of ripen avocados.

Although many postharvest techniques exist currently for reducing damage associated to chilling injury in various fruit stored for long periods at low temperatures, like (i) hot-air or water treatment (Woolf et al., 1995; Woolf, 1997), (ii) controlled atmospheres storage (Pesis et al., 1994) and (iii) the use of 1-methylcyclopropane (Pesis et al., 2002), it is worthy considering the technique of spraying a methyl jasmonate solution since the aforementioned treatments not always keep the nutritional value or may

have side effects (Ornelas and Yahia, 2003; Wang et al., 2006). Since tocopherols, mainly α -tocopherol, are implicated in non-enzymatic antioxidant function acting as direct scavengers of ROS and lipid peroxide radicals in chloroplastic membranes (Falk and Munné-Bosch, 2010; Muñoz and Munné-Bosch, 2019), maintenance of its contents in methyl jasmonate treated fruit is of high relevance, not only for permitting a correct redox balance in the cell and conserving fatty acid properties in avocado mesocarp (Araújo et al., 2018), but also because of vitamin E interest in human nutrition and health-benefits (Weber et al., 1997). Here, methyl jasmonate treatment was proven to maintain nutritional value related to vitamin E accumulation in the edible mesocarp.

In conclusion, ‘Bacon’ avocados are fruit prone to chilling injury when stored at 4 °C with symptoms being initiated after 4 weeks of storage. Methyl jasmonate treatment acts by directly regulating oxidative mechanisms related to lipid peroxidation in the ripen fruit caused by time of cold storage. Hence, spraying methyl jasmonate on fruit would be an easy, economic, and efficient strategy to implement along the supply chain to reduce and delay symptoms associated to chilling injury in ‘Bacon’ avocados. Methyl jasmonate applied through spray prolongs avocado marketability for at least one week without negatively affecting ripening-related traits nor nutritional properties, at least in the content of tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 once the fruit has accomplished ripening.

References

- Araújo, R.G. Rodriguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., Aguilar, C. N., 2018. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends Food Sci. Tec.*, 80:51-60, doi: 10.1016/j.tifs.2018.07.027
- Bill, M., Sivakumar, D., Keith, A., Korsten, L. (2014). Avocado fruit quality management during the postharvest supply chain. *Food Rev. Int.*, 30:169-202, doi: 10.1080/87559129.2014.907304
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E.A., Guardiola, F., 2008. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.*, 377:1-15, doi: 10.1016/j.ab.2008.02.029
- Bower, J.P., Cutting, J.C. (1988). Avocado fruit development and ripening physiology. A: Janick, J. (ed) *Horticultural Reviews*. Timber Press, Portland, OR., 10: 229-261. ISBN 9781118060834, doi: 10.1002/9781118060834.ch7
- Falk, J., Munné-Bosch, S., 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.*, 61:1549–1566, doi: 10.1093/jxb/erq030
- FAO, 2020: FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the nited Nations., 2020. Accessed date: 06/21. Available in: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 48:909-930, doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Glowacz, M., Bill, M., Tinyane, P.P., Sivakumar, D., 2017. Maintaining postharvest quality of cold stored “Hass” avocados by altering the fatty acids content and composition

with the use of natural volatile compounds – methyl jasmonate and methyl salicylate. *J. Sci. Food Agric.*, 97: 5186-5193, doi: 10.1002/jsfa.8400

Gómez-López, V. M., 2002. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chem.*, 77: 163-169, doi: 10.1016/S0308-8146(01)00331-4

He, M., Ding, N-Z., 2020. Plant unsaturated fatty acids: Multiple roles in stress response. *Front. Plant Sci.*, 11:562785, doi: 10.3389/fpls.2020.562785

Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 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.

Jackman, R.L., Yada, R.Y., Marangoni, A., Parkin, K.L., Stanley, D.W., 1988. Chilling injury. A review of quality aspects. *J. Food Qual.*, 11:253-278, doi: 10.1111/j.1745-4557.1988.tb00887.x

Kassim, A., Workneh, T.S., Bezuidenhout, C.N., 2013. A review on postharvest handling of avocado fruit. *Afric. J. Agric. Res.*, 8: 2385-2402, doi: 10.5897/AJAR12.1248

Meir, S., Akerman, M., Fuchs, Y., Zauberman, G., 1995. Further studies on the controlled atmosphere storage of avocados. *Postharvest Biol. Tec.*, 5:323-330, doi: 10.1016/0925-5214(94)00032-N

Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiro, B., Cohen, E., Fuchs, Y., 1996. Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Can. J. Bot.*, 74:870-874, doi: 10.1139/b96-108

- Müller, M., 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, doi: 10.1186/1746-4811-7-37
- Muñoz, P. Munné-Bosch, S., 2018. Photo-oxidative stress during leaf, flower and fruit development. *Plant Physiology*, 176: 1004-1014, doi: 10.1104/pp.17.01127
- Muñoz, P. Munné-Bosch, S., 2019. Vitamin E in plants: biosynthesis, transport, and function. *Trends in Plant Science*, 24: 1040-1051, doi: 10.1016/j.tplants.2019.08.006
- Ornelas, P. J. de Jesus, Yahia, E.M., 2003. Effects of prestorage dry and humid hot air treatments on the quality, triglycerides and tocopherol contents in 'Hass' avocado fruit. *J. Food Qual.*, 27:115-126, doi: 10.1111/j.1745-4557.2004.tb00642.x
- Pérez, K., Mercado, J., Soto-Valdez, H., 2004. Effect of storage temperature on the shelf life of hass avocado (*Persea americana*). *Food Sci. Tec. Int.*, 10:73-77, doi: 10.1177/1082013204043763
- Pesis, E., Marinansky, R., Zauberman, G., Fuchs, Y., 1994. Prestorage low-oxygen atmosphere treatment reduces chilling injury symptoms in 'Fuerte' avocado fruit. *HortScience*, 29: 1042–1046, doi: 10.21273/HORTSCI.29.9.1042
- Pesis, E., Ackerman, M., Ben-Arie, R., Feygenberg, O., Feng, X., Apelbaum, A., Goren, R., Prusky, D., 2002. Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biol. Tec.*, 24:171-181, doi: 10.1016/S0925-5214(01)00134-X
- Prabath Pathirana, U.A., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H., 2013. Changes in lipid oxidation stability and antioxidant properties of avocado in response to 1-MCP and low oxygen treatment under low-temperature storage. *Int. Food Res. J.*, 20:1065- 1075

Shewfelt, R.L., del Rosario, B.A., 2000. The Role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruit and vegetables. *HortScience*, 35: 575-579, doi: 10.21273/HORTSCI.35.4.575

Sivankalyani, V., Feygenberg, O., Maorer, D., Zaaroor, M., Fallik, E., Alkan, N., 2015. Combined treatments reduce chilling injury and maintain fruit quality in avocado fruit during cold quarantine. *PLoS ONE*, 10: e0140522

Wang, X., Kobiler, I., Lichter, A., Leikin-Frenkel, A., Pesis, E., Prusky, D., 2006. 1-MCP prevents ethylene-induced accumulation of antifungal diene in avocado fruit. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 67:261–267, doi:10.1016/j.pmpp.2006.03.002

Wang, S., Shi, X., Liu, F., Laborda, P., 2021. Effects of exogenous methyl jasmonate on quality and preservation of postharvest fruit: A review. *Food Chem.*, 353:129482, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129482

Weber, P., Bendich, A., Machlin, L. J., 1997. Vitamin E and human health: Rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition*, 13:450-460.

Woolf, A.B., Requejo-Tapia, C., Coxa, K.A., Jackman, R.C., Gunson, A., Arpaia, M.L., White, A., 2005. 1-MCP reduces physiological storage disorders of ‘Hass’ avocados. *Postharvest Biol. Tec.*, 3:43–60, doi: 1016/j.postharvbio.2004.07.009

Woolf, A.B., 1997. Reduction of chilling injury in stored “Hass” avocado fruit by 38 °C water treatments. *HortScience*, 32:1247-1251, doi: 10.21273/HORTSCI.32.7.1247.

Woolf, A.B., Watkins, C.B., Bowen, J.H., Lay-Yee, M., Maindonald, J.H., Ferguson, I.B., 1995. Reducing external chilling injury in stored ‘Hass’ avocados with dry heat treatments. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 120:1050-1056, doi: 10.21273/JASHS.120.6.1050

Xiang, W., Wang, H.W., Sun, D.W., 2020. Phytohormones in postharvest storage of fruit and vegetables: mechanisms and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 24:1-15, doi: 10.1080/10408398.2020.1864280

Yahia, E.M., Woolf, A.B., 2011. Avocado (*Persea americana* Mill.). A: Yahia, E.M. (Ed) *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruit*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 125-186, doi: 10.1533/9780857092762.125

Zhang, Y., Butelli, E., De Stefano, R., Schoonbeek, H., Magusin, A., Pagliarani, C., Wellner, N., Hill, L., Orzaez, D., Granell, A., Jones, J. D. G., Martin, C., 2013. Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Curr. Biol.*, 23:1094-1100, doi: 10.1016/j.cub.2013.04.072

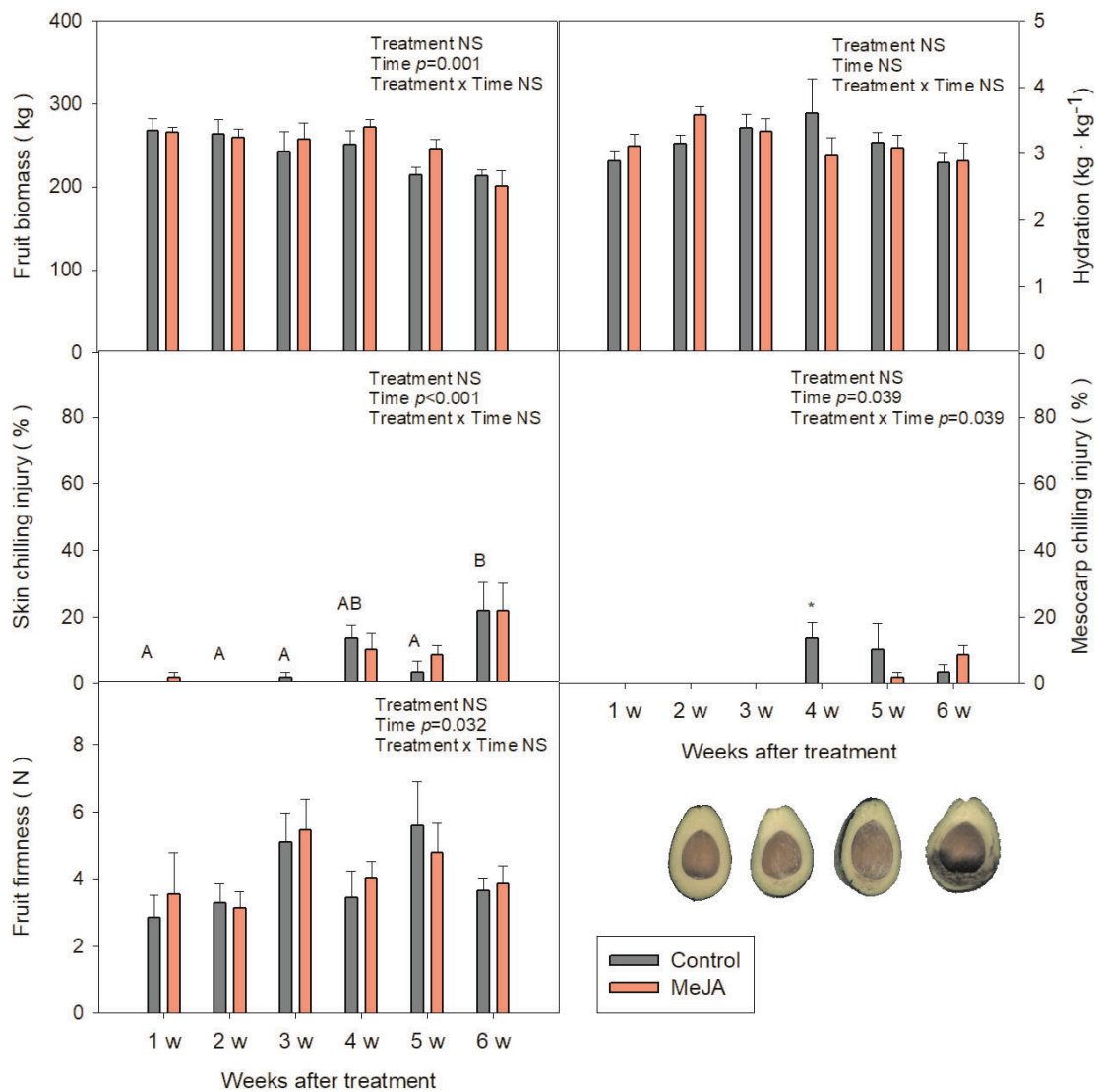


Figure 1. Physiological state of ripen avocado fruit as indicated by fruit biomass, hydration, fruit firmness and chilling injury affection after cold storage in control and methyl jasmonate treated fruit. Data indicates mean and standard error of 6 replicates ($n=6$). Asterisks show significant differences between treatments for a sampling time and capital letters show significant differences among times for control treatment.

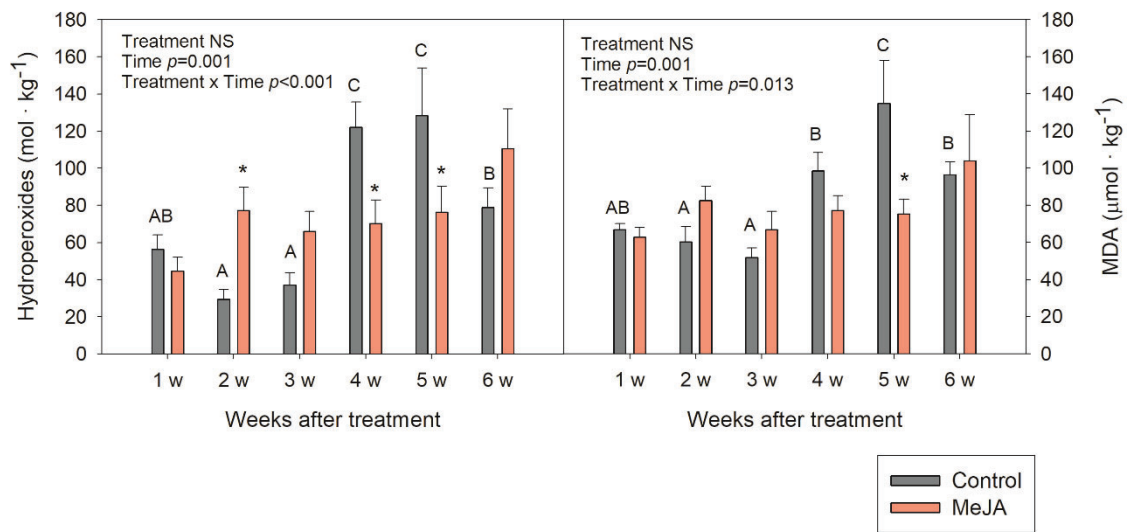


Figure 2. Extent of lipid peroxidation, as indicated by the amount of lipid hydroperoxides (primary product of lipid peroxidation) and MDA (secondary product of lipid peroxidation) of avocado mesocarp treated with control or methyl jasmonate treatments. Data indicates mean and standard error of 6 replicates (n=6). Asterisks show significant differences between treatments for a sampling time and capital letters show significant differences among times for control treatment.

