



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires,
Carrera de Lic. En Ciencias Biológicas
Tesis de Licenciatura

**El rol de las betalainas en la respuesta al UV-B en plántulas de
Chenopodium quinoa y su interacción con diferentes componentes del
metabolismo antioxidante.**

Autor: Federico Daniel Cá.

Director: Dr. Humberto Fabio Causin.

Codirectora: Dra. Vanesa Eleonora Tossi.

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Biología del Desarrollo de Plantas,
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales, UBA.

Federico Cá

H. Fabio Causin

Vanesa E. Tossi

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
La quinua como modelo de estudio.....	5
Radiación UV-B.....	6
Respuestas de las plantas al UV-B	7
OBJETIVOS.....	11
HIPÓTESIS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Material vegetal.....	12
Tratamientos.....	12
Cosecha.....	13
Análisis bioquímicos.....	13
RESULTADOS.....	19
1- Efecto de la radiación UV sobre las diferentes variables analizadas.....	19
2- Efecto de los pulsos de luz blanca (LB) sobre la concentración de betalaínas y demás variables analizadas, antes y luego de la exposición a radiación UV.....	27
2-1 Comparaciones Osc vs. Osc + LB.....	27
2-2 Comparaciones Osc+UV vs LB+UV.....	32
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
Anexo.....	51

RESUMEN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una especie perteneciente al orden Caryophyllales, conocida por su alta tolerancia a condiciones ambientales extremas. En general, los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico en *Chenopodium quinoa* se basan en la modificación de la estructura y función de las células, la acumulación de solutos compatibles y la regulación de la expresión génica. Si bien numerosas variedades de quinua son de altitud, donde la radiación UV es más intensa, la información sobre los efectos generados por este tipo de radiación en esta especie es escasa. En presencia de altas dosis de UV-B, se inducen mecanismos fisiológicos tendientes a reparar los daños en el ADN, como así también a mantener la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ERO, o ROS en inglés por reactive oxygen species), cuyo aumento está asociado tanto a este como a otros tipos de estrés ambiental.

Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles característicos del orden Caryophyllales. De acuerdo a sus propiedades físico químicas se agrupan en betaxantinas (pigmentos de tonalidad amarilla) y betacianinas (de tonalidad rojiza a violácea). La síntesis de estos pigmentos aumenta en condiciones de estrés lumínico, y se ha sugerido que podrían actuar como escudo químico en condiciones de alta irradiancia de luz UV.

En este trabajo se evaluó el efecto de tres tratamientos lumínicos diferentes: Oscuridad continua (OSC), oscuridad continua seguido de 24 hs de exposición a luz UV-B (aproximadamente 1 W.m^{-2}) (UV), y finalmente crecimiento en oscuridad interrumpido por cuatro pulsos de luz blanca de dos horas (con intervalos de aproximadamente 8 hs de oscuridad entre pulsos), aplicados desde 48 hs antes de la exposición a la luz UV-B (LB+UV). Con esta combinación de tratamientos se buscó analizar en qué medida la variación del contenido de betalaínas y diversos componentes del metabolismo antioxidante repercuten en variables asociadas al daño oxidativo ocasionado por la radiación UV, en plántulas de 7 días de edad de dos genotipos de *C. quinoa* (Villarrica y CICA) y un genotipo perteneciente a una especie cercanamente emparentada, *Chenopodium berlandieri* (que denominaremos HUAZ, por “huazontle”, término coloquial que recibe en su lugar de origen), la cual presenta niveles constitutivos relativamente elevados de estos pigmentos.

Frente al tratamiento con UV, se produjo un aumento significativo en el contenido de betalaínas (y en particular de betacianinas), de metabolitos con pico de absorbancia en el UV-B (315 nm) y, dependiendo del genotipo, la capacidad antioxidante total. En cuanto a la actividad de enzimas antioxidantes, se observó una reducción significativa

de la actividad guaiacol peroxidasa (POX) y un aumento de la actividad superóxido dismutasa (SOD). Parte de las respuestas observadas se asoció a modificaciones en la expresión de dos genes claves implicados en la percepción de la señal lumínica y la síntesis de betalaínas.

Si bien los tres genotipos evidenciaron daño oxidativo (medido como concentración de metabolitos reactivos al ácido tiobarbitúrico, TBARs) tras la exposición a UV-B, se registró una reducción de dicho daño en las plántulas de HUAZ y Villarrica previamente tratadas con pulsos de LB. En el caso de HUAZ, la inducción de un aumento en el contenido de betalaínas por LB y el mantenimiento de altos niveles de estos pigmentos tras la exposición a UV-B, se asoció a una reducción en la acumulación de otros componentes del metabolismo antioxidante. Si bien esto apoyaría la hipótesis de que la síntesis de betalaínas podría actuar como un mecanismo importante para reducir el daño oxidativo por radiación UV-B, la relación fue menos clara para el genotipo más sensible de *C. quinoa* (CICA). En efecto, el tratamiento con LB indujo incrementos similares en el contenido de betalaínas en los dos genotipos examinados y, tras la exposición a UV-B (v.g. tratamiento *LB+UV*), las plántulas de CICA acumularon niveles significativamente mayores de betacianinas que las de Villarrica. Más aún, en dicho tratamiento no se registraron diferencias significativas entre ambos genotipos para la mayoría de las variables examinadas, sugiriendo que otros metabolitos además de los evaluados tendrían un rol preponderante en la tolerancia al UV-B en esta especie.

En conjunto, nuestros datos demuestran, por un lado, el alto grado de variabilidad inter- e intra-específica existente en cuanto al rol de las betalaínas como factor de protección frente a radiación UV-B, y por otro la necesidad de profundizar el análisis integral de los diferentes componentes metabólicos que podrían contribuir a la tolerancia a este tipo de estrés, en las etapas iniciales de crecimiento de *C. quinoa*.

INTRODUCCIÓN

La quinua como modelo de estudio

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) pertenece a la familia Amaranthaceae, subfamilia Chenopodioideae, orden Caryophyllales. Es un cultivo anual que se puede encontrar principalmente en la región andina de América del Sur, entre el nivel del mar y zonas del Altiplano boliviano, de hasta 4000 metros de altura (Jacobsen et al., 2005). Ésta especie ha sido domesticada hace aproximadamente 5000 años. Los Incas llamaron a la semilla de quinua “El Grano Madre” debido a su papel protagónico en la alimentación y cultura de dicha civilización.

Tradicionalmente, la quinua se clasifica en cinco grupos, según sus adaptaciones específicas a ciertas regiones geográficas. 1) Valle: crecidas a 2000-3500 m.s.n.m. en Colombia, Perú, Ecuador y Bolivia; 2) Altiplano: crecidas a altitudes mayores a 3500 m.s.n.m. en la zona del lago Titicaca en la frontera de Bolivia y Perú, y en zonas del noroeste de Argentina; 3) Salares: crecidas en los salares de Bolivia y Chile; 4) a nivel del mar: crecidas en áreas de baja altitud en Chile y Argentina; y 5) subtropical o yungas: crecidas en baja altitud, en los valles húmedos de Bolivia (D. et al., 2015).

La quinua es considerada como un cultivo de un gran potencial comercial por su alto valor nutricional (Wilson, 1990), particularmente debido al excepcional contenido proteico de su semilla, a la cantidad de lípidos nutricionalmente valiosos, y a su contenido de vitaminas (B1, B9, C y E) (Ruales & Nair, 1992).

Además de su importancia nutricional, este cultivo es muy conocido debido a su alta tolerancia a condiciones ambientales extremas (Bertero et al., 2004). En las últimas décadas, la incidencia de los diversos factores de estrés abiótico se ha acentuado por el incremento de patrones climáticos impredecibles. En este contexto, existen múltiples publicaciones relacionadas a la capacidad de la quinua de resistir estreses abióticos tales como sequía (Geerts et al., 2008), salinidad (Causin et al., 2020; Hinojosa et al., 2018; Koyro & Eisa, 2008) y altas temperaturas (Hinojosa et al., 2018; Yang et al., 2016).

En general, los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico en *Chenopodium quinoa* se basan en la modificación de la estructura y función de las células, la acumulación de solutos compatibles y la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, en condiciones de estrés hídrico, se activan estrategias generales para reducir la pérdida de agua, tales como la reducción de la tasa fotosintética, regulación del déficit hídrico celular, y proporciones de raíz a tallo que desencadenan una alta eficiencia en

el uso del agua. Se ha reportado que ciertas variedades de quinua aumentan el contenido de ácido abscísico (ABA) en el sistema radical y en la parte aérea, lo cual disminuye la turgencia de las células de la guarda estomáticas. Además, se produce un aumento en la síntesis de secuestrantes de especies reactivas de oxígeno (ROS, en inglés), acumulación de metabolitos antioxidantes y acrecentamiento de azúcares solubles y prolina, los cuales ajustan el potencial osmótico (Hinojosa et al., 2018).

En cuanto a la tolerancia al estrés salino, la quinua es considerada una planta halófila. Algunos mecanismos desarrollados para poder crecer en estos ambientes consisten en la acumulación de iones en las vacuolas, la producción de solutos compatibles tales como la prolina y los polioles, la variación en la actividad de enzimas antioxidantes, y el aumento del bombeo de protones en las células del mesófilo (Hinojosa et al., 2018).

Al analizar la tolerancia a altas temperaturas, uno de los mecanismos para lidiar con dicho estrés es la síntesis de proteínas de choque térmico (Heat-shock proteins). Puntualmente se ha reportado que el aumento en los niveles de HSP70 y HSP90 son claves para inducir la termotolerancia en quinua (Hinojosa et al., 2018).

Si bien numerosas variedades de quinua son de altitud, donde la radiación UV-B es más intensa, la información sobre los efectos generados por este tipo de radiación en esta especie y los posibles mecanismos de tolerancia implicados es escasa.

RADIACIÓN UVB.

Aproximadamente el 7% de toda la radiación solar que llega a la superficie de la Tierra es luz ultravioleta (UV) (Frohn Meyer & Staiger, 2003). La radiación ultravioleta cubre el rango de longitudes de onda de entre 100-400 nm, pudiéndose dividir en tres tipos en virtud del rango de longitud de onda que comprenden: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100-280 nm), siendo ésta última la que mayor energía posee (Björn, 2015).

Cuando la radiación ultravioleta llega a la atmósfera, la fracción correspondiente a la radiación UV-C es absorbida en su totalidad por la capa de ozono. En cuanto a la radiación UV-A, ésta puede atravesar la capa de ozono libremente, pero es la que menor daño provoca y actúa como una señal fotomorfogénica (Björn, 1996). Por último, aproximadamente un 95% de la radiación UV-B queda retenida en la capa de ozono y alcanza a la superficie terrestre con una intensidad promedio de 1 W.m^{-2} al nivel del mar (Čejka et al., 2011).

Debido al accionar humano, el equilibrio natural de los niveles de ozono fue alterado, particularmente por la emisión de sustancias que agotan la capa de ozono (ODS) (durante los años 1960 hasta finales de la década del 90'). Esto ha generado una disminución en los niveles de ozono y un aumento de la radiación UV-B que llega a la superficie terrestre (Steinbrecht et al., 2018).

Las plantas responden de diferentes maneras frente a la radiación UV-B. Estas respuestas pueden variar según la edad de la planta (Yang et al., 2016), la especie (Lindroth et al., 2000), o el ritmo circadiano (Horak & Farré, 2015). La radiación UV-B, dependiendo del dosaje puede actuar como una señal fotomorfogénica o causar daño, ya que, debido a su alta energía, puede romper enlaces químicos y producir moléculas altamente reactivas (Hideg et al., 2013).