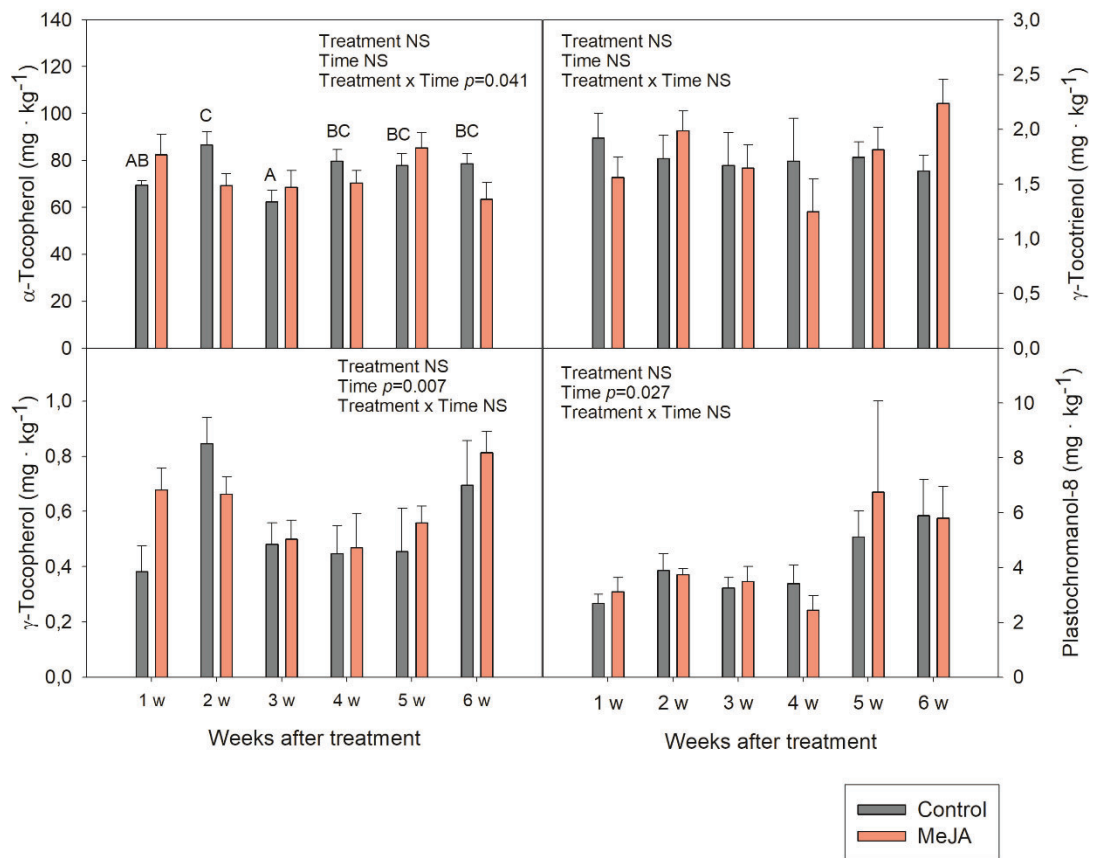


Figure 3. Tocochromanol composition and content of avocado mesocarp under control and methyl jasmonate treatments. Data indicates mean and standard error of 6 replicates (n=6). Asterisks show significant differences between treatments for a sampling time and capital letters show significant differences among times for control treatment.

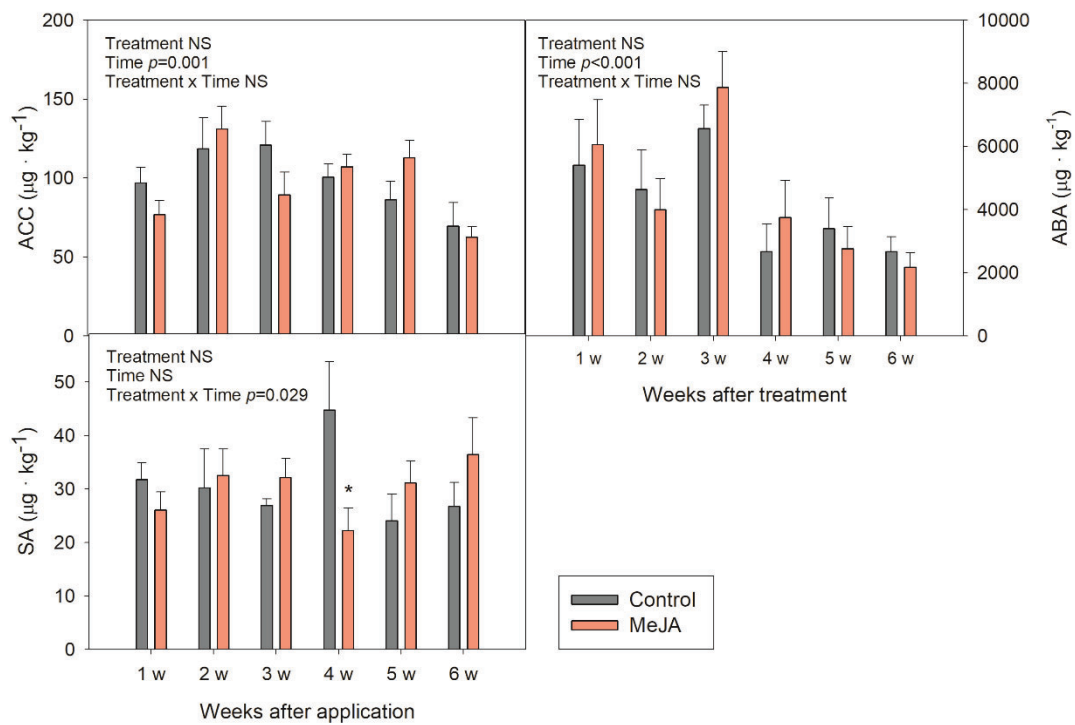


Figure 4. Contents of stress-related hormones like the precursor of ethylene, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) in avocado mesocarp under control and methyl jasmonate treatments. Data indicates mean and standard error of 6 replicates ($n=6$). Asterisks show significant differences between treatments for a sampling time and capital letters show significant differences among times for control treatment.

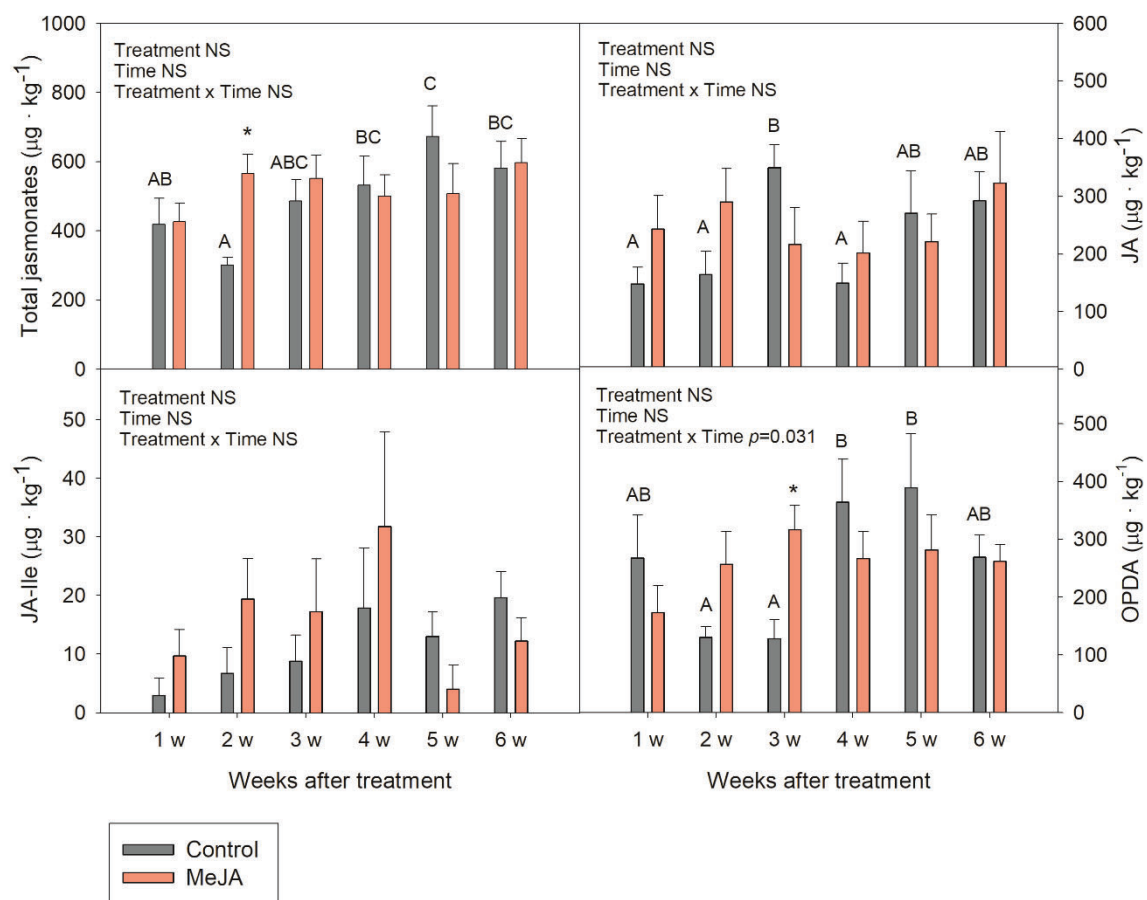


Figure 5. Contents of total jasmonates, jasmonic acid (JA), its direct precursor 12-*oxo*-phytodienoic acid (OPDA) and the conjugated active form of jamonoyl-isoleucine (JA-Ile) in avocado mesocarp under control and methyl jasmonate treatments. Data indicates mean and standard error of 6 replicates (n=6). Asterisks show significant differences between treatments for a sampling time and capital letters show significant differences among times for control treatment.

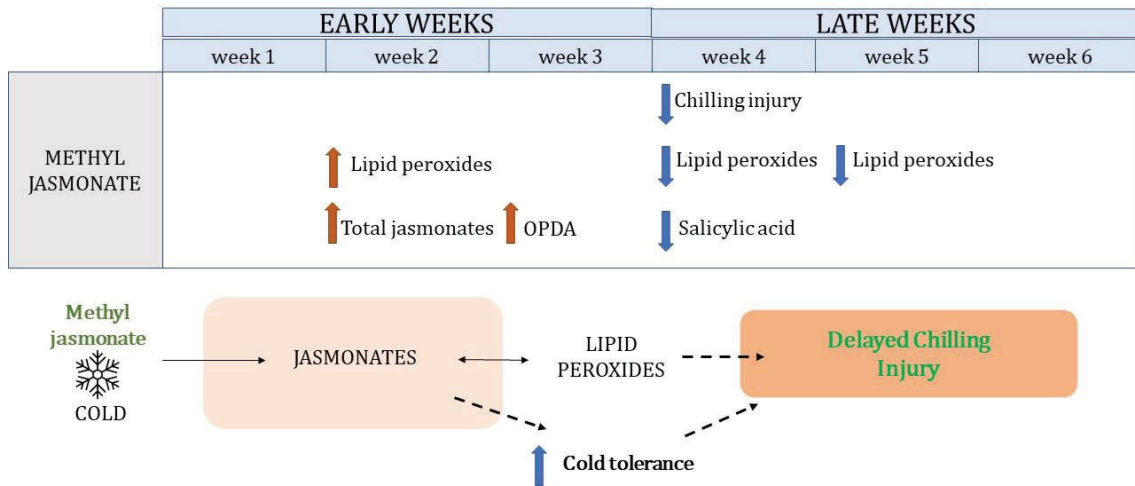


Figure 6. Effects of methyl jasmonate application on the mechanisms behind cold tolerance in avocado mesocarp explained through lipid peroxides and jasmonates signalling at early and late stages of cold exposure. OPDA: 12-*oxo*-phytodienoic acid.



DISCUSSIÓ

1. L'alvocat com a model de fruits climatèrics

La majoria de fruits climatèrics com el tomàquet, pateixen un procés de maduració comercial que pot tenir lloc tant a la planta com després de la collita gràcies a la capacitat d'iniciar la fase climatèrica en estadis de pre-collita. No obstant, existeixen fruits com les peres, els kiwis, els mangos i l'alvocat que no tenen aquest comportament sinó que aquest procés només s'indueix si abans se n'ha fet la collita, tot i que, en el cas de les peres i els mangos, no totes les varietats es comporten de la mateixa forma i algunes sí poden assolir una maduració comercial completa en l'arbre (Lindo-García et al., 2019; Lindo-García et al., 2020). D'aquesta manera, la maduració comercial només pot assolir-se si hi ha una separació del fruit de l'arbre (Murayama et al., 2015; Khan et al., 2021). En aquest sentit, l'alvocat és un fruit que s'ajusta a aquest comportament i no inicia la maduració comercial si el fruit està encara unit a l'arbre, fenomen que es coneix en anglès com a "tree factor" (Burg i Burg, 1962). Generalment, en tomaquera, la maduració comercial en l'arbre no impedeix que els fruits assoleixin una bona qualitat organolèptica adequada al consum, però quan fruits com l'alvocat, el kiwi, el mango i la pera romanen units a l'arbre durant llargs períodes de temps, després d'assolir una maduració fisiològica completa, la qualitat del fruit es veu negativament afectada, ja que s'impedeix que la maduració comercial succeeixi amb normalitat. Com a resultat, s'obtenen fruits amb propietats alterades i poc apreciats pels consumidors, ja que presenten afectacions en la textura i el gust. En concret, Murayama et al., (2015) afirmen que els fruits que tenen una maduració comercial en l'arbre no assoleixen un estovament complet, resultant en fruits amb fermesa elevada i una textura alterada. Així mateix, la collita determina canvis bioquímics en mangos relacionats amb la degradació de midó i acumulació de sucres durant la maduració comercial (Drouillard et al., 2021). En definitiva, es destaca el comportament diferencial d'aquest tipus de fruits en la maduració comercial post-collita respecte el procés en tomàquet. D'aquesta manera, l'alvocat pot ser un model d'estudi representatiu per entendre la maduració comercial dels fruits que es regulen de la mateixa forma. Així mateix, l'alvocat roman en un estat fisiològic madur i no és fins que es separa el fruit de l'arbre, que s'inicia la maduració comercial, la qual està associada a la producció d'etilè, posterior a l'acumulació del seu precursor directe, l'àcid 1-aminocicloropà-1-carboxílic (ACC; Gouble et al., 1995; Owino et al., 2002) i un pic de respiració. Aquest comportament facilita l'estudi del procés de maduració

comercial, donat que hi ha una clara diferenciació entre el procés de la maduració fisiològica i la maduració comercial. A més, la naturalesa climatèrica de l'alvocat comporta una maduració comercial molt ràpida assolint-se per complet entre el cinquè i setè dia després de la collita, depenent de la varietat o dels tractaments post-collita (capítol 2; Bill et al., 2014). D'aquesta manera, l'alvocat és un bon model d'estudi per a comprendre esdeveniments relacionats amb la maduració comercial, donat que ofereix avantatges relacionats amb la diferenciació de les etapes de fructificació i maduració comercial, i amb el ràpid procés climatèric que accentua els canvis bioquímics implicats, així com les modificacions en la textura, el gust i els aromes.

Tanmateix, cal considerar que el tomàquet no és un fruit amb un contingut elevat de vitamina E, a diferència de l'alvocat (capítol 1) i que, per tal d'aprofundir en el rol de la vitamina E en fruits climatèrics, el tomàquet s'allunya de ser un model adequat per l'estudi degut a que altres fruits destaquen més pels nivells elevats d' α -tocoferol (Taula 2). Considerant els fruits comparats en aquesta taula, el tomàquet té un contingut d'1 μg per g de fruit ocupant la 12a posició entre els fruits amb més vitamina E, mentre que l'alvocat 'Bacon' i 'Hass' ocupen la 6a i 8a posició, respectivament, doblant el contingut del tomàquet (amb valors entre 1,97-2,37 μg per g de fruit comestible; Taula 2) i, segons els resultats del capítol 1, la varietat d'alvocat 'Bacon' encara té uns nivells més elevats amb 2,37 μg per g de fruit comestible. Tot i que és important incloure els tococromanols en la ingesta diària per ser components beneficiosos per la salut, donada la seva participació en diversos processos del metabolisme humà (Nakagawa et al., 2007), a l' α -tocoferol se li atribueix més importància per exercir la funció específica de la vitamina E. En el metabolisme humà, existeix un enzim de transport de l' α -tocoferol i és la proteïna de transferència d' α -tocoferol (Arai i Kono, 2021), però aquest no reconeix ni transporta altres isoformes de tococromanol. L' α -tocoferol s'absorbeix als intestins i posteriorment, s'uneix a lipoproteïnes del plasma, en concret, a la lipoproteïna de molt baixa densitat, lipoproteïna de baixa densitat i lipoproteïna d'alta densitat, per facilitar el seu transport fins als hepatòcits on s'allibera. L' α -tocoferol lliure s'unirà a la proteïna de transferència d' α -tocoferol del fetge i posteriorment es transportarà amb noves lipoproteïnes alliberades al plasma, arribant a altres òrgans del cos (Arai i Kono,

2021). Gràcies a aquest enzim, la vitamina E pot actuar, en l'organisme, com antioxidant en la reducció de radicals oxidants oferint protecció contra l'oxidació de lipoproteïnes tot reduint el risc de patir malalties cardiovasculars (Freedman et al., 1996; Clarke et al., 2008). Així mateix, l'absorció i acció de la vitamina E dependrà de la capacitat de síntesi d'aquesta proteïna i del metabolisme de les lipoproteïnes. Cal destacar doncs, que el metabolisme de la vitamina E en humans està molt relacionat amb el metabolisme dels àcids grassos i, l'alvocat és un fruit amb un contingut rellevant d'ambdós components, per tant, s'emfatitzen els beneficis que aporta la seva ingesta en humans (Dreher i Davenport, 2013).

Taula 2. Contingut de vitamina E (tococromanols totals i α -tocoferol) en diferents fruits ordenats de major a menor contingut d' α -tocoferol. Unitats expressades en mg per 100g de fruit comestible.

Fruit	α-Tocoferol	Tococromanols	Referència
Gavarró	4,14	4,38	Piironen et al., 1986
Oliva verda	3,81	3,81	Elmadfa i Meyer, 2017
Durian	3,77	4,80	Isabelle et al., 2010
Mora vermella	2,95	3,62	Piironen et al., 1986
Pera verda	2,71	2,73	Isabelle et al., 2010
Alvocat, 'Bacon'	2,37	2,85	capítol 1
Grosella negra	2,23	3,06	Piironen et al., 1986, Elmadfa i Meyer, 2017
Alvocat, 'Hass'	1,97	2,36	USDA, 2018
Kiwi	1,69	1,97	Isabelle et al., 2010
Mora	1,43	3,74	Elmadfa i Meyer, 2017
Caqui	1,11	1,18	Isabelle et al., 2010
Tomàquet	1,00	1,45	Elmadfa i Meyer, 2017
Mango	0,90	0,96	USDA, 2018
Gerds	0,88	3,68	Piironen et al., 1986, Elmadfa i Meyer, 2017
Grosella vermella	0,82	1,45	Piironen et al., 1986

Préssec	0,71	0,75	Chun et al., 2006, Elmadfa i Meyer, 2017
Raïm	0,63	0,9	Piironen et al., 1986
Mangostan	0,57	26,98	Isabelle et al., 2010
Figa	0,34	0,75	Chun et al., 2006
Maduixa	0,28	0,41	Chun et al., 2006
Poma	0,24	0,24	Piironen et al., 1986
Mandarina	0,19	0,19	Isabelle et al., 2010
Plàtan	0,13	0,33	Chun et al., 2006

2. L'alvocat 'Bacon' i la rellevància del fruit en el comerç global

Els fruits tropicals han despertat un gran interès mundial i, per aquesta raó augmenta la motivació per a la seva producció per part dels agricultors i el seu valor econòmic al mercat mundial. La producció de fruits tropicals, com ara els mangos, les bananes, les pinyes i els avocats, està en expansió constant. En concret, el volum de les exportacions d'alvocat ha incrementat en els països productors, des del 2014 fins al 2018, destacant Amèrica Central i, en concret, Mèxic com a principal país productor i exportador. Així mateix, el segueixen Perú, Xile, Sud-Àfrica i Kènia, entre d'altres (Figura 6). Mèxic produeix un total de 1,9M t anuals i té 180.000 ha cultivables dedicades a l'alvocat (FAO, 2018).

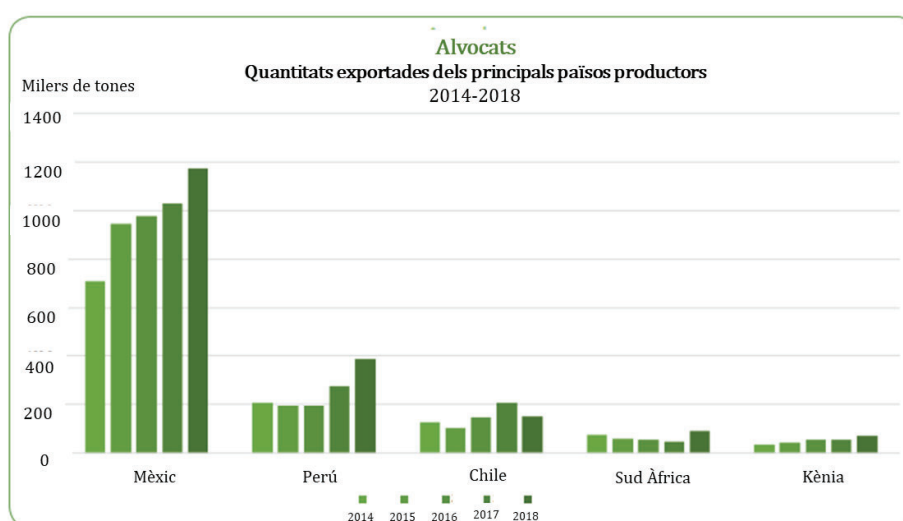


Figura 6. Volum exportat d'alvocat; dades des de l'any 2014 fins al 2018. Font: FAO, 2018.

A Europa, els principals consumidors d'alvocat són Holanda, França, Bèlgica i Luxemburg, segons dades del 1999 (FAO, 2018), però el país productor més rellevant del continent és Espanya. Concretament, Espanya ocupa la 15a posició entre els països que cultiven alvocats amb 88.000 t produïdes anualment i 11.200 ha cultivables els darrers anys (FAO, 2018). Des de l'any 2010 fins al 2019, les exportacions i importacions de fruits han augmentat considerablement a Espanya, sent el principal exportador de fruits a Alemanya, França i el Regne Unit i important majoritàriament fruits dels Estats Units i del Marroc (MAPAMA, 2019). Aquestes importacions s'atribueixen principalment als fruits tropicals o de contra-estació com, per exemple, l'alvocat. Tant el valor de les exportacions com el de les importacions ha augmentat en aquest període, sent al voltant d'un 62% i 100% superiors, respectivament. Entre tots els fruits, l'alvocat ocupa un 4% dels exportats i un 10% dels importats a Espanya (Taula 3).

Taula 3. Evolució del comerç exterior d'alvocats des de l'any 2015 al 2019. IMP: importacions; EXP: exportacions. Font: adaptada de MAPAMA, 2019.

	2015	2016	2017	2018	2019	Var. 19/18
EXP (M€)	199,69	246,38	308,52	299,15	343,58	14,9%
IMP (M€)	114,94	181,31	223,59	237,94	304,85	28,1%
Saldo (M€)	84,75	65,07	84,93	61,21	38,73	-36,7%
EXP (t)	84.384	91.665	107.098	108.892	119.144	9,4%
IMP (t)	60.989	88.363	98.902	129.323	136.013	5,2%
Preu EXP (€/kg)	2,37	2,69	2,88	2,75	2,88	5,0%
Preu IMP (€/kg)	1,88	2,05	2,26	1,84	2,24	21,8%

Aquests darrers anys, el valor de les exportacions ha augmentat degut a un increment del 42% en el pes i volum i un 21% en el preu de l'alvocat. Tot i així, les importacions d'aquest fruit segueixen tenint molta rellevància a la península (MAPAMA, 2019).

Essencialment, el mercat de l'alvocat gira entorn la varietat 'Hass', la qual va ser descoberta per un agricultor de Califòrnia als anys 1920. Des d'aquest moment, s'ha potenciat la comercialització d'aquesta varietat, ja que produeix un fruit més petit i, per tant, ofereix un consum més adequat a la ingesta diària i, a més, presenta una pell més lignificada facilitant el transport intercontinental. Aquestes característiques van

propiciar l'expansió de l'alvocat 'Hass' que ràpidament va guanyar renom gràcies a la seva textura i la seva demanda va augmentar per sobre de la d'altres varietats més grans i amb un exocarpi menys resistent. Tot i així, existeix una gran diversitat d'alvocats gràcies a la domesticació que es va implementar des de més enllà dels 500 A.C. A Espanya, destaca principalment el cultiu de dues varietats, la varietat 'Hass' i la varietat 'Bacon'. Tot i que el cultiu de la varietat 'Bacon' és minoritari en comparació a la 'Hass', adquireix cada cop més valor, ja que no només s'utilitza com a pol·linitzador de la varietat 'Hass', sinó que també se li ha tret profit a la seva producció primerenca (al voltant dels mesos de octubre i novembre). A més, desperta curiositat als consumidors per la seva pell llisa de coloració verda, tret molt característic i distintiu d'aquesta varietat. Addicionalment, tal i com veiem en el capítol 1, l'alvocat 'Bacon' destaca per ser una varietat amb un gran contingut de vitamina E, majoritàriament en forma d' α -tocoferol, presentant nivells per sobre dels de la varietat 'Hass'. Cal mencionar que la varietat 'Bacon' també acumula una petita quantitat de δ -tocotrienol, al qual se li han atribuït propietats beneficioses per la salut humana (capítol 1; Guthrie et al., 1997; Quershi et al., 2000; Nakagawa et al., 2007). Aquestes diferències entre varietats no es deuen només amb l'origen geogràfic sinó també a la gran heterogeneïtat genètica associada a l'origen de les domesticacions i creacions de diferents races d'alvocat com *P. americanavar. drymifolia* (comunament coneguda com raça Mexicana), *var. guatemalensis* (coneguda com a raça Guatemalensa) i *var. americana* (o raça de les Índies occidentals; Lahav i Lavi, 2009). Tot i així, les estratègies de domesticació, les diferents tècniques de cultiu i la posterior selecció segons la productivitat, la qualitat del fruit i la vida útil portades a terme al llarg de la història han donat peu a una gran heterogeneïtat en els cultius tal i com es plasma en el contingut de tococromanols en les varietats 'Hass' procedents de diversos orígens (capítol 1). L'acumulació de plastocromanol-8 també adquireix certa rellevància tenint en compte les seves propietats com a potent antioxidant en el metabolisme vegetal (Casadesús et al., 2020), però hi ha poca informació enfocada a les propietats del plastocromanol-8 en la nutrició i, per tant, no es coneix encara si ofereixen grans beneficis en la salut humana ni en quina proporció ho fan. Ara bé, tal i com s'especifica en el capítol 1, el plastocromanol-8 i els tocotrienols estan presents al mesocarpi de l'alvocat tot i que en concentracions molt més baixes que les de l' α -tocoferol.

Així mateix, pel que fa al contingut de vitamina E, la varietat 'Bacon' pot oferir avantatges en la salut per sobre de la varietat 'Hass' a través de la seva ingesta, donada l'aportació superior d' α -tocoferol, en individus amb una absorció de lípids adequada com s'ha mencionat anteriorment, proporcionant més activitat de vitamina E. Tot i que en la varietat 'Bacon' predominen el β -tocoferol i el γ -tocoferol respecte altres varietats (sobretot en el cas del β -tocoferol), en el plasma no s'hi detecten nivells elevats, possiblement degut a la baixa capacitat d'absorció de l'organisme (Arai i Kono, 2021), d'aquesta manera exerceixen poca activitat de vitamina E en el metabolisme humà. Apart de l' α -tocoferol, els tocotrienols tenen propietats beneficioses contra diversos tipus de càncer i malalties cardiovasculars (Eitsuka et al., 2013; Ji et al., 2013; Nawawi, 2013), i tot i que els nivells de tocotrienols no varien considerablement entre varietats, el δ -tocotrienol s'ha detectat únicament a la varietat 'Bacon'. Així mateix, els nivells de δ -tocotrienol presents en el mesocarpi de l'alvocat 'Bacon' (47 μg per 100 grams de fruit), juntament amb l' α -tocoferol, poden potenciar l'efecte antioxidant sobre el metabolisme humà i ajudar a la prevenció del risc de càncer. L'èxit comercial de l'alvocat 'Hass' s'atribueix, doncs, a uns aspectes més logístics i pràctics en el consum, però l'augment del coneixement sobre la qualitat antioxidant en altres varietats pot ser un factor suficient per incentivar el consum de l'alvocat 'Bacon', considerant la presència de δ -tocotrienol en el mesocarpi d'aquesta varietat (capítol 1). D'aquesta manera, identificadors de traçabilitat o més especificitat en l'etiquetatge de fruits pot facilitar al consumidor prendre una decisió més conscient dels productes escollits per a la seva ingesta, conèixer quins beneficis pot aportar seleccionar un producte o un altre i, en el cas dels fruits, poder escollir alternatives més ecològiques. De la mateixa manera, a través de canvis en la demanda condicionats per aquest tipus d'informació addicional, es pot evitar promoure el monocultiu a nivell nacional i internacional.

3. Maduració comercial i sobre-maduració en l'alvocat

L'alvocat és un fruit climatèric i, per tant, l'etilè té un rol principal en el procés de maduració comercial. Tot i que al llarg de molts anys s'ha associat aquesta hormona amb la maduració comercial dels fruits climatèrics, recentment s'està atribuint el resultat d'aquest procés no tan sols a l'etilè, sinó a una complexa interacció entre

altres fitohormones com l'àcid abscísic o les auxines, com s'ha descrit en tomàquets (Giovannoni et al., 2004; Kumar et al., 2014; Iqbal et al., 2017). Pel que fa als alvocats, en el capítol 2 veiem que la maduració comercial succeeix molt ràpidament en el temps degut a l'elevada taxa de producció d'etilè i de respiració pròpies dels fruits climatèrics (Kassim et al., 2013). La producció d'etilè en alvocats és de 80µL/L, superior a la d'altres fruits climatèrics com les bananes (40µL/L) o els mangos (3µL/L; Bill et al., 2014). En l'alvocat 'Bacon' es pot apreciar com, després de la collita, la maduració comercial transcorre en dues fases: la fase inductora coincidint amb el pic d'àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic (ACC) a les 4h i, per tant, suggerint un increment en la capacitat de síntesi de l'etilè, i la segona fase, associada al propi procés que coincideix amb el pic de ACC als 5d després de la collita (capítol 2). Entre el dia 7 i el 10, el fruit ja comença a experimentar processos relacionats amb la sobre-maduració (capítol 2). En la fase inductora, el perfil hormonal no suggereix que cap altra fitohormona, apart de l'ACC, pugui estar exercint una funció en aquesta fase, donat que no s'observen increments en el contingut endogen. D'aquesta manera, la collita de l'alvocat 'Bacon' és suficient per passar del sistema inhibitori 1 a l'autocatalític 2 en la producció d'etilè, tal i com indica el segon pic d'ACC relacionat directament amb la maduració comercial. Notablement, aquest pic segueix la mateixa dinàmica que el d'altres fitohormones, tot augmentant al dia 5 com és el cas de l'àcid abscísic que, a la vegada, coincideix amb el d'altres fitohormones, complementant estudis previs que suggereixen que l'àcid abscísic aplicat exògenament té un rol inductor de la maduració comercial (Blakey et al., 2009; Meyer et al., 2017). Per altra banda, s'ha establert que l'àcid abscísic pot estimular la producció d'etilè durant la maduració comercial i induir la síntesi d'enzims implicats en l'estovament del fruit com les hidrolases (Lohani et al., 2004; Zhang et al., 2009; Iqbal et al., 2017). Per aquesta raó, el manteniment dels nivells elevats d'àcid abscísic en estadis posteriors a dia 5, podrien estar relacionats amb l'estovament del fruit en la maduració comercial i sobre-maduració, on la fermesa del fruit es veu dràsticament reduïda. De la mateixa manera, s'ha suggerit que les auxines podrien estar realitzant una funció reguladora de l'estovament de les parets cel·lulars (Adato i Gazit, 1976; Figueroa et al., 2009). En concret, els resultats del capítol 2 suggereixen que, a més de l'etilè, l'àcid abscísic, les auxines, les GAs i els jasmonats també podrien estar implicats en el procés de maduració comercial i la substancial disminució de la fermesa en l'alvocat 'Bacon'.