En plantas, la luz UV-B es captada por el fotorreceptor UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) (Jenkins, 2014). Bajo luz UV-B, se genera un cambio conformacional en el fotorreceptor, el cual pasa de su forma dimérica a monómero. De esta manera es capaz de interactuar con la proteína E3-ubiquitin ligasa CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1), previniendo así la ubiquitinación del factor de transcripción ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5) y su subsecuente degradación proteasomal. Este factor de transcripción constituye un punto de convergencia de diversas vías de transducción de señales lumínicas y regula la expresión de varios genes involucrados en la respuesta de la planta frente a la radiación UV-B en particular (Tossi et al., 2021). Por ejemplo, HY5 induce la expresión del gen de la chalcona sintasa (CHS), enzima clave en la biosíntesis de flavonoides. De hecho, la acumulación de flavonoides y otros fenilpropanoides a modo de escudo químico es una de las respuestas más ampliamente documentadas tras la exposición al UV-B (Hideg et al., 2013).

Algunos de los efectos más comunes generados por exceso de radiación UV-B en plantas son disminución de biomasa (Vandenbussche et al., 2018), alteraciones en cutícula y epidermis (Tevini & Steinmüller, 1987), crecimiento anormal (Teramura & Sullivan, 1994), y daño a los fotosistemas I y II (Liu et al., 2013; Pang & Hays, 1991). Estos efectos pueden afectar tanto el crecimiento como el rendimiento de diferentes cultivos. La radiación UV-B puede incluso alterar la calidad de los alimentos (Bais et al., 2018), al afectar los niveles y composición de vitaminas, ácidos grasos, polifenoles y pigmentos, modificando así las características nutricionales y organolépticas (Choudhary & Agrawal, 2016; Nguyen et al., 2017; Reddy et al., 2016; Wang et al., 2017; G. Wu et al., 2017).

Respuestas de las plantas al UV-B.

En líneas generales, existen dos grandes categorías de respuestas frente al UV-B: A bajas dosis de radiación, se induce la expresión de genes involucrados en respuestas fotomorfogénicas tendientes a aumentar la reflectancia o disminuir la transmitancia de dicha radiación en los tejidos. Estas “respuestas de aclimatación” incluyen una reducción del tamaño y aumento del grosor de hojas, y la síntesis de compuestos fenólicos. En presencia de altas dosis de UV-B, se inducen mecanismos fisiológicos tendientes a reparar los daños en el ADN, como así también a mantener la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ERO, o ROS en inglés por reactive oxygen species), cuyo aumento está asociado tanto a este como a otros tipos de estrés ambiental (Demidchik, 2015; Gallego & Benavides, 2019; Yannarelli et al., 2006).

Las especies reactivas de oxígeno son formas parcialmente reducidas de oxígeno atmosférico (O_2). El término “ROS” describe una familia de especies químicas que contienen oxígeno y son producidas en sistemas biológicos, que son caracterizados por su reactividad química, baja vida media y solubilidad lipídica (Halliwell & Gutteridge, 2015). Estas especies surgen de la excitación del O_2 al formar oxígeno singlete (O_2^1) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar un radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o un radical hidroxilo (OH^\cdot), respectivamente. En contraste con el oxígeno atmosférico, las ROS son capaces de oxidar sin ninguna restricción a varios componentes celulares, lo que puede llevar a la destrucción oxidativa de la célula (Asada, 1999, 2006; Dat et al., 2000; Hammond-Kosack & Jones, 1996).

La generación de ROS en organismos vivos es una consecuencia inevitable del metabolismo aeróbico (Fischer et al., 2016). En plantas, las ROS están siendo continuamente generadas como productos secundarios de varias rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimentos celulares (Foyer & Mullineaux, 2019), y están involucradas en la regulación de diversos procesos tales como diferenciación celular (Schmidt & Schippers, 2015), floración (Schippers et al., 2016), inmunidad vegetal (Qi et al., 2017; Segal & Wilson, 2018) y respuestas al ambiente (Raja et al., 2017).

Bajo condiciones fisiológicas estables, las ROS son detectadas por componentes de defensa antioxidante que están frecuentemente confinados a ciertos compartimentos en particular (Apel & Hirt, 2004). El equilibrio entre producción y detección de ROS puede ser perturbado por un número de factores ambientales adversos y, como resultado de estas perturbaciones, los niveles intracelulares de ROS pueden aumentar rápidamente (Elstner, 1994; L. Li & van Staden, 1998; Prasad et al., 1994; Tsugane et al., 1999). Las plantas generan especies reactivas de oxígeno al activar

diferentes tipos de oxidasas y peroxidasas que las producen en respuesta a dichas variaciones ambientales (Schopfer et al., 2001).

Para poder mantener la homeostasis celular redox, existen una variedad de mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos, algunos de los cuales son estimulados específicamente en respuesta a niveles alterados de ROS (Demidchik, 2015). Entre ellos, la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD EC 1.15.1.1), la ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11), glutatión S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18), la guaiacol peroxidasa (GPOX, EC 1.11.1.7) y la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) juegan un rol importante en la prevención del daño oxidativo (Causin et al., 2015; Matsumura et al., 2002; Pena et al., 2011; Vandenabeele et al., 2004; Willekens et al., 1997).

Además de la maquinaria enzimática previamente mencionada, existen metabolitos antioxidantes tales como el ácido ascórbico, tocoferoles, glutatión y diferentes tipos de pigmentos (Gallego & Benavides, 2019). Teniendo en cuenta sus propiedades químicas y localización subcelular, estos últimos pueden agruparse en dos amplias categorías: Pigmentos lipofílicos plasmídicos, los cuales incluyen a las clorofilas y carotenoides; y pigmentos solubles en agua, tales como flavonoides (incluyendo antocianinas) y betalaínas (Tossi et al., 2021).

En el caso de los flavonoides, incluyendo las antocianinas, funcionan como un importante componente del sistema antioxidante de las plantas (Fini et al., 2011). Dependiendo del tipo de flavonoide, sus funciones varían, contribuyendo directa o indirectamente al mantenimiento de la homeostasis redox celular. Entre tales funciones se puede mencionar la de secuestrantes de radicales libres, quelantes de iones metálicos en reacciones redox, activadores de enzimas antioxidantes, reguladores positivos de la síntesis de antioxidantes de bajo peso molecular tales como glutatión, regenerador de la vitamina E a partir de su forma radical, inhibición de oxidasas y otros modos de acción igualmente beneficiosos para mantener un estado redox equilibrado (Procházková et al., 2011a). Por sus propiedades espectrales, pueden actuar asimismo como pantallas fotoprotectoras frente al exceso de radiación lumínica, incluyendo el UV-B (Mathesius, 2018).

Como se mencionó previamente, otro tipo de pigmentos claves en el metabolismo antioxidante son las betalaínas (Cai et al., 2003). El término betalaína fue introducido para describir estos pigmentos como derivados del ácido betalámico (Wohlpart & Mabry, 1968). De acuerdo a sus características físico-químicas, fueron clasificados dentro de dos sub-grupos principales: los pigmentos amarillos llamados

betaxantinas y los rojo-violáceos llamados betacianinas. Si bien la distribución en los tejidos y la mayoría de las funciones fisiológicas de las betalaínas son bastante similares a las de las antocianinas, las betalaínas son estructural y biosintéticamente diferentes. Se trata de compuestos nitrogenados sintetizados a partir del aminoácido L-tirosina, el cual deriva de la ruta del ácido shikímico (Tossi et al., 2021). Las betalaínas y antocianinas nunca se han encontrado en la misma planta, lo cual sugiere que ambos tipos de pigmentos son mutuamente excluyentes. A pesar de que se han propuesto varios mecanismos para explicar este fenómeno (G. Li et al., 2019; Timoneda et al., 2019), a un nivel bioquímico está bien establecido que muchos de los genes relevantes para la producción de antocianinas no están presentes en plantas que producen betacianinas. Por otro lado, una de las enzimas claves en la vía biosintética de las betalaína (la 4,5-DOPA extradiol-dioxigenasa, DODA), está ausente en plantas productoras de antocianinas (Brockington et al., 2015).

Si bien existen numerosas publicaciones relacionadas con la importancia de las betalaínas frente a diferentes tipos de estrés, en la actualidad hay muy poca información sobre su rol en la protección contra la radiación UV-B. Existen reportes de que su síntesis aumenta en condiciones de estrés lumínico, sugiriendo que, al igual que los flavonoides, podrían actuar como escudo químico (Tossi et al., 2021). En particular, hay evidencias de que la luz UV-B, a través de una vía de señalización que involucra a UVR8, podría contribuir a regular su síntesis (Tossi et al., 2021). Finalmente, cabe señalar que la mayor parte de la información disponible se centra en la acción de estos pigmentos en plantas adultas, habiéndose indagado muy poco sobre su rol en los estadios jóvenes post-germinativos. Si consideramos que la etapa de establecimiento es fundamental en el ciclo de vida de las plantas, el estudio de los mecanismos que contribuyen a la tolerancia de plántulas jóvenes a diferentes estresores ambientales es importante para evaluar las posibilidades de éxito en ambientes en los que aumenta el riesgo de exposición a determinados tipos de estrés.

Por todo lo mencionado, resulta de interés conocer los mecanismos de tolerancia a la radiación UV-B en plántulas jóvenes de *C. quinua* y, en particular, determinar qué papel juega el metabolismo de las betalaínas, como así también su interacción con la producción y/o actividad de otro tipo de pigmentos fotoprotectores (flavonoides) y diferentes componentes del metabolismo antioxidante.

OBJETIVOS

1- Estudiar el efecto de diferentes dosis de UV-B en el crecimiento de plántulas y la producción de pigmentos fotoprotectores, en genotipos de quinua con diferente grado de tolerancia a este tipo de radiación.

2- Analizar comparativamente las variaciones en los niveles de betalaínas, flavonoides y otros componentes claves del metabolismo antioxidante en los diferentes genotipos, a fin de evaluar el rol en particular de las betalaínas como mecanismo de tolerancia al UV-B.

3- Caracterizar los cambios en el perfil de expresión de homólogos al receptor UVR8 y de DODA (gen clave en la biosíntesis de estos pigmentos) en respuesta a los diferentes tratamientos lumínicos.

HIPÓTESIS

1- La síntesis de pigmentos a modo de escudo químico juega un rol clave en los mecanismos de tolerancia al estrés por UV-B, contribuyendo a disminuir el daño oxidativo.

2- Se espera hallar una relación inversa entre la asignación de recursos hacia la síntesis de betalaínas y el nivel de estimulación de la actividad y/o el incremento del contenido de otros componentes del metabolismo antioxidante.

3- La radiación UV-B, percibida por el receptor UVR8, estimula su expresión como así también la producción de betalaínas a través de la activación de genes involucrados en su biosíntesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

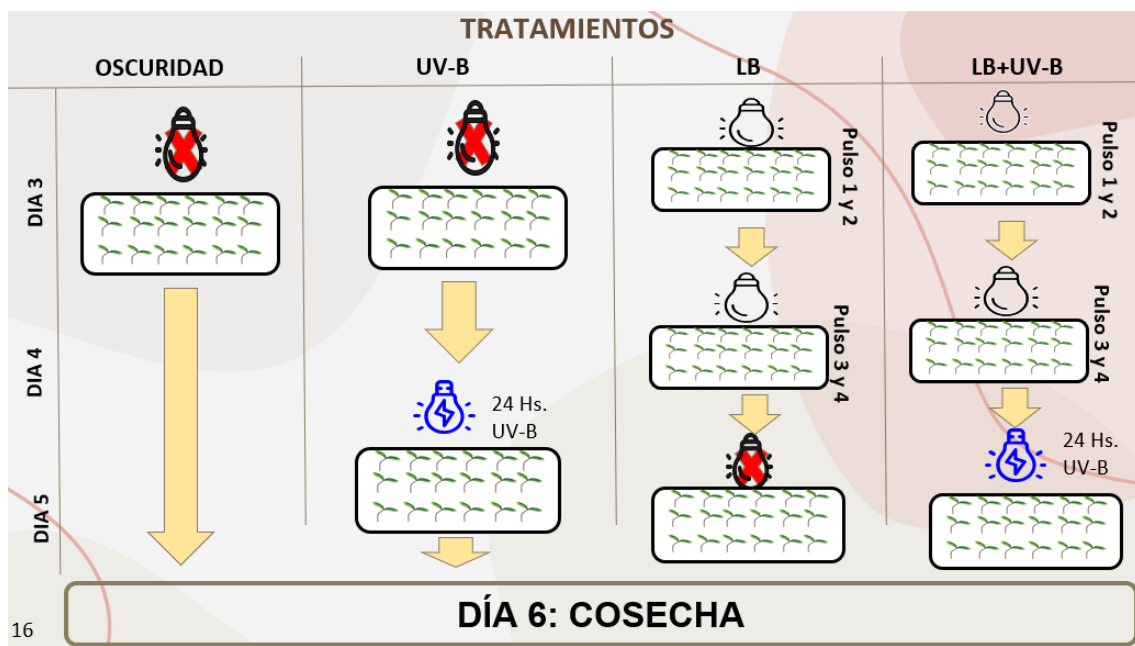
Se eligieron tres genotipos de plantas del género *Chenopodium* con diferente grado de producción de betalaínas. Dentro de la especie *Chenopodium quinoa* se trabajó con dos variedades: CICA (genotipo originario de la región de Puno, Perú, perteneciente al Centro de Investigación de Cultivos Andinos), y Villarrica (genotipo procedente de la región homónima de Araucanía (centro de Chile). El tercer genotipo pertenece a la especie *Chenopodium berlandieri* (comúnmente llamada huazontle), es taxonómicamente cercano a *C. quinoa* y fue elegido por presentar intrínsecamente una producción elevada de betalaínas. Las semillas de CICA fueron cedidas por la Estación Agropecuaria Experimental San Juan (E.E.A. San Juan) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Las semillas del genotipo Villarrica pertenecen al banco de germoplasma de Vicuña del Instituto de Investigación Agrícola (INIA-Intihuasi) de La Serena, Chile. Las semillas del genotipo Huazontle (Huaz de ahora en adelante), de origen mexicano, fueron gentilmente cedidas por el Dr. Hernan Burrieza (FCEN, UBA)

Para la generación de plántulas, las semillas fueron esterilizadas superficialmente durante 12 minutos con una solución de hipoclorito de sodio 2% (m/v). Tras enjuagarlas cuidadosamente con agua bidestilada, y luego de 90 minutos de remojo, se sembraron en cajas plásticas de 13 cm x 21 cm, conteniendo una capa de 3,4 g de algodón seguida por otra de papel filtro, y previamente hidratadas con 70 ml de agua bidestilada. La germinación se realizó en oscuridad, en una incubadora SANYO MIR-153 a $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Para el caso de HUAZ y Villarrica, pasadas 48 hs de su siembra se agregaron 140 g de arena previamente lavada y esterilizada con HCl 0,1N. En el caso de CICA, este paso se realizó 24 hs después de su siembra, ya que presenta una mayor velocidad de germinación que los otros genotipos. En todos los casos se verificó que las radículas de las semillas germinadas fueron de aproximadamente 1,5 cm de longitud. El agregado de arena se hizo para minimizar la exposición de las raíces a los tratamientos lumínicos, los cuales se aplicaron al cabo de 4 días desde el agregado de la arena.

Tratamientos

- Oscuridad (control): Para este tratamiento un grupo de cajas se cubrieron con cartulina negra y se trasladaron al cuarto de cultivo en donde se aplica el tratamiento con UV-B a fin de minimizar las variaciones de temperatura entre tratamientos.

- Luz UV-B: Para este tratamiento las tapas plásticas de las cajas se reemplazaron por papel film perforado con el fin de maximizar la incidencia de luz y evitar la condensación del agua generada por evapotranspiración durante el tratamiento lumínico. Las cajas se expusieron a luz UV-B por 24 hs utilizando una lámpara Phillips TL 100W/01 313 nm, narrowband, aislada lumínicamente dentro del cuarto de cultivo.
- Inducción con luz blanca: Para inducir la síntesis de betalainas en las plántulas previo al tratamiento con UV-B, las cajas fueron irradiadas 24 hs después del agregado de arena con 4 pulsos de luz blanca de 2 horas cada uno configurados con un temporizador. Cada pulso se intercaló con 8 horas de oscuridad con el objetivo de minimizar las diferencias fenotípicas de las plántulas con el tratamiento control (oscuridad). Finalizada la inducción, parte de las cajas se mantuvieron en oscuridad (control LB) y parte se expusieron a 24 hs de luz UV-B según lo descrito previamente (tratamiento LB+UV).



Esquema 1. Diseño experimental de los tratamientos impartidos a cada genotipo.

Cosecha

Para cada tratamiento, se realizó la cosecha de la parte aérea de las plantas obteniendo 4 réplicas de 0,1 g de peso fresco para cada variable a analizar en los diferentes genotipos. Las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

Los ensayos se repitieron al menos dos veces a fin de corroborar la consistencia de los resultados observados.

Análisis bioquímicos

Betalainas.

La concentración de betalaínas (v.g. betacianinas y betaxantinas) en las plántulas se determinó colorimétricamente en extractos con agua acidificada, siguiendo el procedimiento descrito en (Rudrappa et al., 2004). Brevemente, 0,1 g de biomasa se extrajeron en frío mediante pulverización con mortero en 1,35 ml de HCl 0,1%. Luego se centrifugó a 4°C durante 20 min. a 18.000 x g. Se rescató el sobrenadante y se midió en espectrofotómetro a 480 y 540 nm. Se leyó además la absorbancia a 600 nm en cada muestra, a fin de descontar de los valores anteriores la absorbancia debida a la presencia ocasional de impurezas disueltas en los extractos. Los datos se expresaron como mg pigmento*g Pf⁻¹.

Actividad enzimática

Para la determinación de la actividad APX, GST, POX, CAT y SOD, se extrajeron en mortero 100 mg de semillas, con 650 µL de buffer de extracción (Tris 50 mM HCl pH 7,6 + ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) 1,0 mM + ácido ascórbico 1,0 mM + MgSO₄ 2,0 mM + fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1,0 mM + Triton X-100 0.4 %), en presencia de 2,0 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Todo el procedimiento se hizo sobre hielo. Los extractos se centrifugaron a 17500 x g en una centrífuga refrigerada (dos veces durante 25 y 15 min., respectivamente), y los sobrenadantes mantenidos en hielo se usaron inmediatamente para la realización de los ensayos enzimáticos. En algunos casos los extractos se diluyeron (1:3) con buffer de extracción antes de los análisis.

Las actividades APX y GPOX se determinaron como la disminución de la densidad óptica (A) de ácido ascórbico a 290 nm o el aumento de la densidad óptica de tetraguaiacol a 410 nm, respectivamente, según los procedimientos descritos en Prochazkova et al. (2001). Las mezclas de reacción fueron las siguientes: i) para APX: 80 µL de extracto + 60 µL de ácido ascórbico 5 mM + 20 µL H₂O₂ 0,1 M + 840 µL buffer de reacción; ii) para GPOX: 60 µL de extracto enzimático + 100 µL de solución de

guaiacol + 20 μL H_2O_2 0,1 M + buffer de reacción, en 1 ml de volumen total en ambos casos.

La actividad de la enzima CAT se determinó siguiendo la metodología descrita en Causin et al. (2020), monitoreando el consumo de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , coeficiente de extinción molar $38 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) durante 30 segundos a $A_{240} \text{ nm}$, en una mezcla de reacción conteniendo 30 μL de extracto + 20 μL H_2O_2 0,7 M + 950 μL de tampón de reacción (potasio fosfato 50 mM, pH 7,0).

La actividad GST fue determinada como el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la conjugación del grupo tiol del GSH (glutatiión reducido) a 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB), como se describe en (Habig & Jakoby, 1981). La mezcla de reacción contenía 40 μL de extracto + 20 μL de solución CDBN (20,2 mg/2ml acetonitrilo) + 50 μL de solución GSH (11,6 mg/0,75ml H_2O destilada) + 890 μL de buffer de reacción.

En todos los casos, los buffers de reacción se mantuvieron en un baño de agua a 28 °C durante las mediciones. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 (Shimadzu, Japón). Cabe aclarar que todas las curvas de actividad se evaluaron dentro de un rango temporal tal que su comportamiento fuera lineal.

La actividad SOD se midió en microplacas transparentes de 96 pocillos (Greiner Bio-One. Alemania), siguiendo el procedimiento de Giannopolitis y Ries (Giannopolitis & Ries, 1977) con algunas modificaciones. Alícuotas de extracto enzimático (8 a 16 μL) fueron agregadas al medio de incubación, que contenía 270 μL de una mezcla de azul de nitrotetrazolio (NBT, 6,7 mg/ml en buffer de reacción) y solución generadora de anión superóxido (metionina 14,3 mM + riboflavina 2,5 μM , preparada en agua destilada) más cantidades adecuadas de buffer de reacción (fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 + Na_2 EDTA 0,1 mM) hasta completar un volumen final de 0,3 mL. Para los cálculos se incluyeron blancos que contenían las mismas proporciones de buffer de extracción en lugar de los extractos enzimáticos. Las placas se iluminaron durante 4, 8, 12 y 16 minutos en la misma cámara utilizada para los ensayos de germinación. La cantidad de producto derivado de la reacción del NBT con el anión superóxido generado se determinó mediante lecturas a 570 nm en un lector de microplacas RT-2100C (Rayto, Alemania). Se definió una unidad de SOD como el volumen de extracto capaz de inhibir en un 50 % la velocidad de formación del producto de reacción en las condiciones del ensayo.

Proteínas

La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó según el método de Bradford(1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante en extractos acuosos se estimó colorimétricamente mediante la formación de un complejo de fosfomolibdeno como se describe en Prieto et al., (1999). La mezcla de reacción contenía 30 μ l de muestra + 70 μ l H₂O + 1 ml de reactivo (ácido sulfúrico 0,6 M + Na₂PO₄ 28 mM + (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4 mM). Se usó ácido ascórbico como estándar. Los datos se expresaron como μ mol ascorbato * g Pf⁻¹.

Peroxidación de Lípidos

El monitoreo de los niveles de compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se determinó como equivalentes de malondialdehído (MDA) según (Vavilin et al., 1998), con algunas modificaciones. Brevemente, se homogeneizaron 0,1 g de cada muestra con 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % y se centrifugaron 20 min a 17500 x g. Se tomaron 0,6 ml de sobrenadante a los que se agregaron 0,6 ml de una mezcla de TCA 20 % + ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) + 0,06 ml de butilhidroxitolueno (BHT 2% p/v en etanol absoluto). Después de calentar durante 30 min a 95° C, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron 5 min a 17500 x g para obtener un sobrenadante transparente. La cantidad de equivalentes de MDA por ml de extracto fue determinada después de leer las muestras a 440, 532 y 600 nm utilizando las ecuaciones de (Hodges et al., 1999). Se prepararon blancos sin TBA con el fin de verificar que la presencia de pigmentos no interfiera significativamente con las estimaciones de TBARS.

Flavonoides.

El contenido de flavonoides fue determinado según Woisky & Salatino (1998), con algunas modificaciones. Brevemente, 0,1 g de muestra se pulverizaron con N líquido y se extrajeron con 2 ml de EtOH 80%. Del extracto etanólico obtenido, parte se utilizó para determinar la concentración de los productos de reacción (flavonoides) a 510 nm y parte se utilizó para estimar el contenido de compuestos con absorbancia a 315 nm, v.g. en la zona del UV-B. Siguiendo el protocolo de Woisky et al., luego de 60 minutos de iniciada la extracción, las muestras se centrifugaron 10 min. a 10.000 x g. Se tomaron 400 μ l de sobrenadante, se agregó NaNO₂ 5% (30 μ L) y, al cabo de 5 minutos, AlCl₃ 10% (30 μ L). Luego de 30 minutos se agregaron 200 μ l de NaOH 1 M y se añadió agua bidestilada hasta completar un volumen final de 1 ml. Se midió la

absorbancia a 510 nm, expresándose los resultados como unidades relativas de absorbancia.