Per tant, l'àcid abscísic, les auxines i les GAs podrien estar implicats en l'estovament del fruit interaccionant entre elles promovent l'acció d'expansines i d'altres enzims implicats en l'expansió cel·lular (McQueen-Mason et al., 1992; Català et al., 2000; Trainotti et al., 2007; Tadiello et al., 2016; Busatto et al., 2019). Més específicament, la pèrdua de fermesa entre els dies 2 i 10 de la maduració comercial es pot deure a la interacció de les auxines amb l'etilè, induint l'activitat d'enzims remodeladors de la paret cel·lular com la poligalacturonidasa, pectina metilesterasa, β -glucosidasa i expansines encarregats de la solubilització i degradació de polisacàrids i pectines de les parets cel·lulars vegetals (Tucker i Laties, 1984; Tateishi et al., 2007; Figueroa et al., 2009; Yahia i Woolf, 2011; Defilippi et al., 2018). Els jasmonats també poden estar implicats en la maduració comercial, en concret, el precursor directe OPDA. L'OPDA es produeix a partir de l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats de les membranes lipídiques (Gfeller et al., 2010; Dave i Graham, 2012). Els resultats suggereixen que l'OPDA exerceix un rol diferencial al dels jasmonats, ja que ni els nivells de jasmonat lliure ni dels conjugats augmenten durant la maduració comercial, excepte en el cas de la jasmonoil-fenilalanina, tot i que aquesta forma conjugada es considera inactiva. Ara bé, Hazman et al., (2015) explica que fulles de mutants d'arròs deficientes en OPDA presentaven una major tolerància a estrès salí gràcies a un increment en la capacitat antioxidant i, per tant, una reducció dels nivells ROS acumulats per la situació d'estrès, tot suggerint que nivells baixos de OPDA podrien relacionar-se amb una major activitat detoxificadora de ROS. D'aquesta manera, l'augment de OPDA en els estadis finals de maduració comercial i sobre-maduració en l'alvocat, pot estar associat a una pèrdua de la capacitat antioxidant (capítol 2). Com a resultat, es deriva al desenvolupament de danys tissulars i deterioració del fruit deguts a la peroxidació lipídica, propis de l'etapa de sobre-maduració en fruits. A més, segons estudi recents, l'OPDA exerceix una funció en la defensa contra l'estrès biòtic, on podria estar exercint una funció individual o conjunta amb l'àcid abscísic, l'etilè i la peroxidació lipídica en estadis de sobre-maduració on el deteriorament dels teixits facilita l'entrada de patògens (Varsani et al., 2019; Toshima et al., 2014; Müller et al., 2017).

En resum, diverses fitohormones podrien estar implicades en la maduració comercial, però, en aquest cas, el procés es veu estimulat principalment per la retroalimentació positiva entre l'àcid abscísic, les auxines i l'etilè que promouen esdeveniments relacionats amb aquest procés fisiològic (Brenner et al., 2005; Lee et al., 2010; Chen

et al., 2016; Meyer et al., 2017; Wang et al., 2019b; Figura 7) el qual assoleix el seu estat màxim entre els 5 i els 7 dies, tal i com suggereixen els valors de fermesa en l'alvocat 'Bacon'. Tot i així, el període de maduració comercial en els alvocats és molt variable i no només depèn del genotip i la varietat sinó que també depèn de l'estat de maduració del fruit en la collita i, per tant, també de paràmetres relacionats amb el cultiu (Hurtado-Fernández et al., 2016).

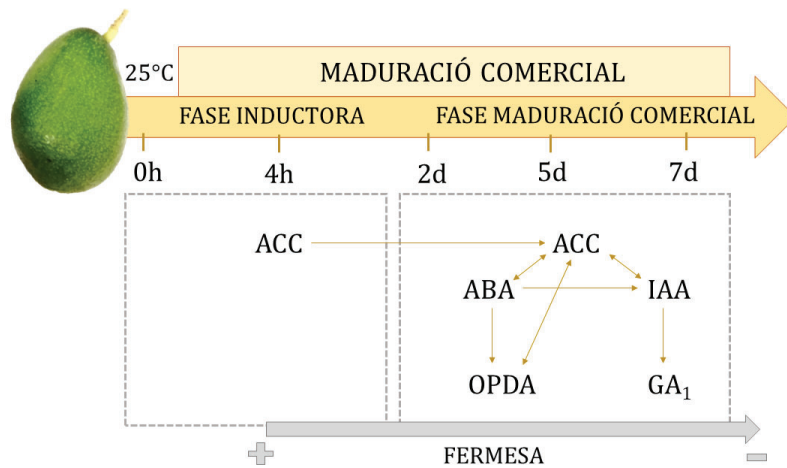


Figura 7. A) Interacció hormonal en la maduració comercial de l'alvocat durant la post-collita diferenciant entre la fase inductora modulada per l'etilè i la fase de maduració comercial regulada addicionalment per altres fitohormones. ACC: àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic; ABA: àcid abscísic; GA₁: gibberel·lina 1; IAA: àcid indol-3-acètic; OPDA: àcid 12-oxo-fitodienoic.

4. Límit entre la tolerància a les baixes temperatures i els danys per fred

L'abastiment d'alvocats als països no productors requereix d'importacions procedents dels països productors. Tot i així, durant l'etapa de transport després de la collita, cal tenir en consideració que la fase climatèrica associada a la maduració comercial transcorre tan ràpidament que dificulta que l'alvocat arribi en condicions adequades al consumidor, tot reduint la seva comercialització (Bill et al., 2014). Així mateix, cal la implementació de tècniques que permetin retardar aquest procés, com és, per exemple, l'emmagatzematge en fred. Generalment, els alvocats en la post-collita es mantenen a unes temperatures d'entre 5-13°C al llarg de 2-4 setmanes segons el cultivar (Bill et al., 2014). El transport i emmagatzematge a baixes temperatures redueix la taxa de producció d'etilè i, en conseqüència es retarda o, fins i tot, s'inhibeix la maduració comercial (Kassim et al., 2013; Arpaia et al., 2018). Alhora, durant l'exposició a les baixes temperatures, es poden desencadenar respostes fisiològiques de tolerància al fred tot i que, si es fa en un termini prolongat o a temperatures per sota del llindar de tolerància es poden causar danys fisiològics

irreversibles als teixits com el desordre conegut com a danys per fred (capítol 4; Jackman et al., 1988; Yahia i Woolf, 2011). Així mateix, un transport en condicions inadequades pot desencadenar desordres fisiològics i pèrdua de qualitat del fruit que afectin negativament a la comercialització de l'alvocat.

Els fruits d'alvocat en post-collita responen de forma similar a les fulles quan s'exposen a baixes temperatures. Tal i com s'observa al capítol 2, la resposta de tolerància al fred es desencadena ràpidament en el fruit després de 4h d'exposició al fred per l'augment de l'àcid abscísic i els jasmonats, especialment la jasmonoil-isoleucina, el principal jasmonat actiu implicat en defensa contra estressos biòtics i abiòtics com la salinitat, la sequera i les temperatures extremes (Howe et al., 2018; Hazman et al., 2019). L'increment de JA-Ile podria estar mediat indirectament per auxines. Les auxines indueixen l'expressió de l'enzim jasmonat-amido sintetasa codificat per *JAR1*, que s'encarrega de la conversió de l'àcid jasmònic a la forma conjugada JA-Ile (Staswick i Tiryaki, 2004). A més, l'increment de jasmonats el dia 5 es pot relacionar amb l'augment d'àcid abscísic en una resposta enfront l'estrès per fred (capítol 2; Figura 8). S'ha descrit extensament la funció d'aquestes fitohormones en diversos òrgans de plantes i les cascades de senyalització que s'activen per tal de promoure mecanismes de tolerància (Lv et al., 2018; An et al., 2021). Els jasmonats, com el metil jasmonat, estan involucrats en l'expressió de gens de resposta a l'estrès (*COR*) a través d'una cascada de senyalització anomenada ICE-CBF-COR (An et al., 2021). En pomes, s'ha descrit que la presència de jasmonats indueix la producció de la proteïna BBX37 que, per una banda, promou la síntesi i expressió d'*ICE*, l'inductor de l'expressió de *C-REPEAT-BINDING FACTOR-COLD RESPONSIVE (CBF)* i, per altra banda, s'uneix als promotors dels gens *CBF* per induir la seva síntesi, tot establint una resposta sinèrgica per a la tolerància al fred, induint la cascada ICE-CBF. Els factors de transcripció CBF activaran directament l'expressió de gens *COR* al nucli (An et al., 2021). Per altra banda, la resposta de tolerància al fred està regulada simultàniament per l'àcid abscísic que participa d'una forma semblant en la cascada de senyalització ICE-CBF. Les quinases dependent de calci interaccionen amb les ROS generades durant l'estrès i indueixen la síntesi d'àcid abscísic, tal i com s'ha descrit en fulles de tomaquera (Lv et al., 2018) desencadenant la cascada de senyalització CBF-COR. En ambdós casos, els gens *COR* regularan l'expressió de gens implicats en la resposta antioxidant detoxificadora de ROS, la resposta hormonal i altres funcions de protecció

(Chinnusamv et al., 2007; Yu et al., 2020). Així mateix, i similar a les pomes (An et al., 2021), es suggereix que aquestes respostes podrien tenir lloc en fruits d'alvocat un cop ja se n'ha fet la collita, al llarg de la cadena de producció quan el fruit s'exposa a baixes temperatures (Figura 8; capítol 2). A més, l'àcid abscísic també podria estar exercint una funció de manteniment del balanç hídric del fruit tot evitant una deshidratació que podria relacionar-se amb processos d'estovament associats a l'emmagatzematge a baixes temperatures en fruits (Ma et al., 2018).

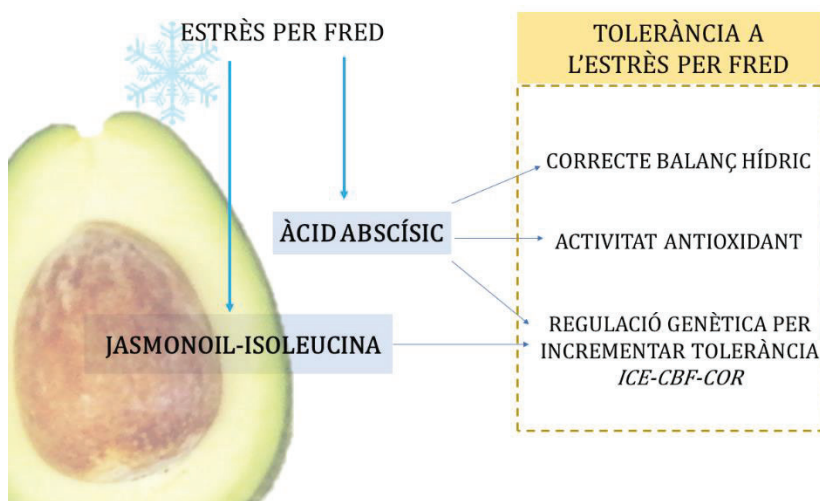


Figura 8. Resposta hormonal en el fruit d'alvocat en post-collita enfront l'exposició al fred i mecanismes que participen en la tolerància a l'estrès per baixes temperatures.

Per una banda, en el capítol 1, s'ha observat que durant un temps curt d'exposició al fred no s'observen pèrdues en la qualitat dels alvocats 'Bacon', però sí que s'aprecien canvis en la composició de tococromanols acompanyada d'una acceleració transitòria en les reaccions de peroxidació lipídica degut a canvis metabòlics. Aquesta possible senyalització deguda a la peroxidació lipídica suposa un increment en els nivells de plastocromanol-8, γ -tocoferol i γ -tocotrienol (capítol 1). Per altra banda, l'emmagatzematge a baixes temperatures per un període de temps llarg no afavoreix l'acumulació de vitamina E. Contràriament, a partir dels 10 dies d'exposició a 4°C, els alvocats comencen a patir una disminució en el contingut antioxidant degut a la reducció de la vitamina E total, suposant una caiguda en l'aportació nutricional del 20% i, per tant, una pèrdua de la qualitat antioxidant del fruit (capítol 1).

Encara s'evidencien més els efectes del fred si l'emmagatzematge a 4°C es prolonga més enllà de setmanes i mesos en el temps, quan comencen a sorgir símptomes associats al "black spot" a la pell de l'alvocat (Lindh et al., 2021) i associats als danys

per fred al mesocarpi (Figura 9). El “black spot” a la pell sorgeix a les poques setmanes de mantenir el fruit a 4°C, en canvi, al mesocarpi es comencen a manifestar danys per fred a partir de les 4 setmanes d’iniciar la cadena de fred en la varietat ‘Bacon’, tal i com s’explica en el capítol 4. Aquest fenomen és el que causa més rebuig en el mercat a l’hora de comprar alvocats, ja que el consumidor no pot discernir a simple vista entre el fenotip del fruit afectat i del no afectat i, en conseqüència, no pot fer una tria conscient, tot generant desconfiança entorn el producte.

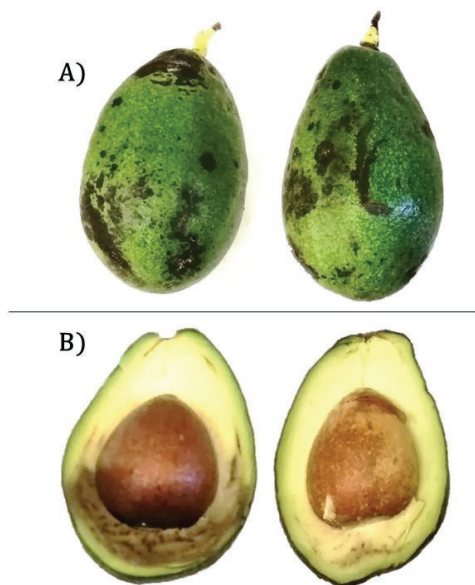


Figura 9. A) Síntomes de “black spot” en l’exocarpi de l’alvocat ‘Bacon’. B) Síntomes de danys per fred en el mesocarpi de l’alvocat ‘Bacon’.

Els danys per fred al mesocarpi s’aprecien especialment quan el fruit ha assolit un estat complet de maduració comercial i es manifesten, principalment, com una decoloració o enfosquiment del mesocarpi en àrees al voltant del pinyol (Glowacz et al., 2017). Fins i tot, pot desenvolupar-se un greu enfosquiment del mesocarpi si els límits de tolerància se sobrepassen excessivament, com es va poder observar a partir de les 5 setmanes d’emmagatzematge de l’alvocat ‘Bacon’ a 4°C (capítol 4). El desordre al mesocarpi és conseqüència de les reaccions d’oxidació i acumulació de ROS en excés donant lloc a canvis bioquímics al teixit quan les condicions adverses es mantenen. Aquest emmagatzematge en fred durant un temps prolongat induïx un estrès al fruit, que deriva en la producció incontrolada i excessiva de ROS als cloroplasts a partir de les 4 setmanes d’exposició, tot causant danys tissulars deguts a les cascades de peroxidació lipídica (Romojaro-Casado, 2016) i, resultant en un

estrès oxidatiu quan els mecanismes antioxidants són insuficients per reduir l'activitat de les ROS (Noctor and Foyer, 2005). S'ha descrit que l'enfosquiment del mesocarpí en l'alvocat (Figura 10) és degut a l'acció de la polifenol oxidasa i la peroxidasa, les quals participen en l'oxidació de fenols a o-quinones (molt inestables, ràpidament reaccionen amb aminoàcids i proteïnes donant lloc a una coloració marronosa) i en l'acumulació de ROS, respectivament (Pesis et al., 2002; Zhu et al., 2021b). A més, la maduració comercial posterior a l'emmagatzematge en fred també incrementa els símptomes associats als danys per fred gràcies a l'acció dels enzims polifenol oxidasa i lipoxigenasa estimulada per l'acció de l'etilè (Pesis et al., 2002; Velázquez-López et al., 2020). Així mateix, l'exposició a temperatura ambient posterior a l'emmagatzematge a baixes temperatures promou l'activitat enzimàtica induint processos d'oxidació i acumulació de ROS (Zhu et al., 2021b) que, finalment, propicien la pèrdua en la integritat de les membranes i afavoreixen l'enfosquiment del mesocarpí, manifestant danys per fred en l'alvocat.

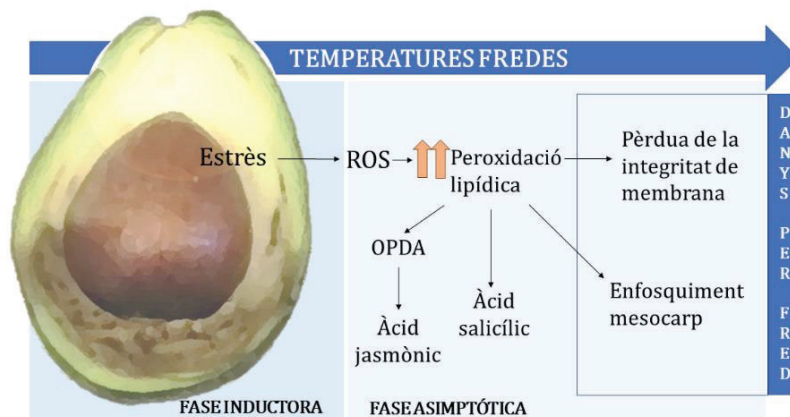


Figura 10. Efecte prolongat de l'exposició a baixes temperatures sobre els danys per fred i mecanisme a través del qual es promou l'aparició dels símptomes de danys per fred a l'alvocat.

En altres fruits com les peres i les pomes, s'ha descrit mecanismes d'acció concrets que deriven en els danys per fred, en aquest cas, coneguts com a "fruit scald", on també l'etilè adquireix un rol rellevant. En pomes, el desordre es manifesta com a taques marronoses a la pell causades a partir de la producció i oxidació de terpens, en concret l' α -farnesè, en trienols conjugats estimulada a nivell transcripcional per l'etilè. En aquesta situació, l'estrès abiòtic indueix a síntesi de terpens com a resposta per ajudar a l'estabilització de les membranes i evitar danys tissulars (Lindo-García

et al., 2021). De forma similar, un elevat contingut en flavonols i àcid linolenic permeten reduir aquests símptomes associats als danys per fred en peres (Bussatto et al., 2021).

Per aquesta raó, identificar els fenòmens implicats en el desenvolupament de danys per fred en diversos fruits i establir els límits i condicions ambientals per a la seva aparició és de gran utilitat per tal de reduir l'impacte que causa, emfatitzant el cas dels fruits tropicals com els alvocats i, de la mateixa manera, evitar el malbaratament i augmentar la comercialització i l'apreciació per part dels consumidors.

5. Contraposició dels desordres “black spot” i danys per fred

Els danys per fred són un desordre que sorgeix de l'emmagatzematge de fruits a temperatures baixes. Els alvocats són molt susceptibles a patir aquest desordre a la pell i al mesocarpi. Diversos estudis atribueixen un fenotip de taques negres a la pell de l'alvocat com a danys per fred però, realment, existeix certa controvèrsia en la identificació d'aquest fenomen. Lindh (2021) descriu que els símptomes de “black spot” s'han confós freqüentment amb els danys per fred a la pell dels alvocats i remarca que cal fer-ne la distinció, ja que el “black spot” no s'atribueix als mateixos mecanismes d'acció que es descriuen per als danys per fred i que, sota les mateixes condicions, l'aparició dels símptomes a la pell no coincideix amb l'aparició dels símptomes al mesocarpi del fruit. Els danys per fred inclouen una afectació externa (pell fosca o amb marques) i interna (decoloració o enfosquiment del mesocarpi) del fruit, mentre que el “black spot” només compromet la integritat de la pell i es manifesta com a taques negres o marrons d'entre 2-3 cm de diàmetre a la pell de l'alvocat amb absència d'afectacions al mesocarpi. A més, estudis previs confirmen que en alvocats ‘Hass’, els tractaments de metil jasmonat redueixen els símptomes associats als danys per fred al mesocarpi del fruit però, l'ús d'aquest compost no genera cap efecte sobre la pell amb “black spot” (Glowacz et al., 2017; Uarrota et al., 2020), marcant la diferència entre els dos desordres. Tot i així, el “black spot” també sorgeix quan els fruits són emmagatzemats a baixes temperatures i/o en atmosferes controlades durant un període de temps prolongat i està estimulat per la producció de ROS i la pèrdua de pes durant l'emmagatzematge (Uarrota et al., 2020). Aquest

desordre va ser descrit per primer cop en alvocats 'Hass' de Perú que havien estat emmagatzemats en fred (Everett et al., 2015).

En el capítol 4, es fa referència als danys per fred al mesocarpi tot i observar, a més, un desordre a la pell de l'alvocat coincidint amb el fenotip descrit com a "black spot". De la mateixa manera que defensa Lindh (2021), els resultats demostren un comportament diferencial del metil jasmonat sobre el mesocarpi i exocarpi de l'alvocat 'Bacon'. Per tant, aquest estudi confirma els resultats de Lindh (2021) i suggereixen que l'efecte protector del metil jasmonat en els danys per fred no actua contra el "black spot" de la pell de l'alvocat.

6. Estratègies per a la millora de la qualitat de l'alvocat en la cadena de producció

La cadena de producció en fruits tropicals esdevé cada vegada més exigent ja que s'inclouen necessitats de pràctiques més sostenibles i estratègies més ecològiques en la conservació dels aliments. Sobretot es pretén descartar l'ús d'agents químics com per exemple l'1-MCP, que s'empra en la cadena de producció per reduir les pèrdues degudes al metabolisme climatèric del fruit durant l'emmagatzematge i, per tant, per garantir una major qualitat quan sigui exposat al supermercat (Pintado et al., 2021). Així mateix, els agricultors i els responsables de la cadena de producció indaguen en possibles estratègies que redueixin la petjada ambiental, enfocades a canvis més ecològics i sostenibles que s'apropin a allò que el consumidor demana. D'aquesta manera, amb el canvi de perspectiva i de pràctica sorgeixen necessitats que afrontin diversos aspectes relacionats amb la reducció dels danys per fred i la millora de la qualitat en els fruits per tal de reduir les pèrdues que es produeixen constantment avui dia durant la cadena de producció.

Considerant que l'alvocat de la varietat 'Bacon' no destaca pel contingut de vitamina B₆, ja que és inferior en comparació amb el d'altres varietats rellevants en el mercat (capítol 3), és d'interès incrementar els nivells endògens en base als beneficis que pot aportar a la nutrició i salut del consumidor donats els seus valors elevats d' α -tocoferol i δ -tocotrienol, tal i com es descriuen en el capítol 1. Per aquesta raó, es disposa d'una varietat d'alvocat que no només és molt rica en vitamina E, sinó que també ho pot ser

en vitamina B₆ a través de pràctiques senzilles en la post-collita. Aquest fet suposa un avantatge per al consumidor, ja que es proporciona una millora en les propietats nutraceutiques dels fruits ingerits i, de la mateixa manera, s'ofereix una major protecció del sistema nerviós i prevenció de patir malalties coronàries gràcies a la ingesta de vitamina B₆ (Jayedi i Zargar, 2018; Calderón-Ospina i Nava-Mesa, 2019). En concret, els fruits són una font de vitamina B₆ però, precisament, la varietat 'Bacon' té un baix contingut de PLP (capítol 3), per tant, la manipulació dels nivells endògens a través de tècniques en post-collita adquireix importància per augmentar el valor nutricional del fruit. Segons els experiments duts a terme al capítol 3, una tècnica bàsica per assolir aquest objectiu és l'emmagatzematge a 4°C durant un temps curt (2 dies) que permet duplicar el contingut endogen de PLP en aquesta varietat d'alvocat. A més, si els alvocats es pretenen emmagatzemar durant llargs períodes a temperatures baixes, es poden realitzar aplicacions exògenes de PLP que permet no només augmentar 4 vegades el contingut total de vitamina B₆ en l'alvocat sinó que, a través d'aquesta aplicació, els nivells endògens superen als d'altres varietats, com la 'Hass' i la 'Fuerte' (capítol 3). A més, l'aplicació exògena de PLP a 4°C garanteix el manteniment dels nivells de vitamina B₆ durant un període de temps llarg (30 dies), tot fent de l'alvocat 'Bacon' una excel·lent font d'antioxidants, a més d'incrementar el valor nutricional d'aquesta varietat i, de la mateixa manera, l'interès del consumidor.

Un cop destacats els beneficis que aporta l'aplicació exògena de PLP en les propietats del fruit, en el capítol 3, s'ha estudiat si aquesta aplicació també té un efecte sobre la qualitat del fruit durant la maduració comercial de l'alvocat. Durant el procés de maduració comercial que experimenten els fruits, els alvocats tractats amb PLP presenten un lleuger retard en la progressió de l'estovament del mesocarp i, fet que pot estar associat a una resposta hormonal dependent de CKs i jasmonats. Les formes d'IPA i OPDA – precursors directes de les formes actives de CKs i jasmonats, respectivament – s'associen a processos d'inhibició de la maduració comercial (en el cas de les CK) i a funcions de defensa contra estrès biòtic o abiòtic (en el cas dels jasmonats; Sang et al., 2011). Així mateix, aquest augment en IPA i OPDA als fruits tractats amb PLP poden estar retardant el procés de maduració comercial a través de modulacions amb l'etilè, tal i com s'indica amb les ràtios IPA/ACC, CKs/ACC i OPDA/ACC, tot regulant processos fisiològics i bioquímics relacionats amb la fermesa del fruit i la remodelació de les parets cel·lulars (capítol 3; Davey i Van Staden, 1978;

Massolo et al., 2014; Ainalidou et al., 2016). Tot i així, aquests canvis només succeeixen de forma transitòria donat que tant els fruits tractats com els no tractats assoleixen la mateixa fermesa després de mantenir-se 5 dies a temperatura ambient (coincidint amb un estat complet de maduració comercial). Per aquesta raó, l'aplicació de PLP pot afavorir la comercialització de l'alvocat, ja que no té efectes sobre la fermesa final del fruit, un cop ha assolit un estat de maduració comercial complet. En canvi, el tractament de PLP si retarda lleugerament l'estovament en estadis inicials i intermedis de la maduració comercial, facilitant la manipulació del fruit durant la cadena de producció i, de la mateixa manera, evitant possibles danys mecànics que es poden produir al llarg de tot el procés (Figura 11). En resum, el PLP està propiciant la qualitat del fruit en aspectes d'integritat, millorant la percepció i l'apreciació del consumidor.

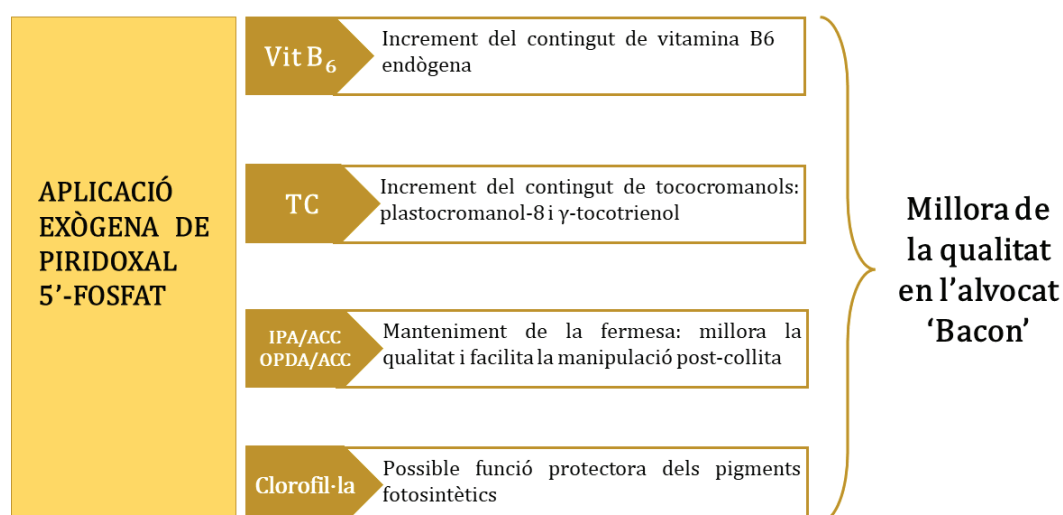


Figura 11. Paràmetres de millora de la qualitat de l'alvocat 'Bacon' per mitjà de l'aplicació exògena de piridoxal 5'-fosfat. Vit B6: vitamina B6; TC: tococromanols; IPA/ACC: relació isopentenil adenosina/àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic; OPDA/ACC: relació àcid 12-oxo-fitodienoic/àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic.

Respecte a l'emmagatzematge a baixes temperatures en un termini llarg de temps, l'aplicació de PLP no afecta al metabolisme del fruit en la resposta hormonal de tolerància al fred ni sembla afectar a l'estovament ni a l'estat oxidatiu del fruit (capítol 3). Clarament, la composició de tococromanols sí que es veu afectada per l'aplicació.

En aquest cas, no suposa una reducció en el contingut de tocoferols però sí un lleuger augment en els tocotrienols (especialment la forma γ -tocotrienol) i el plastocromanol-8, possiblement relacionat amb una inducció de la resposta detoxificadora contra les ROS generades durant l'exposició a baixes temperatures a les cèl·lules i, per tant, oferint protecció contra processos oxidatius (capítol 3). A més, el PLP sembla estar realitzant una funció protectora contra la degradació de clorofil·les gràcies a l'acció dels tococromanols (Figura 11; Fernández-Marín et al., 2021; Matringe et al., 2008). Tot i així, es necessita investigar en més profunditat per desmantellar el nexa molecular entre els tococromanols, les clorofil·les i el PLP. D'aquesta manera, els alvocats tractats amb PLP acumulen més tococromanols que els no tractats i aquest fet pot influir positivament en la nutrició humana, ja que s'atribueixen diverses propietats a aquests antioxidants, especialment al γ -tocotrienol (Eitsuka et al., 2013; Ji et al., 2013; Nawawi, 2013). No obstant, cal considerar que l'augment d'aquests compostos no és rellevant en la totalitat del contingut de tococromanols i, per tant, no es pot esperar un efecte notori sobre la ingesta diària de vitamina E. Tot i així, l'increment de vitamina B₆ sí que augmenta notablement i es pot esperar un efecte positiu en el sistema nerviós relacionat amb la funció neuroprotectora i antioxidant d'aquesta vitamina. Per tant, realitzar tractaments de PLP en fruits pot aportar beneficis durant la post-collita per a la comercialització de l'alvocat de la varietat 'Bacon'.

Pel que fa a la qualitat relacionada amb la integritat del fruit i els danys per fred, el tractament per aplicació de metil jasmonat, realitzat als experiments que conformen el capítol 4, ha resultat eficient en la reducció dels danys per fred en l'alvocat 'Bacon'. Els jasmonats exerceixen una funció de protecció en l'alvocat retardant l'aparició de danys induïts per l'estrès per fred (capítol 4). D'aquesta manera, els fruits tractats amb metil jasmonat presenten una acumulació inicial de jasmonats, els quals indueixen respostes fisiològiques de tolerància al fred i es prolonga el manteniment de la integritat de les membranes que, altrament sense l'aplicació, serien danyades per les ROS. Així mateix, en els resultats obtinguts al capítol 4, es poden observar dues fases en la resposta enfront l'emmagatzematge en fred en els fruits tractats amb metil jasmonat, tal i com suggereix Romojaro-Casado, (2016). La fase inicial s'associa a una resposta de tolerància al fred que coincideix amb reaccions de peroxidació lipídica; aquestes poden estar desencadenant respostes per assolir aquest estat de tolerància

sense conseqüències negatives en el fruit – apart d'un increment en els hidroperòxids lipídics a la setmana 2 acompanyant un possible estrès oxidatiu en el fruit madur –. Contràriament, després de diverses setmanes d'exposició a baixes temperatures, l'aplicació exògena de metil jasmonat sembla exercir una funció protectora contra l'estrès per fred a través de la reducció en la peroxidació lipídica (com s'observa en els nivells d'hidroperòxids i MDA les setmanes 4 i 5) en el mesocarpi dels alvocats (Figura 12). Cal destacar que els fruits emmagatzemats a baixes temperatures i tractats amb metil jasmonat presenten un nivells inferiors d'àcid salicílic a la setmana 4, coincidint amb un impacte menor dels danys per fred. Per tant, es suggereix que els efectes resultants de l'aplicació de metil jasmonat en el mesocarpi dels alvocats podrien estar vinculats amb el contingut d'àcid salicílic, suposant una reducció en els nivells endògens d'aquesta hormona en fruits madurs després de les 4 setmanes d'emmagatzematge, possiblement relacionada amb processos redox, defensa contra patògens i/o processos de mort cel·lular.

En resum, el tractament de metil jasmonat per esprai redueix i retarda eficientment els danys per fred en l'alvocat 'Bacon' a través de la reducció de la resposta induïda per reaccions de peroxidació lipídica en el mesocarpi d'alvocats madurs. En aquest cas, els danys per fred es comencen a observar a partir de la setmana 5 d'exposició i emmagatzematge a baixes temperatures, tot prolongant la vida útil del fruit fins a una setmana. D'aquesta manera, s'amplia el coneixement establert sobre el metil jasmonat, el qual s'aplica en altres estudis amb altres tècniques més cost-eficients com l'emmagatzematge en cambres de gas, en condicions controlades, tal i com s'ha estudiat en diferents varietats d'alvocat (Meir et al., 1996; Sivankalyany et al., 2015; Glowacz, et al., 2017).