Análisis de carbonilación de proteínas mediante Dot blot.

La cuantificación de proteínas oxidadas fue realizada mediante dot blot luego de su derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) (Wehr & Levine, 2012). Brevemente: Cantidades iguales de proteína total (0,45 ug) para cada muestra fueron sembradas en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante filtración al vacío usando un colector hybri.dot (Life Technologies, Inc.). La membrana fue lavada con ácido acético para remover el exceso de 2,4-DNPH. Luego la membrana fue bloqueada con leche en polvo desgrasada al 5% en tampón fosfato salino (PBS) (1 h), se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó toda la noche con anticuerpo primario anti-DNP 1:10000 (Sigma, St Louis) en PBS, a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS+Tween 0,1 % por 15 min en agitación y se procedió a inmunomarcarse con anticuerpo secundario conjugado con HRP, diluido 1:1000. Luego se repitió el lavado con PBS + Tween 0,1% y se realizó el revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Super Signal West Pico (Thermo scientific) según instrucciones del fabricante.

La membrana fue fotografiada y la cuantificación de proteínas carboniladas se realizó con el software ImageJ, utilizándose la intensidad de píxeles para cada dot como unidad de medida.

RT-PCR

El análisis de expresión génica fue realizado por RT-qPCR (retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para evaluar la expresión de los genes UVR8 y DODA, utilizándose el factor de elongación 1- α (EF-1) como gen de referencia. La extracción del mRNA total se hizo en material previamente molido en N líquido usando TRIzol® Invitrogen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Tras verificar la pureza y concentración del mRNA extraído, se procedió a la retrotranscripción a cDNA usando Random Primers y M-MLV Retrotranscriptasa (Invitrogen).

Con pares de primers específicos para los genes correspondientes (*Tabla 1*), se realizó la amplificación del cDNA en tiempo real utilizando SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) y el equipo Real Time PCR System StepOne Plus con su correspondiente software (StepOne Software v2.3) para la detección del producto de PCR y el correspondiente análisis de expresión. Todas las reacciones se realizaron en duplicado con sus apropiados controles sin templado

(agua molecular). Se utilizó una mezcla de reacción para cada muestra de 5 µl de SYBR Green Master Mix, 1 µl de cada primer a 100 nM (Fw y Rv), 3 µl de cDNA (dilución 1/10) para un volumen final de 10 µl y las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 1,5 min., seguido de 10 ciclos de 30 seg. a 95°C y 30 seg. a 65°C y seguido por una elongación final de 10 seg. a 72°C y suspensión a 16°C.

Los primers utilizados en este trabajo de tesis amplifican más de un exón y/o su sitio blanco involucra a dos exones consecutivos. De esta manera se evita la amplificación de ADN genómico, debido a una posible contaminación de la muestra de ARN con este otro ácido nucleico. El nivel de expresión de los genes target UVR8 y DODA fue cuantificado relativizando su expresión a la del gen de referencia EF-1, y los resultados fueron expresados utilizando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct \text{ gen target} - Ct \text{ gen de referencia}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Las secuencias de primers utilizadas para las reacciones de qPCR en las muestras de *C. quinoa* fueron diseñadas mediante el uso del software online Primer-BLAST. Fw: Forward, Rv: Reverse son las siguientes:

Tabla 1: *Primers utilizados para la expresión de los genes indicados, mediante PCR cuantitativa.*

	UVR8	DODA	EF-1
Fw	AGTTGGAAGCTCTAAGTGGTCAAAT	GGAAACTGATGAACCTGCTGT	CAAGCGTGGTTTCGTTGCTT
Rv	GTCACCCACACCCACCTGTC	CCATGATCCAGCCCACGTT	TGATGACCTGGGCAGTGAAG

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism v8.00 para Windows, GraphPad Software. Los valores en los gráficos corresponden a la media \pm desviación estándar (DS) Dependiendo del diseño experimental, se realizaron ANOVA de dos factores utilizando genotipo y tratamiento o tiempo de muestreo (según correspondiera) como variables independientes (factores), a fin de facilitar la interpretación de los resultados. Cuando fue necesario, se utilizó la transformación

logarítmica o arcoseno de la raíz cuadrada de los datos para cumplir con los supuestos del ANOVA. Para la identificación de grupos homogéneos se hicieron comparaciones a posteriori mediante el test HSD de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$.

RESULTADOS

Para facilitar la comprensión y la descripción de las variables analizadas, se optó por segmentar la información en dos secciones. En la primera, los análisis se realizaron comparando los tratamientos de oscuridad y luz UV, con el fin de evaluar cómo responden las plántulas frente al estrés inducido exclusivamente por este tipo de radiación, poniendo especial énfasis en las respuestas de los diferentes genotipos a nivel de las defensas antioxidantes y el daño oxidativo generado.

Por otro lado, en la segunda sección, se analizaron las mismas variables, pero comparando el efecto del tratamiento con luz UV en plántulas con y sin inducción previa de la síntesis de betalaínas mediante pulsos de luz blanca. En este caso se procuró evaluar la importancia relativa de la presencia de estos pigmentos en la protección frente al estrés por UV en los diferentes genotipos, y corroborar si existe una relación inversa entre la asignación de recursos hacia la síntesis de betalaínas y el nivel de activación o incremento del contenido de otros componentes del metabolismo antioxidante.

1- Efecto de la radiación UV sobre las diferentes variables analizadas

A continuación, se muestra la comparación de los datos obtenidos para los tratamientos de oscuridad y UV en los diferentes genotipos evaluados.

Peroxidación lipídica.

Para determinar si la exposición con radiación UV induce síntomas de daño oxidativo, se compararon los cambios en la concentración de TBARS para cada uno de los tres genotipos analizados. Dentro de estos, la generación de MDA, un producto secundario de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, es considerado el principal indicador de peroxidación lipídica en general.

En líneas generales, se puede observar que la exposición a radiación UV por 24 hs genera un aumento significativo en el contenido de MDA en las plántulas de los tres genotipos. El genotipo Villarrica presentó, en condiciones de oscuridad, un menor contenido de MDA que CICA y HUAZ, relación que se mantiene al analizar las plántulas expuestas a la situación de estrés. No se encontraron diferencias significativas entre CICA y HUAZ dentro de cada uno de los tratamientos, sugiriendo que responden de manera similar a la generación de MDA tanto en condiciones de oscuridad como de estrés causado por la radiación UV (Fig. 1).

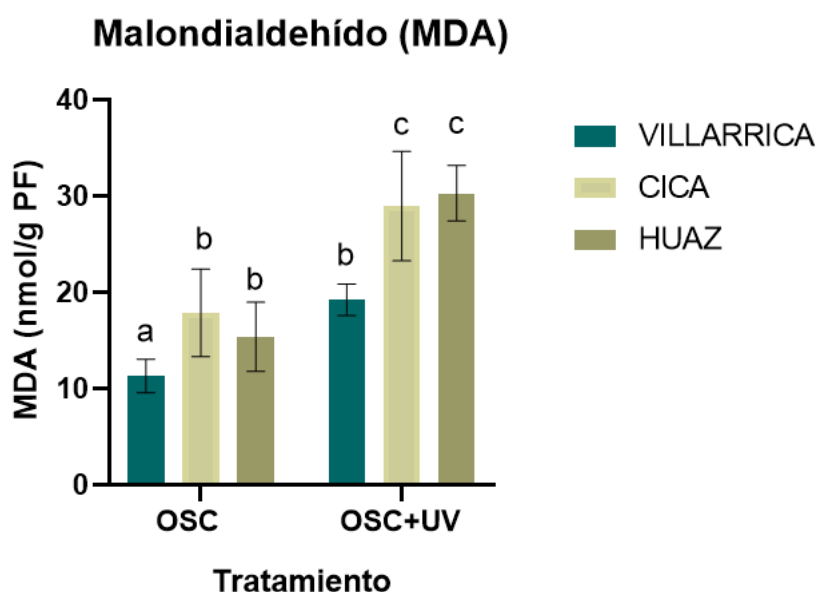


Figura 1. Contenido de TBARS (en equivalentes de MDA) por gramo de peso fresco, en plántulas de los tres genotipos analizados, crecidas en oscuridad continua (OSC) o tras 24

hs de exposición a radiación UV (OSC+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Los tratamientos con letras distintas difieren estadísticamente ($p \leq 0,05$.)

Carbonilación proteica.

Como se mencionó oportunamente, una medida para evidenciar la modificación oxidativa de proteínas es analizar el grado de carbonilación.

En la *figura 2* se detalla cuantitativamente el análisis del ensayo dot-blot para los tratamientos de oscuridad y luz UV. No se hallaron diferencias significativas ni entre tratamientos lumínicos ni entre genotipos, probablemente debido a que el nivel de daño generado no fue tan marcado como para que la sensibilidad del método lograra evidenciar los posibles efectos del tratamiento, sumado a la alta variabilidad intrínseca que presentaron las muestras.

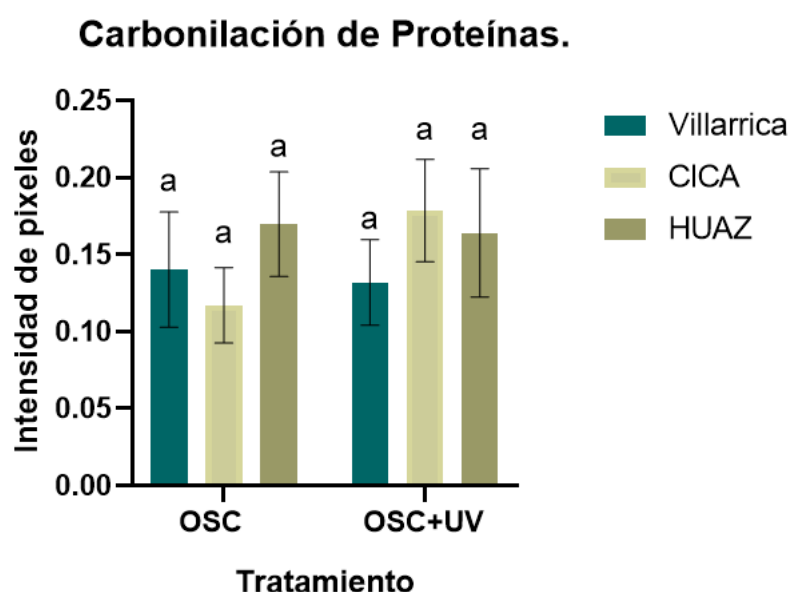


Fig.2: Carbonilación de proteínas medida como intensidad de píxeles en función del tratamiento aplicado, en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua (control) o expuestas durante 24 hs a radiación UV (OSC+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS, y el nivel de significancia estadística fue analizado con $p \leq 0,05$.

Contenido de betalainas.

Como se mencionó en la introducción, las betalainas están conformadas tanto por las betaxantinas como por las betacianinas. En oscuridad, los resultados indican que, de los tres genotipos analizados, HUAZ es el que mayor contenido constitutivo de estos pigmentos posee, lo que avala nuestra decisión de tomar a esta especie

emparentada con *C. quinoa* para poner a prueba nuestra hipótesis. Por otro lado, no se hallaron diferencias significativas en el contenido inicial de estos pigmentos entre los dos genotipos de *C. quinoa* evaluados. Al exponer a las plantas a UV, el contenido de betalaínas aumentó significativamente en todos los genotipos. Nuevamente, las plántulas de HUAZ fueron las que presentaron el mayor contenido, seguidas por CICA y finalmente Villarrica (*Fig. 3A*).