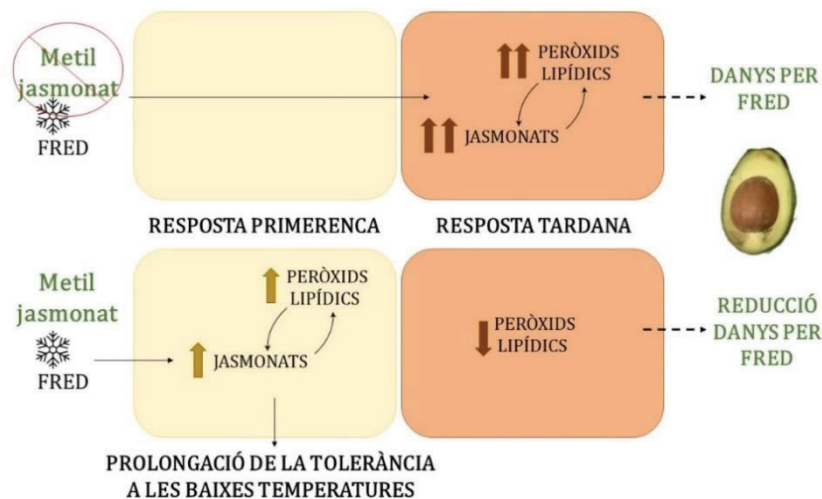


Figura 12. Efectes en la peroxidació lipídica i en els nivells de jasmonats i proposta de mecanisme de tolerància a les baixes temperatures per reduir els danys per fred a través de l'aplicació de metil jasmonat en alvocat.

Tot i que actualment existeixen diverses tècniques en la post-collita per reduir els danys per fred en fruits que s'emmagatzemen durant períodes prolongats de temps a baixes temperatures, com tractaments d'aire o d'aigua calents (Woolf et al., 1995; Woolf, 1997), emmagatzematge en atmosferes controlades (Pesis et al., 1994) i l'ús de l'1-MCP (Pesis et al., 2002), val la pena considerar altres alternatives com l'esprai de metil jasmonat, ja que s'ha demostrat que aquesta molècula podria tenir efectes positius en l'acumulació de compostos fenòlics gràcies a la inducció de l'expressió de l'enzim fenilalanina amoni-liasa, que participa en la via de l'àcid shikímic per la formació de fenols (Cocetta et al., 2015; Garrido-Bigotes et al., 2018). Els mètodes anteriorment mencionats per reduir els danys per fred, a diferència dels elicitors com el metil jasmonat, tenen impactes negatius en el fruit ocasionant una pèrdua en el valor nutricional o poden, fins i tot, tenir efectes secundaris en altres processos fisiològics conduint a pèrdues en la qualitat del fruit (Ornelas i Yahia, 2003; Wang et al., 2006). Considerant que els tococromanols formen part del sistema antioxidant amb funció no-enzimàtica i que actuen com a detoxificants de ROS i de radicals lipoperoxils en les membranes cloroplàstiques (Falk i Munné-Bosch, 2010; Muñoz i Munné-Bosch, 2019), el manteniment d'aquests compostos a través de l'aplicació de metil jasmonat és rellevant per permetre un balanç redox correcte que permeti conservar les propietats lipídiques tant apreciades en l'alvocat (Araújo et al., 2018) i, també, per l'interès entorn la vitamina E en la nutrició humana donat les propietats beneficioses que té per a la salut (Weber et al., 1997).



CONCLUSIONS

- L'alvocat 'Bacon' és la varietat comercial, entre les analitzades, amb un contingut de vitamina E més elevat presentant nivells superiors als de la varietat 'Hass' altament comercialitzada.
- La varietat 'Bacon' destaca, a més de l' α -tocoferol, per la presència de δ -tocotrienol en el mesocarpi, el qual s'associa a propietats beneficioses per a la salut.
- L'exposició a baixes temperatures (4°C) durant un període de 10 dies pot provocar una pèrdua de vitamina E en el fruit i, per tant, reduir el valor nutricional i qualitat de l'alvocat.
- Durant la maduració comercial, a part dels canvis metabòlics deguts a la naturalesa climatèrica del fruit, altres fitohormones com l'àcid abscísic, els jasmonats, les auxines i les GAs poden estar implicades en el procés.
- L'exposició de l'alvocata a 4°C induïx una resposta d'acimatació contra l'estrès per fred regulada per l'àcid abscísic i els jasmonats.
- L'emmagatzematge en fred per un termini de temps curt pot duplicar els nivells endògens de vitamina B₆ en l'alvocat 'Bacon'.
- L'aplicació exògena de PLP per immersió a una concentració de 9 mM pot incrementar fins a 4 vegades els continguts endògens de vitamina B₆ en l'alvocat 'Bacon', fins i tot superant els nivells de la varietat Hass.
- L'aplicació exògena de PLP retarda lleugerament la maduració comercial quan l'alvocat es manté a temperatura ambient, reduint l'estovament del fruit possiblement mitjançant una resposta hormonal dependent de CKs i jasmonats.
- L'aplicació exògena de PLP en alvocats 'Bacon' emmagatzemats a baixes temperatures augmenta el contingut de γ -tocotrienol i plastocromanol-8.
- L'alvocat de la varietat 'Bacon' és susceptible de patir danys per fred al mesocarpi, els quals s'inicien a partir de les 4 setmanes d'emmagatzematge a 4°C.

- L'aplicació de metil jasmonat pot retardar els danys per fred, sense afectar negativament als nivells de vitamina E.
- L'aplicació de metil jasmonat per esprai és una tècnica simple, econòmica i eficient a implementar al llarg de la cadena de producció per reduir els símptomes associats als danys per fred en alvocats 'Bacon', tot prolongant fins a una setmana la vida útil i comercialització del fruit.

BIBLIOGRAFIA

- Adato, I. & Gazit, S. (1976). Response of harvested avocado fruits to supply of indole-3-acetic acid, gibberellic acid and abscisic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 24, 1165-1167
- Aghdam, M. S., & Bodbodak, S. (2013). Physiological and biochemical mechanisms regulating chilling tolerance in fruits and vegetables under postharvest salicylates and jasmonates treatments. *Scientia Horticulturae*, 156, 73–85
- Aghdam, M. S., Luo, Z., Li, L., Jannatizadeh, A., Fard, J. R., & Pirzad, F. (2020). Melatonin treatment maintains nutraceutical properties of pomegranate fruits during cold storage. *Food Chemistry*, 303, 125385
- Aghdam, M. S., Luo, Z., Jannatizadeh, A., Sheikh-Assadi, M., Sharafi, Y., Farmani, B., & Razavi, F. (2019). Employing exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in tomato fruits by upregulating ZAT2/6/12 giving rise to promoting endogenous polyamines, proline, and nitric oxide accumulation by triggering arginine pathway activity. *Food Chemistry*, 275, 549–556
- Ainalidou A, Tanou G, Belghazi M, Samiotaki M, Diamantidis G, Molassiotis A, & Karamanoli K. (2016). Integrated analysis of metabolites and proteins reveal aspects of the tissue-specific function of synthetic cytokinin in kiwifruit development and ripening. *Journal of Proteomics*, 143, 318–333
- Aispuro-Hernández, E., Vera-Guzmán, A. M., Vargas-Arispuro, I., & Martínez-Téllez, M. Á. (2019). Low-temperature storage regulates the expression of genes related to peel pigments of grapefruit. *Scientia Horticulturae*, 254, 208-214
- An, J. P., Wang, X. F., Zhang, X. W., You, C. X., & Hao, Y. J. (2021). Apple B-box protein BBX37 regulates jasmonic acid mediated cold tolerance through the JAZ-BBX37-ICE1-CBF pathway and undergoes MIEL1-mediated ubiquitination and degradation. *New Phytologist*, 229, 2707-2729
- Aparicio, J. M., Bélanger-Quintana, A., Suárez, L., Mayo, D., Benítez, J., Díaz, M., & Escobar, H. (2001). Ataxia with isolated vitamin E deficiency: Case report and review of the literature. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 33, 206-210
- Arai, H., & Kono, N. (2021). α -Tocopherol transfer protein (α -TTP). *Free Radical Biology and Medicine*, 176, 162-175
- Araújo, R. G., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51-60
- Arpaia, M.L., Collin, S., Sievert, J., & Obenland, D. (2018) 'Hass' avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 76–84
- Aubert, C., Bony, P., Chalot, G., Landry, P., & Lurol, S. (2014). Effects of storage temperature, storage duration, and subsequent ripening on the physicochemical characteristics, volatile compounds, and

- phytochemicals of western red nectarine (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 , 4707-4724
- Bagri, D. S., Upadhyaya, D. C., Kumar, A., & Upadhyaya, C. P. (2018). Overexpression of *PDX-II* gene in potato (*Solanum tuberosum* L.) leads to the enhanced accumulation of vitamin B₆ in tuber tissues and tolerance to abiotic stresses. *Plant Science*, 272, 267-275
- Bill, M., Sivakumar, D., Thompson, A. K., & Korsten, L. (2014). Avocado fruit quality management during the postharvest supply chain. *Food Reviews International*, 30, 169-202
- Bilski, P., Li, MY., Ehrenshaft, M., Daub, ME., & Chignell, CF. (2000). Vitamin B₆ (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochemistry and Photobiology*, 71, 129–134
- Binz, P., & De Conto, S. M. (2019). Gestión de la gastronomía sustentable: Prácticas del sector de alimentos y bebidas en hospedajes. *Estudios y perspectivas en turismo*, 28, 507-525
- Blakey, R. J., Bower, J. P., & Bertling, I. (2009). Influence of water and ABA supply on the ripening pattern of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit and the prediction of water content using Near Infrared Spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 72-76
- Botton, A., Tonutti, P., & Ruperti, B. (2019). Biology and biochemistry of ethylene. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*, 93-112. Woodhead Publishing.
- Boycheva, S., Dominguez, A., Rolcik, J., Boller, T., & Fitzpatrick, T. B. (2015). Consequences of a deficit in vitamin B₆ biosynthesis de novo for hormone homeostasis and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 167 , 102-117
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L., & Schmülling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant Journal*, 44, 314-333
- Buhler, D. R., Hansen, E., & Wang, C. H. (1957). Incorporation of ethylene into fruits. *Nature*, 179, 48-49
- Burg, S. P., & Burg, E. A. (1962). Post-harvest ripening of avocados. *Nature*, 194, 398-399
- Busatto, N., Farneti, B., Tadiello, A., Oberkofler, V., Cellini, A., Biasioli, F., Delledonne, M., Cestaro, A., Noutsos, C. & Costa, F. (2019). Wide transcriptional investigation unravel novel insights of the on-tree maturation and postharvest ripening of 'Abate Fetel' pear fruit. *Horticulture Research*, 6, 1-15
- Busatto, N., Giné-Bordonaba, J., Larrigaudière, C., Lindo-Garcia, V., Farneti, B., Biasioli, F., Vrhovsek, U., & Costa, F. (2021). Molecular and biochemical differences underlying the efficacy of lovastatin in preventing the onset of superficial scald in a susceptible and resistant *Pyrus communis* L. cultivar. *Postharvest Biology and Technology*, 173, 111435

- Calderón-Ospina C. A. & Nava-Mesa M. O. (2019). B vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine and cobalamin. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 26, 5-13
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Jin, P., & Rui, H. (2009). Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. *Food Chemistry*, 115, 1458-1463
- Casadesús, A., Arabia, A., Pujolriu, R., & Munné-Bosch, S. (2020). Differential accumulation of tocochromanols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of strawberry plants subjected to reiterated water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 868-876
- Catalá, C., Rose, J. K., & Bennett, A. B. (2000). Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiology*, 122, 527-534
- Chen, H., Morrell, P.L., Ashworth, V.E.T.M., de la Cruz, M., & Clegg, M.T., (2009). Tracing the geographic origins of major avocado cultivars. *Journal of Heredity*, 100, 56-65
- Chen, J., Mao, L., Lu, W., Ying, T., & Luo, Z. (2016). Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. *Planta*, 243, 183-197
- Cheng, S., Ouyang, H., Guo, W., Guo, M., Chen, G., & Tian, H. (2021). Proteomic and physiological analysis of 'Korla'fragrant pears (*Pyrus × brestschneideri* Rehd) during postharvest under cold storage. *Scientia Horticulturae*, 288, 110428
- 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 Science*, 167, 1301-1305
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12, 444-451
- Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J. & Eitenmiller, R. (2006). Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 196-204
- Clarke, M. W., Burnett, J. R., & Croft, K. D. (2008). Vitamin E in human health and disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 45, 417-450
- Cocetta, G., Rossoni, M., Gardana, C., Mignani, I., Ferrante, A., & Spinardi, A. (2015). Methyl jasmonate affects phenolic metabolism and gene expression in blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *Physiologia Plantarum*, 153, 269-283
- Colinas, M., Eisenhut, M., Tohge, T., Pesquera, M., Fernie, A. R., Weber, A. P., & Fitzpatrick, T. B. (2016). Balancing of B₆ vitamers is essential for plant development and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28, 439-453

- Comisión Europea. (2018). Futuro de los productos ecológicos: Nueva legislación a partir de 2022. [Disponible a la web de la Unión Europea: https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/farming/organicfarming/future-organics_es. Consultat: 01/22]
- Cowan, A. K., Cripps, R. F., Richings, E. W., & Taylor, N. J. (2001). Fruit size: Towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Physiologia Plantarum*, 111, 127-136
- Dalla Valle, A. Z., Mignani, I., Spinardi, A., Galvano, F., & Ciappellano, S. (2007). The antioxidant profile of three different peaches cultivars (*Prunus persica*) and their short-term effect on antioxidant status in human. *European Food Research and Technology*, 225, 167-172
- Dave, A., & Graham, I. A. (2012). Oxylin signaling: a distinct role for the jasmonic acid precursor cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (cis-OPDA). *Frontiers in Plant Science*, 3, 42
- Davey, J. E., & Van Staden, J. (1978). Endogenous cytokinins in the fruit of ripening and non-ripening tomatoes. *Plant Science Letters*, 11, 359-364.
- Defilippi, B. G., Ejsmentewicz, T., Covarrubias, M. P., Gudenschwager, O., & Campos-Vargas, R. (2018). Changes in cell wall pectins and their relation to postharvest mesocarp softening of "Hass" avocados (*Persea americana* Mill.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 142-151
- Devireddy, A. R., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Muchero, W., & Chen, J. G. (2021). Role of reactive oxygen species and hormones in plant responses to temperature changes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8843
- Dias, C., Ribeiro, T., Rodrigues, A. C., Ferrante, A., Vasconcelos, M. W., & Pintado, M. (2021). Improving the ripening process after 1-MCP application: Implications and strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 382-396
- Dourou, A. M., Brizzolara, S., Famiani, F., & Tonutti, P. (2021). Changes in volatile organic composition of olive oil extracted from cv. 'Leccino' fruit subjected to ethylene treatments at different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 3981-3986
- Dreher, M. L., & Davenport, A. J. (2013). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 738-750
- Drewke, C., & Leistner, E. (2001). Biosynthesis of vitamin B₆ and structurally related derivatives. *Vitamins and Hormones*, 61, 121-155
- Drouillard, A., Grechi, I., Lechaudel, M., Laridon, Y., & Génard, M. (2019). A process-based model to predict the evolution and final concentration of sugars in mangoes. *Acta Horticulturae*, 1311, 91-98
- Eitsuka T, Nakagawa K, & Miyazawa T. (2013). Antiangiogenic effects of tocotrienol. In: Tan, B. (Eds.), Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols. CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.