Haciendo un análisis más exhaustivo sobre qué tipo de betalaína se ve inducida frente a la exposición con luz UV se puede determinar que, en el caso de las betaxantinas, no hay un aumento significativo para HUAZ o Villarrica, mientras que sí lo hay para CICA (*Fig. 3B*). En cuanto al contenido de betacianinas, si bien aumentan en los tres genotipos, lo hacen de manera estadísticamente significativa en las plántulas de CICA y HUAZ, siendo este grupo de pigmentos los que estarían siendo inducidos en mayor proporción (*Fig. 3C*).

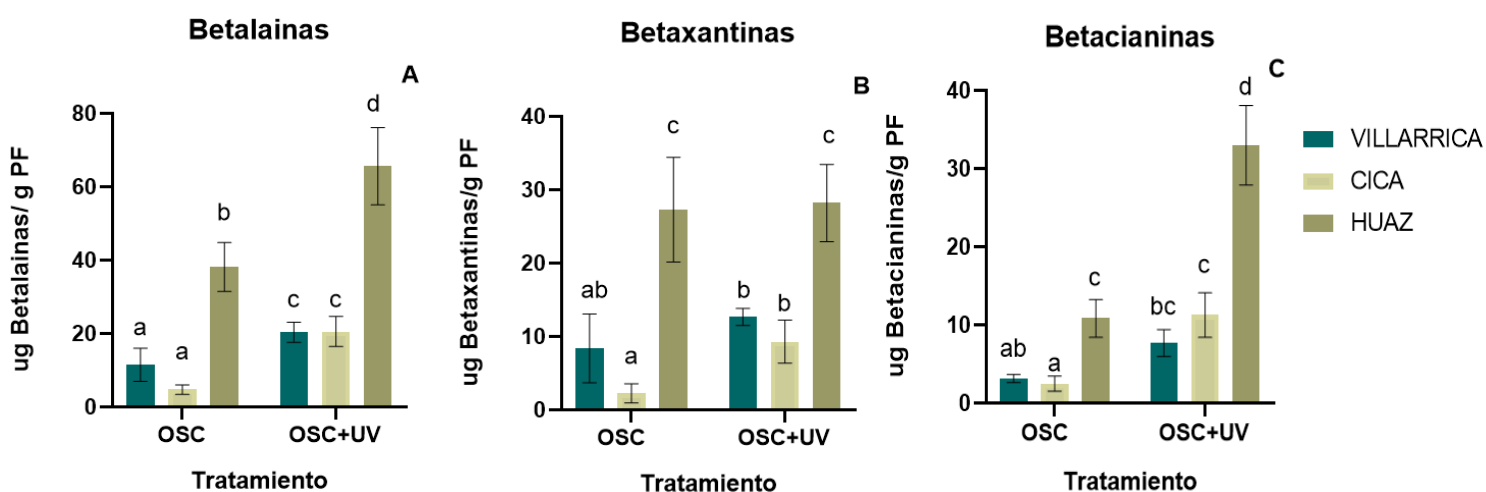


Fig.3: Concentración en microgramos por peso fresco de (A) betalaínas, (B) betaxantinas y (C) betacianinas; en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua (OSC) o expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Contenido de flavonoides.

Siguiendo el protocolo de Woisky et al. (1998), las absorbancias obtenidas fueron en todos los casos muy bajas como para poder hacer estimaciones confiables del producto obtenido (*Fig. Suplementaria 1. A, B*). Cabe señalar que, si bien el método que empleamos es ampliamente utilizado en la bibliografía, presenta varios

inconvenientes a la hora de cuantificar flavonoides totales (Shraim et al., 2021), por lo cual optamos por no seguir evaluando esta variable en nuestro modelo experimental hasta tanto no dispusiéramos de un método alternativo. Aun así, se puede observar que, en condiciones de oscuridad, el genotipo HUAZ muestra la mayor cantidad de productos de reacción con absorbancia a 510 nm, seguido de Villarrica y CICA. Al exponer a las plántulas al tratamiento con luz UV, los valores de absorbancia aumentaron, pero la tendencia entre genotipos se mantuvo. El genotipo con mayor cantidad de flavonoides medibles con este método fue HUAZ, seguido de Villarrica y CICA. Cabe señalar, no obstante, que sólo en HUAZ y Villarrica el aumento registrado tras la exposición a UV fue estadísticamente significativo (*Fig. Suplementaria 1. A, B*).

Para poder cuantificar los compuestos que absorben en la longitud de onda coincidente con el tratamiento de irradiación con luz UV, se procedió a analizar la absorbancia a 315 nm en los diferentes extractos (*Fig. 4*). Aquí se ve una clara relación entre los valores de absorbancia y el tratamiento aplicado: en condiciones de oscuridad, las plántulas de los tres genotipos presentaron valores marcadamente inferiores de compuestos que absorben a 315 nm que aquellas que fueron posteriormente expuestas a radiación UV. Tras la exposición a UV, las plántulas de Villarrica y CICA fueron las que mayor incremento relativo de este tipo de metabolitos presentaron.

Metabolitos que absorben al UV-B

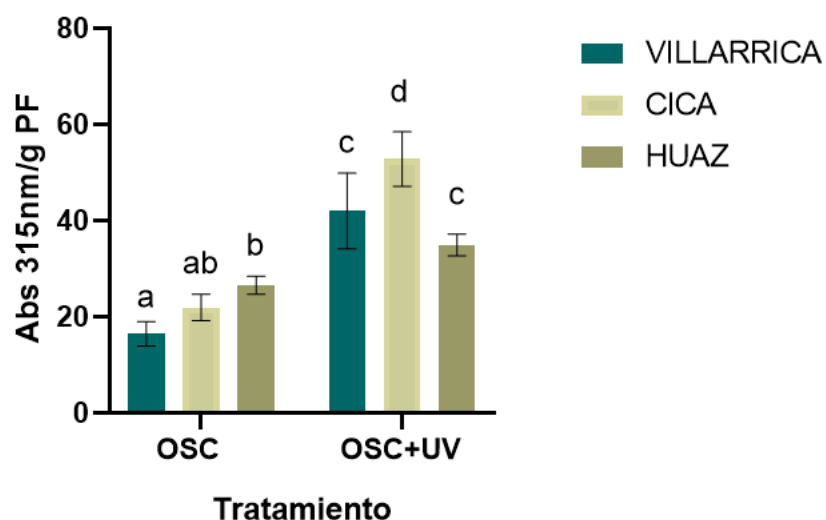


Fig.4: Contenido de metabolitos que absorben al UV, expresados como unidades de absorbancia por gramo de peso fresco, en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua (OSC) o expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Capacidad antioxidante.

La concentración inicial de metabolitos capaces de reducir el Mo(VI) a Mo(V), como estimador de la capacidad antioxidante del extracto obtenido (Prieto et al., 1999), fue relativamente similar entre los 3 genotipos. Luego de la exposición a radiación UV, HUAZ acumuló una mayor cantidad de compuestos antioxidantes, seguido de CICA, mientras que en Villarrica no se observaron diferencias significativas con respecto al control en oscuridad (*Fig. 5*).

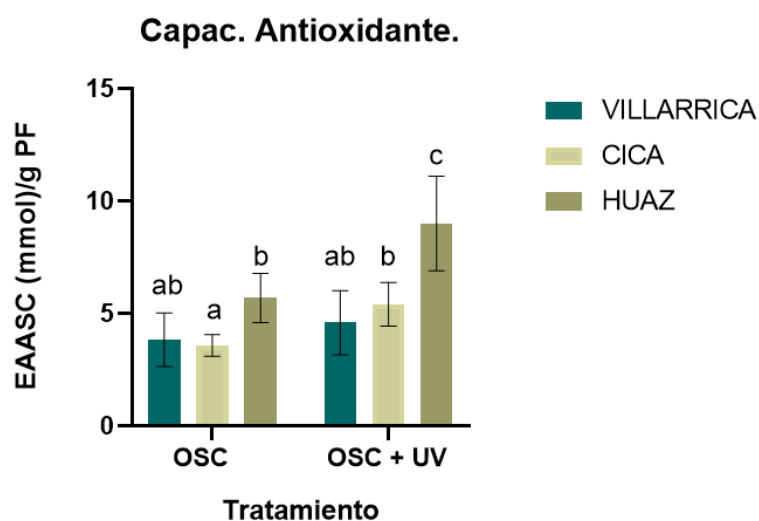


Fig.5: Capacidad antioxidante medida en Equivalentes de Ácido ascórbico por gramo de peso fresco; en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua (OSC) o expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Actividad de enzimas antioxidantes.

La actividad específica de la ascorbato peroxidasa (APX) no difirió significativamente entre las plántulas crecidas en oscuridad (tratamiento control) y las tratadas durante 24 hs con radiación UV, aunque se observaron diferencias entre los genotipos independientemente del tratamiento, según la siguiente tendencia: Villarrica \leq CICA \leq HUAZ (*Fig 6.A*). Las respuestas fueron similares cuando los datos de actividad se expresaron por unidad de peso fresco (*Fig.6.B*).

A diferencia de la APX, la actividad POX (tanto específica como por unidad de biomasa) disminuyó significativamente en todas las plántulas tras la exposición a UV (*Fig. 6C, D*). De los tres genotipos, Villarrica fue el que presentó menor actividad de esta

enzima y el que mayor porcentaje de inhibición evidenció respecto del control luego de aplicarse el tratamiento lumínico.

Para el caso de la enzima catalasa (CAT), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos lumínicos tanto para la actividad específica como la actividad por unidad de biomasa (*Fig.6E, F*). No obstante, se observaron diferencias entre los 3 genotipos, con una tendencia muy similar a la que presentó la enzima ascorbato peroxidasa.

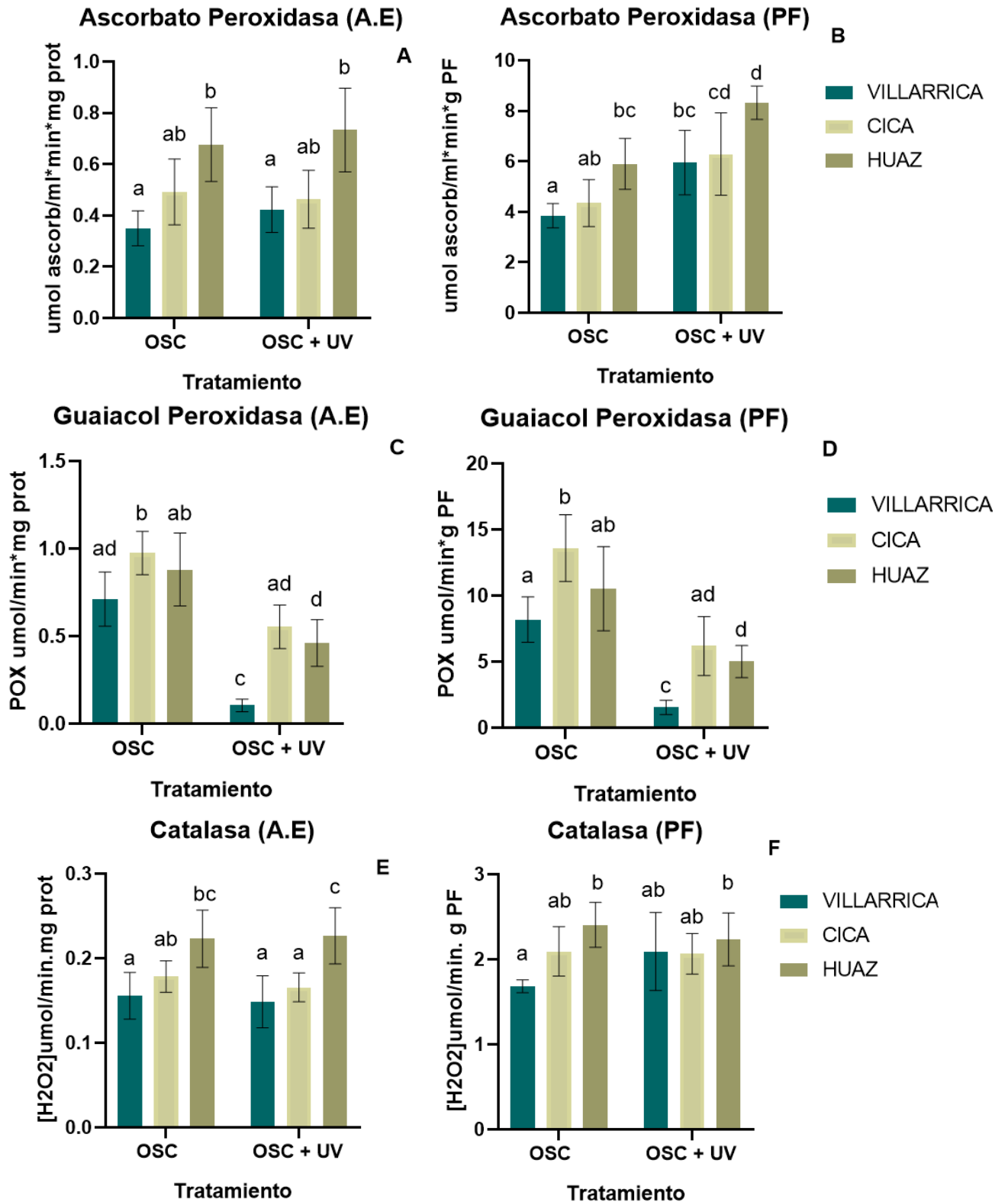


Fig.6: Actividad específica (A.E) o actividad por gramo de peso fresco (PF) de las enzimas ascorbato peroxidasa (A,B), Guaiacol peroxidasa (C,D) y Catalasa (E,F), medidas en plántulas de los tres genotipos analizados, crecidas en oscuridad continua (OSC) o tras 24 hs de exposición a radiación UV(OSC+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Los tratamientos con letras distintas difieren estadísticamente ($p \leq 0,05$.)

La actividad específica de la enzima glutathion S-transferasa tampoco presentó mayores cambios frente al tratamiento con UV en los genotipos estudiados, aunque difirió entre ellos de manera similar a la tendencia observada para el caso de APX, siendo Villarrica el genotipo con menor actividad respecto de CICA y HUAZ (*Fig 7.A*). Cabe mencionar que cuando la actividad se expresó por unidad de biomasa, en Villarrica se observó un aumento que resultó estadísticamente significativo tras el tratamiento con UV (*Fig 7.B*).

En cuanto a la enzima superóxido dismutasa, su actividad específica aumentó tras la exposición a UV en los tres genotipos, aunque los incrementos fueron estadísticamente significativos solo para el caso de CICA y HUAZ (*Fig 7.C*). Sin embargo, al expresar la actividad por unidad de biomasa se puede apreciar un aumento significativo en todos los genotipos, siendo esta enzima la que respondió de manera más consistente incrementando su actividad en la parte aérea de todas las plántulas luego del tratamiento con UV (*Fig 7.D*).

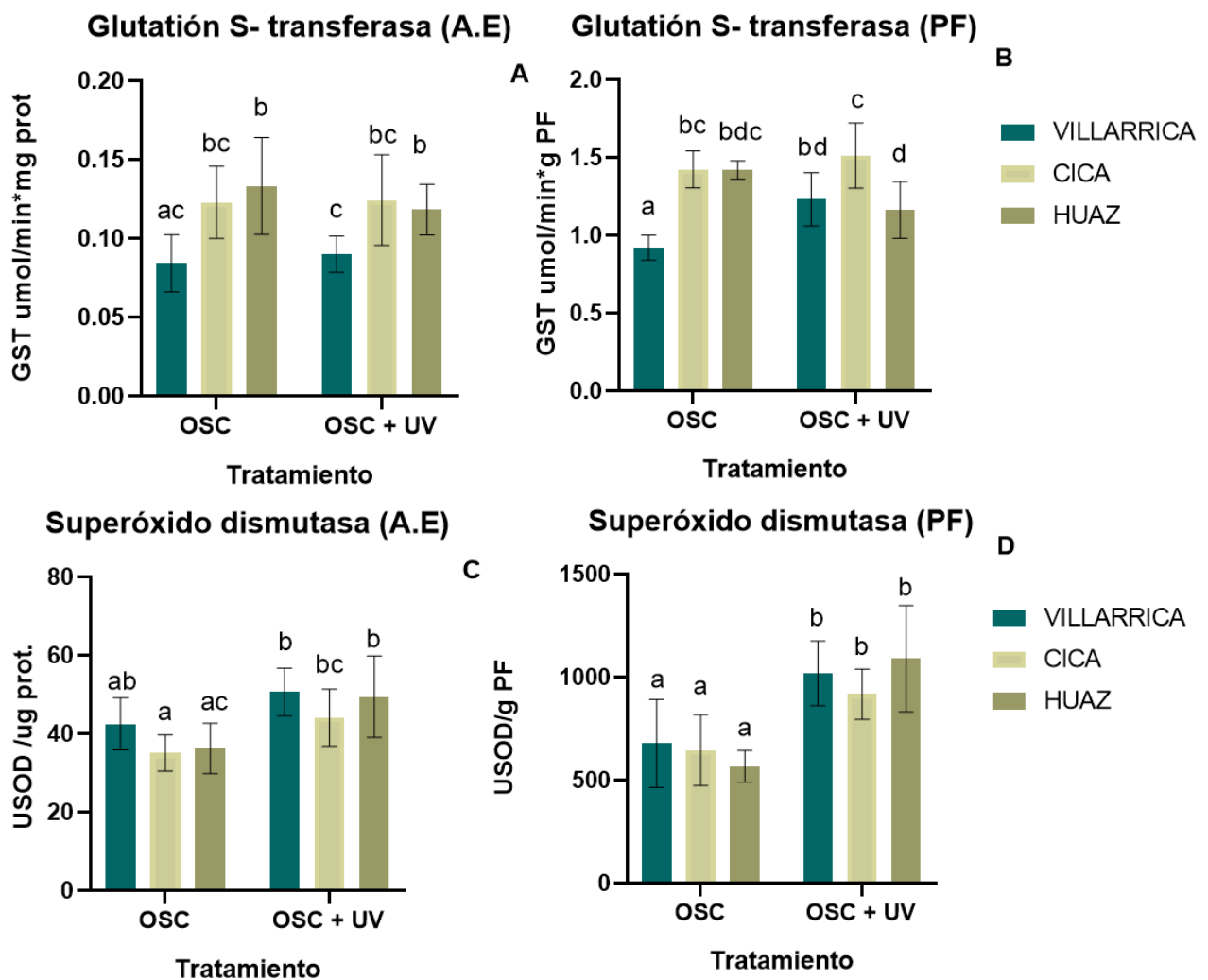


Fig.7: Actividad específica (A.E) o actividad por gramo de peso fresco (PF) de las enzimas Glutación S-transferasa (A, B) y superóxido dismutasa (C, D) medidas en plántulas de los tres genotipos analizados, crecidas en oscuridad continua (OSC) o tras 24 hs de exposición a radiación UV (OSC+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Los tratamientos con letras distintas difieren estadísticamente ($p \leq 0,05$).

2- Efecto de los pulsos de luz blanca (LB) sobre la concentración de betalainas y demás variables analizadas, antes y luego de la exposición a radiación UV.

2-1: Comparaciones Oscuridad (control) vs. Oscuridad + LB

A continuación, se presentan los resultados obtenidos luego de la aplicación de los pulsos de LB, a fin de corroborar no solo si se logró incrementar la concentración de betalainas en relación al control (oscuridad), sino además analizar cómo se encontraban las demás variables fisiológicas a ser evaluadas, previo a la aplicación del tratamiento con radiación UV.

Betalainas

Con esta configuración de pulsos lumínicos se puede ver que efectivamente el contenido de betalaínas aumentó en los tres genotipos, en comparación a sus respectivos controles (*Fig.8A*). El genotipo HUAZ siguió siendo el que mayor producción de estos pigmentos presentó en ambas condiciones. Para el caso de CICA y Villarrica, si bien tienen cantidades similares de betalaínas en ausencia de luz, la respuesta frente a los pulsos de LB difirió, observándose un aumento relativo de la concentración de estos pigmentos alrededor de 1,5 veces mayor en Villarrica que la registrada para CICA.

Analizando qué tipo de betalaína se induce en particular, en el caso de las betaxantinas, hay un marcado aumento (aunque no estadísticamente significativo) en Villarrica, mientras que para las betacianinas el aumento se da para los tres genotipos, siendo en este caso HUAZ el que mayor incremento relativo presentó (*Fig 8 B, C*).

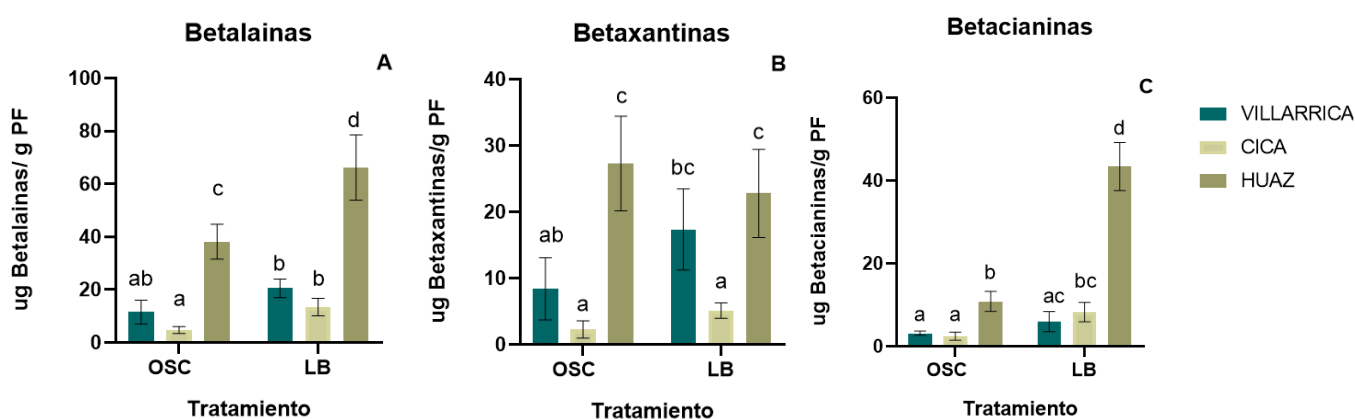


Fig.8: Concentración en microgramos por peso fresco de (A) betalaínas, (B) betaxantinas y (C) betacianinas; en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua (OSC) o expuestas a pulsos de luz blanca (LB). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Metabolitos que absorben a 315 nm

En cuanto a la concentración de compuestos que absorben a 315 nm, se observó un aumento significativo al exponer a las plantas a los pulsos de luz blanca en los dos genotipos de *C. quinoa*, mientras que las plántulas de *C. berlandieri* no presentaron diferencias significativas entre tratamientos (*Fig.9*).