- Elmadfa, I. & Meyer, A. (2017). Vitamin E (tocopherols and tocotrienols) in fruits and vegetables with focus on chemistry and biological activities. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*, 451-462
- Endo, H., Miyazaki, K., Ose, K., & Imahori, Y. (2019a). Hot water treatment to alleviate chilling injury and enhance ascorbate-glutathione cycle in sweet pepper fruit during postharvest cold storage. *Scientia Horticulturae*, 257, 108715
- Evans, HM., & Bishop, KS. (1922). Fetal resorption. *Science*, 55, 650
- Everett, K., Hallett, I., Rees-George, J., Chynoweth, R., & Pak, .H (2008). Avocado lenticel damage: The cause and the effect on fruit quality. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 383–390
- Facundo, H. V. D. V., Gurak, P. D., Mercadante, A. Z., Lajolo, F. M., & Cordenunsi, B. R. (2015). Storage at low temperature differentially affects the colour and carotenoid composition of two cultivars of banana. *Food Chemistry*, 170, 102-109
- Falk, J., & Munné-Bosch, S. (2010). Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1549-1566
- Fan, X., Xi, Y., Zhao, H., Liu, B., Cao, J., & Jiang, W. (2018). Improving fresh apricot (*Prunus armeniaca* L.) quality and antioxidant capacity by storage at near freezing temperature. *Scientia Horticulturae*, 231, 1–10
- FAO, 2008: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008. Disponible a: <https://www.fao.org/3/au996e/au996e.pdf> [Consultat: 10/21]
- Fernández-Marín, B., Sáenz-Ceniceros, A., Solanki, T., Robson, T. M., & García-Plazaola, J. I. (2021). Alpine forbs rely on different photoprotective strategies during spring snowmelt. *Physiologia Plantarum*, 172, 1506-1517
- Figueroa, C. R., Pimentel, P., Dotto, M. C., Civello, P. M., Martínez, G. A., Herrera, R., & Moya-León, M. A. (2009). Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit: Effect of auxin treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 51-57
- Foyer, C.H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119, 355-364
- Foyer, C.H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interference between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17, 1866-1875
- Freedman, J. E., Farhat, J. H., Loscalzo, J., & Keaney, J. F. (1996). α -Tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation*, 94, 2434-2440
- Friis, E. M., & Endress, P. K. (1990). Origin and evolution of angiosperm flowers. *Advances in Botanical Research*, 17, 99-162

- Gao, Y., Fangel, J. U., Willats, W. G., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2021). Differences in berry skin and pulp cell wall polysaccharides from ripe and overripe Shiraz grapes evaluated using glycan profiling reveals extensin-rich flesh. *Food Chemistry*, 130180
- García-Pastor, M. E., Serrano, M., Guillen, F., Zapata, P. J., & Valero, D. (2020). Preharvest or a combination of preharvest and postharvest treatments with methyl jasmonate reduced chilling injury, by maintaining higher unsaturated fatty acids, and increased aril colour and phenolics content in pomegranate. *Postharvest Biology and Technology*, 167, 111226
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P. M., & Figueroa, C. R. (2018). Jasmonate metabolism and its relationship with abscisic acid during strawberry fruit development and ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37, 101-113
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., & Farmer, E. E. (2003). The jasmonate biochemical pathway. *Science Signaling*, 3, 1-7
- Gill, S.S., Tuteja, N., (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930
- Giovannoni, J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16, S170–S180
- Giovannoni, J., Nguyen, C., Ampofo, B., Zhong, S., & Fei, Z. (2017). The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. *Annual Reviews in Plant Biology*, 68, 61–84
- Glowacz, M., Bill, M., Tinyane, P. P., & Sivakumar, D. (2017). Maintaining postharvest quality of cold stored 'Hass' avocados by altering the fatty acids content and composition with the use of natural volatile compounds—methyl jasmonate and methyl salicylate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 5186-5193
- Gol, N. B., Patel, P. R., & Rao, T. R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-195
- Gómez, F. S., Sánchez, S. P., Iradi, M. G. G., Azman, N. A. M., & Almajano, M. P. (2014). Avocado seeds: Extraction optimization and possible use as antioxidant in food. *Antioxidants*, 3, 439-454
- Gouble, B., Fath, D., & Soudain, P. (1995). Nitrous oxide inhibition of ethylene production in ripening and senescing climacteric fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 5, 311-321
- Guo, X., Liu, D., & Chong, K. (2018). Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60, 745–756
- Guthrie, N., Gapor A, Chambers A. F., & Carroll K. K. (1997). Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxife, alone and in combination. *Journal of Nutrition*, 127, 544S-548S

- Gwanpua, S. G., Van Buggenhout, S., Verlinden, B. E., Christiaens, S., Shpigelman, A., Vicent, V., Kermani, Z. J., Nicolai, B. M., Hendrickx, M., & Geeraerd, A. (2014). Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. *Food Chemistry*, 158, 283-291
- Habibi, F., & Ramezani, A. (2017). Vacuum infiltration of putrescine enhances bioactive compounds and maintains quality of blood orange during cold storage. *Food Chemistry*, 227, 1-8
- Havaux, M., Ksas, B., Szewczyk, A., Rumeau, D., Franck, F., Caffarri, S., & Triantaphylidès, C. (2009). Vitamin B₆ deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress. *BMC Plant Biology*, 9, 1-22
- Hazman, M., Hause, B., Eiche, E., Nick, P., & Riemann, M. (2015). Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice *ALLENE OXIDE CYCLASE* mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity. *Journal of Experimental Botany*, 66, 3339-3352
- Hazman, M., Sühnel, M., Schäfer, S., Zumsteg, J., Lesot, A., Beltran, F., Marquis, V., Herrgott, L., Miesch, L., Riemann, M., & Heitz, T. (2019). Characterization of jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) hormonal catabolic pathways in rice upon wounding and salt stress. *Rice*, 12, 1-14
- Hellmann, H., & Mooney, S. (2010). Vitamin B₆: A molecule for human health?. *Molecules*, 15, 442-459
- Hernández, M. L., & Cejudo, F. J. (2021). Chloroplast lipids metabolism and function. A redox perspective. *Frontiers in Plant Science*, 1636
- Hiwasa-Tanase, K., & Ezura, H. (2014). In: Nath, P., Bouzayen, M., Mattoo, A.K., Pech, J.C. (Eds.), Climacteric and non-climacteric ripening. Fruit Ripening: Physiology, Signalling and Genomics. CABI Publishing, Wallingford, 1-14
- Hofman, P.J., Fuchs, Y., & Milne, D.L. (2002). Harvesting, packaging, postharvest technology, transport and processing. In: Whiley, A.W., Schaffer, B., Wolstenholme, B.N. (Eds.), The Avocado: Botany, Production and Uses. CABI Publishing, Wallingford, 363-390
- Hormaza, J.I. (2003). Fertilization success of pollen from 'Fuerte' and 'Bacon' avocados on 'Hass' flowers. *Abstracts of the World Avocado Congress V. 200*, 450-451
- Howe, G. A., Major, I. T., & Koo, A. J. (2018). Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 387-415
- Hu, B., Sun, D. W., Pu, H., & Wei, Q. (2019). Recent advances in detecting and regulating ethylene concentrations for shelf-life extension and maturity control of fruit: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 66-82
- Huang, Q., Qian, X., Jiang, T., & Zheng, X. (2019). Effect of eugenol fumigation treatment on chilling injury and *CBF* gene expression in eggplant fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 292, 143-150

- Hurtado-Fernandez, E., Fernandez-Gutierrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. E. (2018). Avocado fruit-*Persea americana*. In: In: Rodrigues, S., de Oliveira Silva, Ebenezer., Sousa de Brito, Edy (Eds.) Exotic Fruits, Academic Press, 37-48
- Hurtado-Fernández, E., González-Fernández, J. J., Hormaza, J. I., Bajoub, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2016). Targeted LC-MS Approach to study the evolution over the harvesting season of six important metabolites in fruits from different avocado cultivars. *Food Analytical Methods*, 9, 3479-3491
- Huang, S., Zhang, J., Wang, L., & Huang, L. (2013). Effect of abiotic stress on the abundance of different vitamin B₆ vitamers in tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 63–67
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M. I. R. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 8, 475
- Isabelle, M., Lee, B., Lim, M., Koh, W., Huang, D. & Ong, C. (2010). Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chemistry*, 123, 77-84
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Marangoni, A., Parkin, K. L., & Stanley, D. W. (1988). Chilling injury. A review of quality aspects. *Journal of Food Quality*, 11, 253-278
- Jansonius, J. N. (1998). Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 759–769
- Jayarajan, S., & Sharma, R. R. (2021). Melatonin: A blooming biomolecule for postharvest management of perishable fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 318-328
- Jayedi, A., & Zargar, M. S. (2018). Intake of vitamin B₆, folate, and vitamin B12 and risk of coronary heart disease: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 2697-2707
- Ji, X., Goja, A., & Gupta, S. V. (2013). Potential of tocotrienols in lung cancer. In: Tan, B. (Ed.), Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols (2nd ed.). CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.
- Jiménez-Muñoz, R., Palma, F., Carvajal, F., Castro-Cegrí, A., Pulido, A., Jamilena, M., & Garrido, D. (2021). Pre-storage nitric oxide treatment enhances chilling tolerance of zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) by S-nitrosylation of proteins and modulation of the antioxidant response. *Postharvest Biology and Technology*, 171, 111345
- Jing, W., Lin-Chun, M., Xue-Wen, L., Zhuo, L., Cai-Hong, L., Yang-Yang, H., & Dou-Dou, L. (2018). Oxalic acid pretreatment reduces chilling injury in hami melons (*Cucumis melo* var. *reticulatus* naud.) by regulating enzymes involved in antioxidative pathways. *Scientia Horticulturae*, 241, 201–208

- Kassim, A., Workneh, T.S., & Bezuidenhout, C. N. (2013). A review on postharvest handling of avocado fruit. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 2385–2402
- Khan, S., Ullah, R., Ali, H., Waheed, A., & Abbas, Q. (2021). Elemental analysis of mango ripened by different postharvest treatments using laser induced breakdown spectroscopic. *Optik*, 246, 167770
- Khumalo, G., Goedhals-Gerber, L. L., Cronje, P., & Berry, T. (2021). The non-conformance of in-transit citrus container shipments to cold protocol markets: A systematic literature review. *Food Control*, 125, 107947
- Klee, H.H., & Giovannoni, J.J. (2011). Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Reviews of Genetics*. 45, 41-59
- Kobayashi, K., Endo, K., & Wada, H. (2017). Specific distribution of phosphatidylglycerol to photosystem complexes in the thylakoid membrane. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1991
- Kong, X., Ge, W., Wei, B., Zhou, Q., Zhou, X., Zhao, Y., & Ji, S-J. (2020). Melatonin ameliorates chilling injury in green bell peppers during storage by regulating membrane lipid metabolism and antioxidant capacity. *Postharvest Biology and Technology*, 170, 111315
- Kumar, R., Khurana, A., & Sharma, A. K. (2013). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4561-4575
- Kumar, N., Tokas, J., Raghavendra, M., & Singal, H. R. (2021). Impact of exogenous salicylic acid treatment on the cell wall metabolism and ripening process in postharvest tomato fruit stored at ambient temperature. *International Journal of Food Science & Technology*, 56, 2961-2972
- Kruk, J., Hollander-Czytko, H., Oettmeier, W. & Trebst, A. (2005). Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology*, 162, 749–757:
- Kruk, J., Szymańska, R., Cela, J., & Munné-Bosch, S. (2014). Plastochromanol-8: Fifty years of research. *Phytochemistry*, 108, 9-16
- Lado, J., Gurrea, A., Zacarías, L., & Rodrigo, M. J. (2019). Influence of the storage temperature on volatile emission, carotenoid content and chilling injury development in Star Ruby red grapefruit. *Food Chemistry*, 295, 72-81
- Lahav, E.; Lavi, U. (2009). In: Jain, S.M., Priyadarshan, P.M., (Eds.), Avocado: Genetics and breeding. Breeding plantation tree crops: Tropical species. Springer: New York, NY, USA, 2009
- Lee, S. J., Park, J. H., Lee, M. H., Yu, J. H., & Kim, S. Y. (2010). Isolation and functional characterization of CE1 binding proteins. *BMC Plant Biology*, 10, 1-13
- Li, C., Jia, H., Chai, Y., & Shen, Y. (2011). Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: a model for non-climacteric fruit ripening. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 1950-1953

- Li, L., Kitazawa, H., Zhang, R., Wang, X., Zhang, L., Yu, S., & Li, Y. (2019). New insights into the chilling injury of postharvest white mushroom (*Agaricus bisporus*) related to mitochondria and electron transport pathway under high O₂/CO₂ controlled atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 152, 45–53
- Li, Z., Wang, L., Xie, B., Hu, S., Zheng, Y., & Jin, P. (2020). Effects of exogenous calcium and calcium chelant on cold tolerance of postharvest loquat fruit. *Scientia Horticulturae*, 269, 109391
- Lindh, V., Uarrota, V., Zulueta, C., Alvaro, J. E., Valdenegro, M., Cuneo, I. F., Mery, D. & Pedreschi, R. (2021). Image analysis reveals that lenticel damage does not result in black spot development but enhances dehydration in *Persea americana* Mill. cv. Hass during prolonged storage. *Agronomy*, 11, 1699
- Lindo-García, V., Giné-Bordonaba, J., Vall-Llaura, N., Duaigües, E., & Larrigaudière, C. (2021). Unravelling the cold-induced regulation of ethylene and α -farnesene and its involvement with the development of scald-like disorders in different pear cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 174, 111441
- Lindo-García, V., Larrigaudière, C., Duaigües, E., López, M. L., Echeverría, G., & Giné-Bordonaba, J. (2020). Elucidating the involvement of ethylene and oxidative stress during on-and off-tree ripening of two pear cultivars with different ripening patterns. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 842-850
- Lindo-García, V., Larrigaudière, C., Echeverría, G., Murayama, H., Soria, Y., & Giné-Bordonaba, J. (2019). New insights on the ripening pattern of 'Blanquilla' pears: a comparison between on-and off-tree ripened fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 150, 112-121
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 4, 118
- Lohani, S., Trivedi, P. K., & Nath, P. (2004). Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 119–126
- Luo, Z., Li, D., Du, R., & Mou, W. (2015). Hydrogen sulfide alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content. *Scientia Horticulturae*, 183, 144–151
- Lurie, S., & Crisosto, C. H. (2005). Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 195–208
- Lv, X., Li, H., Chen, X., Xiang, X., Guo, Z., Yu, J., & Zhou, Y. (2018). The role of calcium-dependent protein kinase in hydrogen peroxide, nitric oxide and ABA-dependent cold acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 69, 4127-4139
- Ma, Q., Suo, J., Huber, D. J., Dong, X., Han, Y., Zhang, Z., & JingPing, R. (2014). Effect of hot water treatments on chilling injury and expression of a new C-repeat binding factor (CBF) in 'Hongyang' kiwifruit during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 97, 102–110

- Ma, X., Zhang, J., Burgess, P., Rossi, S., & Huang, B. (2018). Interactive effects of melatonin and cytokinin on alleviating drought-induced leaf senescence in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany*, 145, 1-11
- Ministeri de Agricultura, Alimentació y Medi Ambient. Real Decreto 1311/2012, de 14 de setembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. Disponible a: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2012/09/14/1311>
- MAPAMA, 2019: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Informe anual de comercio exterior agroalimentario pesquero y forestal. 2019. Disponible a: <https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/informeannual2019_tcm30-542612.pdf>
- Martinière, A, Shvedunova, M., Thomson, A. J., Evans, N. H., Penfield, S., Runions, J., & McWatters, H. G. (2011) Homeostasis of plasma membrane viscosity in fluctuating temperatures. *New Phytologist*, 192, 328-337
- Massolo, J. F., Lemoine, M. L., Chaves, A. R., Concellón, A., & Vicente, A. R. (2014). Benzyl-aminopurine (BAP) treatments delay cell wall degradation and softening, improving quality maintenance of refrigerated summer squash. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 122-129
- Mastronardi, L., Marino, D., Giaccio, V., Giannelli, A., Palmieri, M., & Mazzocchi, G. (2019). Analyzing alternative food networks sustainability in Italy: a proposal for an assessment framework. *Agricultural and Food Economics*, 7, 73.21
- Matringe, M., Ksas, B., Rey, P., & Havaux, M. (2008). Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 147, 764-778
- McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R. J., & David, K. (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4, 79
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*, 4, 1425-1433
- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiro, B., Cohen, E. & Fuchs, Y. (1996). Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Canadian Journal of Botany*, 74, 870-874
- Meyer, M. D., Chope, G. A., & Terry, L. A. (2017). Investigation into the role of endogenous abscisic acid during ripening of imported avocado cv. Hass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3656-3664
- Miller III, E. R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J., & Guallar, E. (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine*, 142, 37-46