Metabolitos que absorben al UV-B

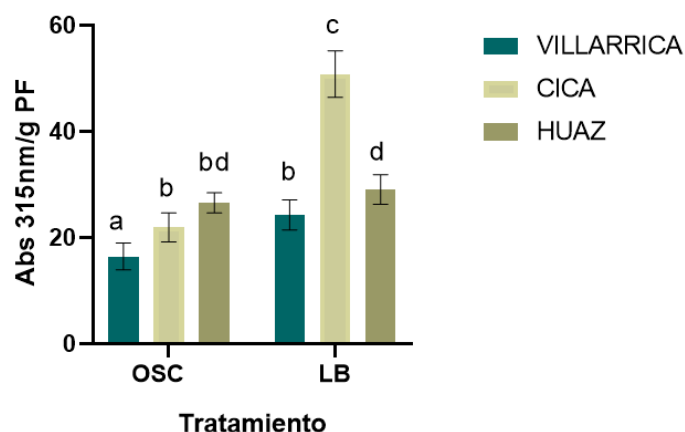


Fig.9: Metabolitos que absorben al UV-B, expresados como unidades de absorbancia por gramo de peso fresco, en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua (OSC) o expuestas a pulsos de luz blanca (LB). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Capacidad Antioxidante

El tratamiento con pulsos de luz blanca no generó diferencias significativas respecto del control, persistiendo la tendencia de una mayor cantidad de compuestos antioxidantes en el genotipo HUAZ independientemente de la condición lumínica. (Fig. 10)

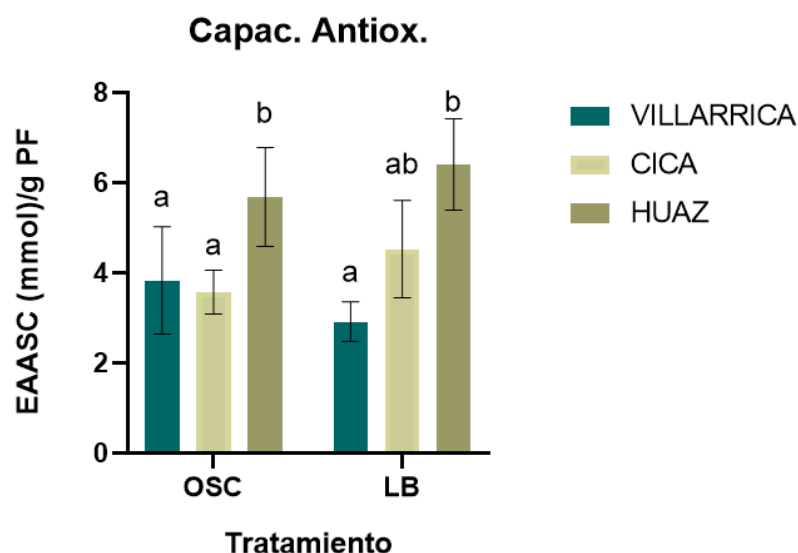


Fig.10: Capacidad antioxidante medida en equivalentes de ácido ascórbico por gramo de peso fresco; en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua (OSC) o expuestas a pulsos de luz blanca (LB). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Enzimas

En líneas generales, se observó una disminución de la actividad específica de las dos peroxidases (APX y POX) en las plántulas expuestas a los pulsos de LB, aunque la significancia estadística de este efecto dependió de la enzima y el genotipo considerados (*Fig. 11 A, C*). No obstante, cuando la actividad se expresó por unidad de biomasa, ésta aumentó respecto de la del control (OSC), particularmente en los genotipos CICA y HUAZ (*Fig 11 B, D*). Esto probablemente se debió a que se produjo un incremento en el contenido total de proteínas solubles en los extractos tras exponer a las plántulas a los pulsos de LB (*Fig suplementaria 2 B*)

De manera similar, la actividad específica de la enzima superóxido dismutasa disminuyó luego de los pulsos de LB, siendo significativa la diferencia para las plántulas de los genotipos CICA y Villarrica. (*Fig 11 E*). Al expresar a la actividad por unidad de biomasa, no se observaron variaciones para Villarrica y CICA, mientras que la actividad aumentó para HUAZ (*Fig 11 F*).

Debido a que las enzimas GST y CAT no evidenciaron mayores cambios frente a la exposición al tratamiento con luz UV (ver sección anterior), optamos por no seguir evaluando su actividad en esta serie de ensayos.

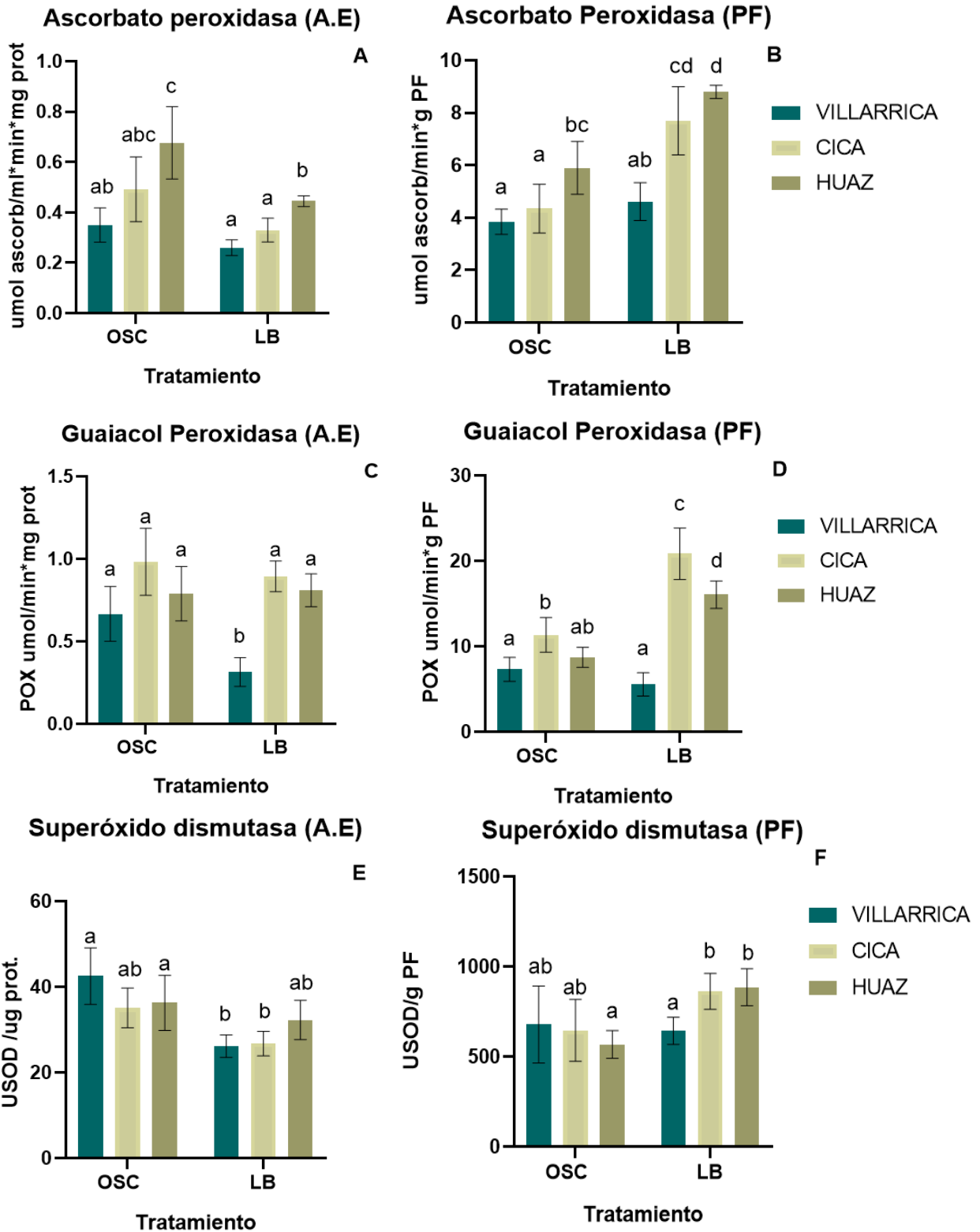


Fig.11: Actividad específica (A.E) o actividad por gramo de peso fresco (PF) de las enzimas ascorbato peroxidasa (A, B), Guaiacol peroxidasa (C, D) y superóxido dismutasa (E,F), medidas en plántulas de los tres genotipos analizados, crecidas en oscuridad continua (OSC) o tras pulsos de luz blanca (LB). Los datos corresponden a la media \pm DS. Los tratamientos con letras distintas difieren estadísticamente ($p \leq 0,05$.)

2-2: Comparaciones LB + UV vs. oscuridad + UV.

A continuación, se muestra el efecto del tratamiento con pulsos de luz blanca sobre la respuesta de las plántulas al estrés por UV (tratamiento LB + UV), tomándose como control de referencia la respuesta de las plántulas no expuestas previamente a los pulsos de LB (*tratamiento Osc + UV*).

Peroxidación lipídica.

Las plántulas de los genotipos Villarrica y HUAZ previamente expuestas a los pulsos de LB presentaron una reducción de los niveles de TBARs (medidos como equivalentes de MDA) luego del estrés con luz UV, en comparación con las que habían sido crecidas en oscuridad continua (*Fig. 12*). En cambio, en el genotipo CICA no se vió un efecto significativo del tratamiento con LB sobre esta variable.

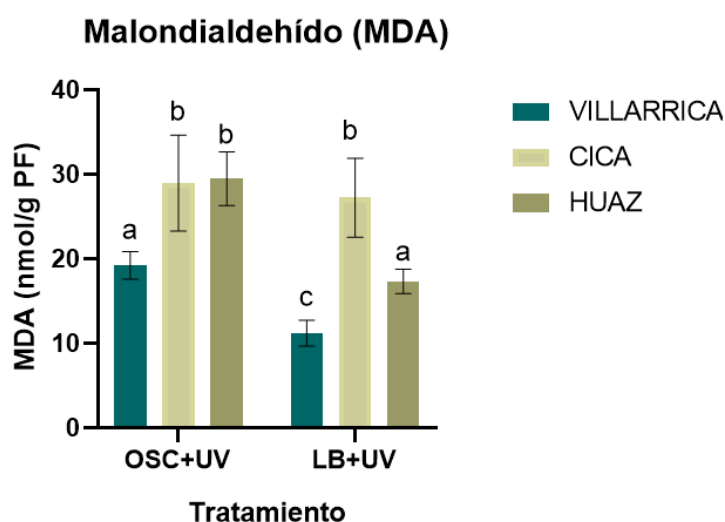


Figura 12. Contenido de TBARS (en equivalentes de MDA) calculado por gramo de peso fresco; en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua y expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV), o tratadas con pulsos de luz blanca previo a la irradiación con UV (LB+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Carbonilación proteica.

Al igual que lo descrito en la primera sección, no fue posible detectar diferencias significativas entre tratamientos para un mismo genotipo, aunque sí se observó una mayor cantidad de proteínas carboniladas en los genotipos CICA y HUAZ respecto de Villarrica en las plántulas provenientes del tratamiento LB+UV (*Fig. 13*)

Carbonilación de Proteínas.

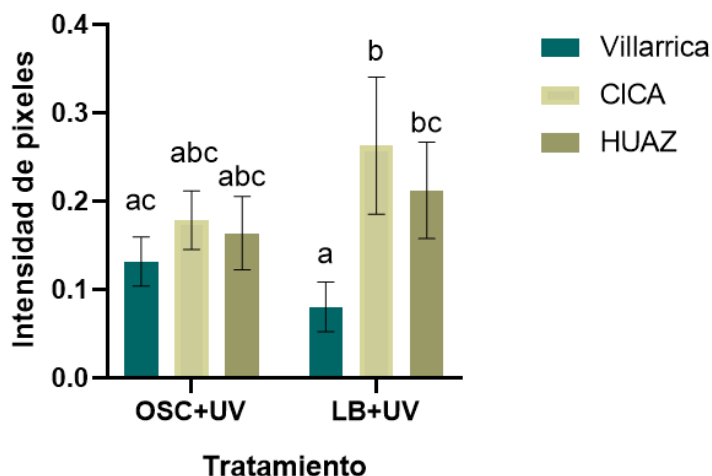


Fig.13: Carbonilación de proteínas medida en intensidad de pixeles en función del tratamiento aplicado, en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua y expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV), o tratadas con pulsos de luz blanca previo a la irradiación con UV (LB+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Contenido de betalainas.

Las plántulas de los genotipos Villarrica y HUAZ que recibieron pulsos de luz blanca no incrementaron significativamente los niveles de betalainas tras la exposición a UV, mientras que se observó una inducción notable para el genotipo CICA (Fig 14 A)

Siguiendo el patrón observado en la Fig 14 A, los niveles de betaxantinas y betacianinas fueron similares entre tratamientos lumínicos para Villarrica y HUAZ, mientras que para el caso de CICA se observó un marcado aumento en el tratamiento LB + UV respecto del control, tanto en la síntesis de betaxantinas como de betacianinas (Fig 14 B, C).