- Morales-Sillero, A., Pérez, A. G., Casanova, L., & García, J. M. (2017). Cold storage of 'Manzanilla de Sevilla' and 'Manzanilla Cacereña' mill olives from super-high density orchards. *Food Chemistry*, 237, 1216-1225
- Mooney, S., & Hellmann, H. (2010). Vitamin B₆: Killing two birds with one stone? *Phytochemistry*, 71, 495-501
- Muñoz, P., & Munné-Bosch, S. (2018). Photo-oxidative stress during leaf, flower and fruit development. *Plant Physiology*, 176, 1004-1014
- Murayama, H., Sai, M., Oikawa, A., & Itai, A. (2015). Inhibitory factors that affect the ripening of pear fruit on the tree. *The Horticulturae Journal*, 84, 14-20
- Nakagawa, K., Shibata, A., Yamashita, S., Tsuzuki, T., Kariya, J., Oikawa, S., Miyazawa, T. (2007). In vivo angiogenesis is suppressed by unsaturated vitamin E, tocotrienol. *Journal of Nutrition*, 137, 1938-1943
- Nawawi HM. (2013). Tocotrienols and atherosclerosis: Potential in cardioprotection. In: Tan, B., (Ed.), Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols, (2nd ed.). CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA.
- Nayak, S. N., Aravind, B., Malavalli, S. S., Sukanth, B. S., Poornima, R., Bharati, P., Hefferon, K., Kole, C., & Puppala, N. (2021). omics technologies to enhance plant based functional foods: An overview. *Frontiers in Genetics*, 12, 742095-742095
- Ndraha, N., Hsiao, H. I., Vlajic, J., Yang, M. F., & Lin, H. T. V. (2018). Time-temperature abuse in the food cold chain: Review of issues, challenges, and recommendations. *Food Control*, 89, 12-21
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., & Foyer, C.H. (2002). Drought and oxidative load in wheat leaves: A predominant role for photorespiration? *Annals of Botany*, 89, 841-850
- Ohdake, S. (1932). Isolation of "Oryzanin"(Antineuritic Vitamin) from Rice-polishings.(First Report). *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 8, 11-46
- Owino, W. O., Nakano, R., Kubo, Y., & Inaba, A. (2002). Differential regulation of genes encoding ethylene biosynthesis enzymes and ethylene response sensor ortholog during ripening and in response to wounding in avocados. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127, 520-527
- Ozdemir, F. & Topuz, A. (2004). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry*, 86, 79-83
- Park, M. H., Sangwanangkul, P., & Choi, J. W. (2018). Reduced chilling injury and delayed fruit ripening in tomatoes with modified atmosphere and humidity packaging. *Scientia Horticulturae*, 231, 66-72
- Paull, R. E., & Duarte, O. (2010). Avocado. In: Paull, R.E., Duarte, O. (Eds.), Tropical Fruits (Crop Production Science in Horticulture). CABI Publishing, Wallingford, 153-184.

- Percudani, R., & Peracchi, A. (2009). The B₆ database: A tool for the description and classification of vitamin B₆-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*, 10, 273
- Pesis, E., Ackerman, M., Ben-Arie, R., Feygenberg, O., Feng, X., Apelbaum, A., Goren, R., & Prusky, D. (2002). Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 171-181
- Piironen, V., Syvaöja, E., Varo, P., Salminen, K., & Koivistoinen, P. (1986). Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: Vegetables, fruits, and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 742-746
- Qiao, H., Zhang, H., Wang, Z., & Shen, Y. (2021). Fig fruit ripening is regulated by the interaction between ethylene and abscisic acid. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63, 553-569
- Qiu, Z., Wang, X., Gao, J., Guo, Y., Huang, Z., & Du, Y. (2016). The tomato Hoffman's anthocyaninless gene encodes a bHLH transcription factor involved in anthocyanin biosynthesis that is developmentally regulated and induced by low temperatures. *PLoS ONE*, 11, e0151067
- Qureshi, A. A., Mo, H., Packer, L., & Peterson, D. M. (2000). Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3130-3140
- Raacke, I. C., Mueller, M. J., & Berger, S. (2006). Defects in allene oxide synthase and 12-oxo-phytodienoic acid reductase alter the resistance to *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 154, 740-744
- Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: Backgrounds and uses in plant production. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 845-872
- Rasori, A., Ziliotto, F., Botton, A., Bonghi, C., Ramina, A., Tadiello, A., & Trainotti, L. (2010). Hormonal crosstalk between fruit and seed throughout development and ripening in peach. *Acta Horticulturae*, 884, 53-60
- Razeto, B., Romero, F., & Araya, E. (2004). Influence of some sensory properties on acceptability of avocados (*Persea americana* Mill.). *Agricultural Technology*, 64, 89-94
- Rihan, H.Z., Al-Issawi, M., & Fuller, M. (2017). Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *Journal of Plant Interactions*, 12, 143-157
- Romojaro-Casado, M.C. (2016). Tratamientos poscosecha para el control de los daños por frío en frutos climatéricos y no climatéricos. Facultad de Química, Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología. Tesis doctoral de la Universidad de Murcia.
- Ruan, J., Li, M., Jin, H., Sun, L., Zhu, Y., Xu, M., & Dong, J. (2015). UV-B irradiation alleviates the deterioration of cold-stored mangoes by enhancing endogenous nitric oxide levels. *Food Chemistry*, 169, 417-423

- Sang, Y., Locy, R. D., Goertzen, L. R., Rashotte, A. M., Si, Y., Kang, K., & Sinh N. K. (2011). Expression, in vivo localization and phylogenetic analysis of a pyridoxine 5'-phosphate oxidase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 88-95
- Scarlato, M., Dogliotti, S., Bianchi, F. J. J. A., & Rossing, W. A. H. (2021). Ample room for reducing agrochemical inputs without productivity loss: The case of vegetable production in Uruguay. *Science of the Total Environment*, 152248.
- Segovia, F. J., Corral-Pérez, J. J., & Almajano, M. P. (2016). Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 85, 213-220
- Seo, J., Yi, G., Lee, J. G., Choi, J. H., & Lee, E. J. (2020). Seed browning in pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit during cold storage is inhibited by methyl jasmonate or induced by methyl salicylate. *Postharvest Biology and Technology*, 166, 111210
- Seymour, G.B., & Tucker, G.A. (1993). Avocado. In: Seymour, G.B., Taylor, J.E., Tucker, G.A. (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*. Springer. Science1Business Media, B. V, Dordrecht.
- Seymour, G. B., Østergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., & Martin, C. (2013). Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 219-241
- Singh, S. P., Singh, Z., & Swinny, E. E. (2009). Postharvest nitric oxide fumigation delays fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *Postharvest Biology and Technology*, 53, 101–108
- Sivakumar, D., Tuna Gunes, N., & Romanazzi, G. (2021). A comprehensive review on the impact of edible coatings, essential oils, and their nano formulations on postharvest decay anthracnose of avocados, mangoes, and papayas. *Frontiers in Microbiology*, 2150
- Sivankalyani, V., Feygenberg, O., Maorer, D., Zaaroor, M., Fallik, E., & Alkan, N. (2015) Combined treatments reduce chilling injury and maintain fruit quality in avocado fruit during cold quarantine. *PLoS ONE*, 10, e0140522
- Statistics Division of the Food and Agriculture Organization for the United Nations, 2013. FAOSTAT data. Available from: <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 2117-2127
- Tadiello, A., Longhi, S., Moretto, M., Ferrarini, A., Tononi, P., Farneti, B., Busatto, B., Vrhovsek, U., dal Molin, A., Avanzato, C., Biasioli, F., Cappellin, L., Scholz, M. U., Velasco, R., Trainotti, L., Delledonne, M., & Costa, F. (2016). Interference with ethylene perception at receptor level sheds light on auxin and transcriptional circuits associated with climacteric ripening of apple fruit (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Journal*, 88, 963-975

- Tateishi, A., Shiba, H., Ogihara, J., Isobe, K., Nomura, K., Watanabe, K., & Inoue, H. (2007). Differential expression and ethylene regulation of β -galactosidase genes and isozymes isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 56-65
- Tomato Genome Consortium, X. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485, 635
- Trainotti, L., Tadiello, A., & Casadoro, G. (2007). The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3299-3308
- Tucker, M. L., & Laties, G. G. (1984). Interrelationship of gene expression, polysome prevalence, and respiration during ripening of ethylene and/or cyanide-treated avocado fruit. *Plant Physiology*, 74, 307-315
- Uarrotta, V. G., Hernandez, I., Ponce Guequen, E., Vidal Cruz, J., Fuentealba, C., Defilippi, B. G., Lindh, V., Zulueta, C., Chirinos, R., Campos, D., & Pedreschi, R. (2020). Unravelling factors associated with 'blackspot' disorder in stored Hass avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95, 804-815
- United States Department of Agriculture (USDA) Nutrient Data Laboratory, Food and Nutrition Information Center (FNIC) and Information Systems Division of the National Agricultural Library, 2011. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Available from: <http://ndb.nal.usda.gov/>.
- Velázquez-López, A. A., La Cruz-Medina, D., García, H. S., Vela-Gutiérrez, G., Torres-Palacios, C., & León-García, E. (2020). Lipoxigenase and Its relationship with ethylene during ripening of genetically modified tomato (*Solanum lycopersicum*). *Food Technology and Biotechnology*, 58, 223-229
- Virani, S.S., Alonso, A., Aparicio, H.J., Benjamin, E.J., Bittencourt, M.S., Callaway, C.W., Carson, A.P., Chamberlain, A.M., Cheng, S., Delling, F.N., Elkind, M.S.V., Evenson, K.R., Ferguson, J.F., Gupta, D.K., Khan, S.S., Kissela, B.M., Knutson, K.L., Lee, C.D., Lewis, T.T., Liu, J., Loop, M.S., Lutsey, P.L., Ma, J., Mackey, J., Martin, S.S., Matchar, D.B., Mussolino, M.E., Navaneethan, S.D., Perak, A.M., Roth, G.A., Samad, Z., Satou, G.M., Schroeder, E.B., Shah, S.H., Shay, C.M., Stokes, A., Van Wagner, L.B., Wang, N-Y., & Tsao, C.W. (2021) on behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 143, e254–e743
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. & Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 199–223
- Wang, C. Y. (1994). Chilling injury of tropical horticultural commodities. *HortScience*, 29, 986–988
- Wang, L., Shan, T., Xie, B., Ling, C., Shao, S., Jin, P., & Zheng, Y. (2019a). Glycine betaine reduces chilling injury in peach fruit by enhancing phenolic and sugar metabolisms. *Food Chemistry*, 272, 530–538

- Wang, Y., Luo, Z., Khan, Z. U., Mao, L., & Ying, T. (2015). Effect of nitric oxide on energy metabolism in postharvest banana fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biology and Technology*, 108, 21–27
- Wang, Z., Cao, J., & Jiang, W. (2016). Changes in sugar metabolism caused by exogenous oxalic acid related to chilling tolerance of apricot fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 114, 10–16
- Wang, R., Shu, P., Zhang, C., Zhang, J., Chen, Y., Zhang, Y., & Liu, M. (2021). Integrative analyses of metabolome and genome-wide transcriptome reveal the regulatory network governing flavor formation in kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *New Phytologist*, 233, 373–389
- Wang, X., Zeng, W., Ding, Y., Wang, Y., Niu, L., Yao, J. L., Pan, L., Lu, Z., Cui, G., Li, G., & Wang, Z. (2019b). Peach ethylene response factor PpeERF2 represses the expression of ABA biosynthesis and cell wall degradation genes during fruit ripening. *Plant Science*, 283, 116–126
- Weber, P., Bendich, A., & Machlin, L. J., (1997). Vitamin E and human health: Rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition*, 13, 450–460
- Wibowo, S., Vervoort, L., Tomic, J., Santiago, J. S., Lemmens, L., Panozzo, A., Grauwet, T., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2015). Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage.- *Food Chemistry*, 171, 330–340
- Wolf, A. B., & Lay-Yee, M. (1997). Pretreatments at 38°C of 'Hass' avocado confer thermotolerance to 50°C hot water treatments. *HortScience*, 32, 705–708
- Xu, T., Chen, Y., & Kang, H. (2019). Melatonin is a potential target for improving post-harvest preservation of fruits and vegetables. *Frontiers of Plant Science*, 10
- Yahia, E. M., & Wolf, A. B. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.). In: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits (125–186e). Woodhead Publishing.
- Yang, Y., Jiang, M., Feng, J., Wu, C., Shan, W., Kuang, J., Chen, J., Hu, Z., & Lu, W. (2021). Transcriptome analysis of low-temperature-affected ripening revealed MYB transcription factors-mediated regulatory network in banana fruit. *Food Research International*, 148, 110616
- Yao, W., Xu, T., Farooq, S. U., Jin, P., & Zheng, Y. (2018). Glycine betaine treatment alleviates chilling injury in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) by modulating antioxidant enzymes and membrane fatty acid metabolism. *Postharvest Biology and Technology*, 144, 20–28
- Yu, J., Cang, J., Lu, Q., Fan, B., Xu, Q., Li, W., & Wang, X. (2020). ABA enhanced cold tolerance of wheat 'dn1' via increasing ROS scavenging system. *Plant Signaling & Behavior*, 15, 1780403
- Zarogotas, D., Liolios, N. T., & Anastassopoulos, E. (2016). Supercooling, ice nucleation and crystal growth: A systematic study in plant samples. *Cryobiology*, 72, 239–243
- 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, 1579–1588

- Zhang, W., Cao, J., Fan, X., & Jiang, W. (2020a). Applications of nitric oxide and melatonin in improving postharvest fruit quality and the separate and crosstalk biochemical mechanisms. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 531–541
- Zhang, W., Zhao, H., Jiang, H., Xu, Y., Cao, J., & Jiang, W. (2020b). Multiple 1-MCP treatment more effectively alleviated postharvest nectarine chilling injury than conventional one-time 1-MCP treatment by regulating ROS and energy metabolism. *Food Chemistry*, 127256
- Zhang, W., & Jiang, W. (2019). UV treatment improved the quality of postharvest fruits and vegetables by inducing resistance. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 71–80
- Zhang, W., Jiang, H., Cao, J., & Jiang, W. (2021). Advances in biochemical mechanisms and control technologies to treat chilling injury in postharvest fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 355-365
- Zhang, X., Teixeira da Silva, J. A., Niu, M., Li, M., He, C., Zhao, J., Zeng, S., Duan, J., & Ma, G. (2017). Physiological and transcriptomic analyses reveal a response mechanism to cold stress in *Santalum album* L. leaves. *Scientific Reports*, 7, 42165
- Zhang, Y., Liu, B., Li, X., Ouyang, Z., Huang, L., Hong, Y., Zhang, H., Li, D., & Song, F. (2014). The de novo biosynthesis of vitamin B₆ is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 688-699
- Zhao, H., Jiao, W., Cui, K., Fan, X., Shu, C., Zhang, W., Cao, J., & Jiang, W. (2019). Near- freezing temperature storage enhances chilling tolerance in nectarine fruit through its regulation of soluble sugars and energy metabolism. *Food Chemistry*, 289, 426–435
- Zhao, W., Li, Y., Fan, S., Wen, T., Wang, M., Zhang, L., & Zhao, L. (2021a). The tomato WRKY32 transcription factor affects ripe fruit color by regulating YFT1, a core component of ethylene signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 72, 4269-4282
- Zhao, Y., Song, C., Brummell, D. A., Qi, S., Lin, Q., & Duan, Y. (2021b). Jasmonic acid treatment alleviates chilling injury in peach fruit by promoting sugar and ethylene metabolism. *Food Chemistry*, 338, 128005
- Zhu, L. S., Shan, W., Wu, C. J., Wei, W., Xu, H., Lu, W. J., Chen, J. Y., Su, X. G., & Kuang, J. F. (2021a). Ethylene-induced banana starch degradation mediated by an ethylene signaling component MaEIL2. *Postharvest Biology and Technology*, 181, 111648
- Zhu, J-K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167, 313–324
- Zhu, Y., Wang, K., Wu, C., Hao, Y., Zhang, B., Grierson, D., Chen, K., & Xu, C. (2021b). DNA hypermethylation associated with the development of temperature-dependent postharvest chilling injury in peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 181, 111645

Zuo, X., Cao, S., Zhang, M., Cheng, Z., Cao, T., Jin, P., & Zheng, Y. (2021). High relative humidity (HRH) storage alleviates chilling injury of zucchini fruit by promoting the accumulation of proline and ABA. *Postharvest Biology and Technology*, 171, 111344