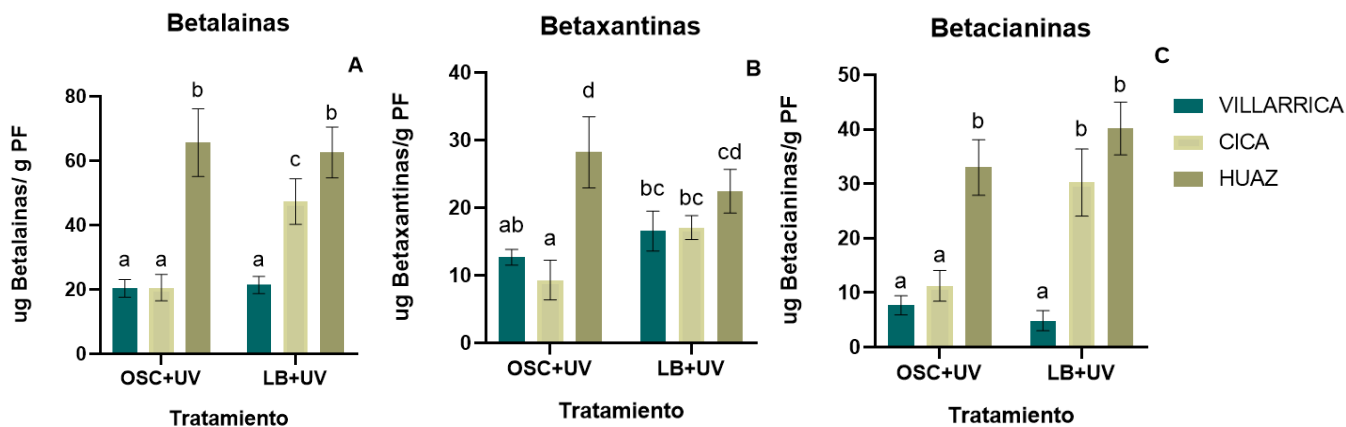


Fig.14: Concentración en microgramos por peso fresco de (A) betalaínas, (B) betaxantinas y (C) betacianinas; en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua y expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV), o tratadas con pulsos de luz blanca previo a la irradiación con UV (LB+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Metabolitos que absorben a 315 nm.

Al analizar esta variable, CICA y HUAZ no presentaron diferencias entre tratamientos, mientras que Villarrica mostró un aumento significativo de dichos compuestos en el tratamiento de LB+UV en comparación con el tratamiento OSC+UV (Fig. 15).

Metabolitos que absorben al UV-B

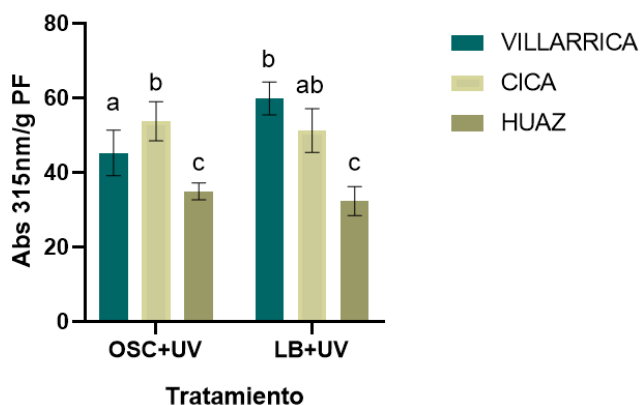


Fig.15: Contenido de metabolitos que absorben al UV-B, expresados como unidades de absorbancia por gramo de peso fresco, en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua y expuestas durante 24 hs a UV (Osc+UV), o tratadas con pulsos de luz blanca previo a la irradiación con UV (LB+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Capacidad antioxidante.

Al comparar la generación de compuestos antioxidantes entre tratamientos, no se observaron diferencias para CICA y Villarrica, mientras que para HUAZ se produjo una reducción de la concentración de metabolitos antioxidantes en el tratamiento con LB+UV respecto del control, llegando a los niveles presentes en el resto de los genotipos (Fig. 16).

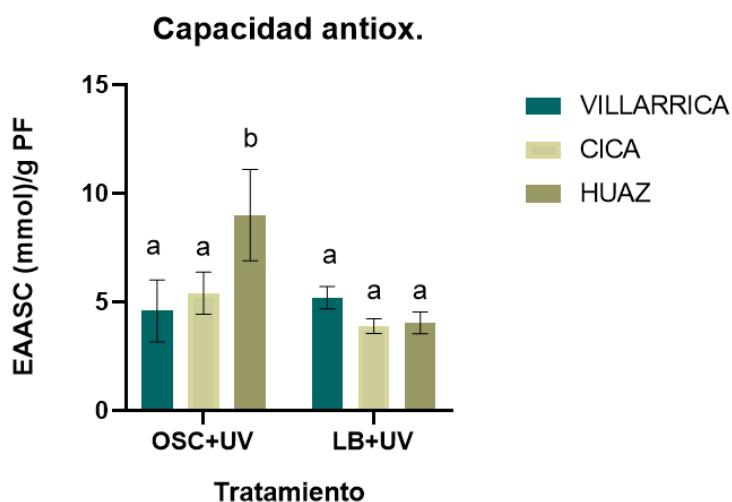


Fig.16: Capacidad antioxidante medida en Equivalentes de Ácido ascórbico por gramo de peso fresco; en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua y expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV), o tratadas con pulsos de luz blanca previo a la irradiación con UV (LB+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Actividad enzimática

En este apartado se optó por continuar trabajando con la enzima Guaiacol peroxidasa (POX) y la superóxido dismutasa (SOD), debido a que las demás enzimas no exhibieron mayores variaciones frente a la exposición al tratamiento con luz UV (ver sección anterior).

Si bien en el caso de la POX se mantuvo la diferencia de actividad específica entre genotipos (CICA < Villarrica y HUAZ), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para esta enzima como tampoco para la SOD en ninguno de los genotipos evaluados (Fig 17. A, C).

Cuando la actividad de ambas enzimas se expresó por unidad de biomasa, se observó un aumento significativo tras la exposición a UV-B en las plántulas del genotipo CICA previamente expuestas a los pulsos de LB (Fig. 17. B, C). Dicho

aumento podría relacionarse al mayor contenido de proteínas solubles presente en las plántulas del tratamiento LB+UV respecto del control Osc+UV (Fig Suplementaria 2.C).

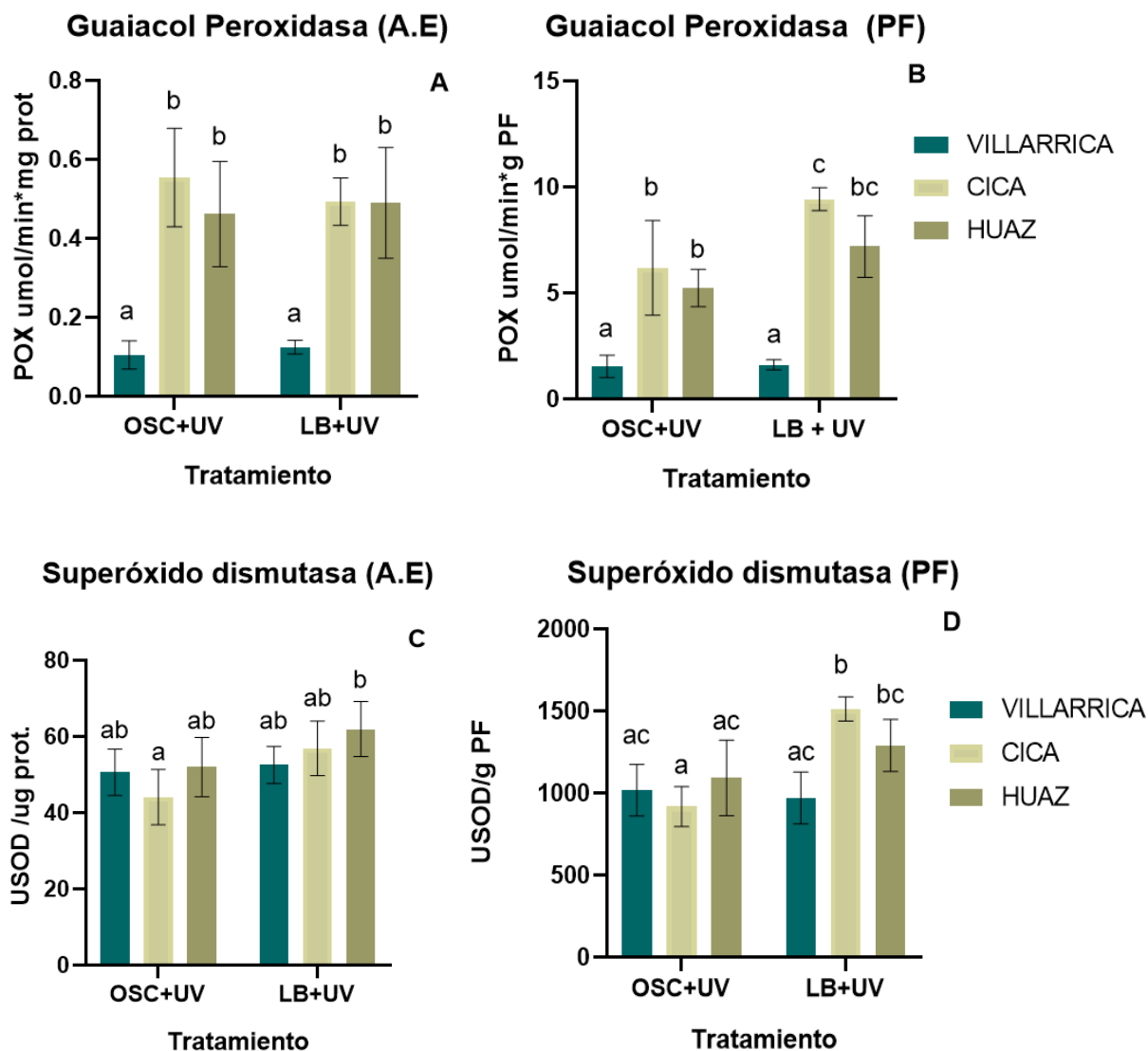


Fig.17: Actividad específica (A.E) o actividad por gramo de peso fresco (PF) de las enzimas Guaiacol peroxidasa (A,B) y superóxido dismutasa (C,D) medidas en plántulas crecidas en oscuridad continua y expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV), o tratadas con pulsos de luz blanca previo a la irradiación con UV (LB+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

Expresión de genes

A continuación, se analizó la expresión de los genes UVR8 y DODA en las plántulas de *C. quinua* crecidas en oscuridad (control) y luego de la exposición a UV-B, con o sin tratamiento previo de pulsos de luz blanca (LB). La expresión de los genes se relativizó a la del gen de referencia Elongation factor 1 (EF-1). En este caso no se midió la expresión de genes en el genotipo HUAZ ya que pertenece a *C. berlandieri* y

los primers utilizados no levantaban producto en este caso. Además, es necesario aclarar que los resultados son preliminares, ya que no se realizó la validación por secuenciación de la expresión de los genes analizados y, aunque los niveles de expresión del gen de referencia no variaron entre tratamientos, al no tener secuenciado el producto de amplificación, los resultados quedarán pendientes de confirmación.

En cuanto a la expresión de UVR8, ambos genotipos registraron un incremento significativo en respuesta al tratamiento de UV, el cual fue mayor aun en las plántulas que fueron tratadas previamente con los pulsos de LB (*Fig 18 A*).

En relación a la expresión de DODA, el mayor incremento en respuesta al UV se registró en las plántulas previamente crecidas en oscuridad. En las tratadas con pulsos de LB, el aumento en la expresión de DODA luego de la exposición a UV-B fue menor que en el caso anterior, resultando solo significativamente mayor que el control en el genotipo CICA (*Fig 18 B*).

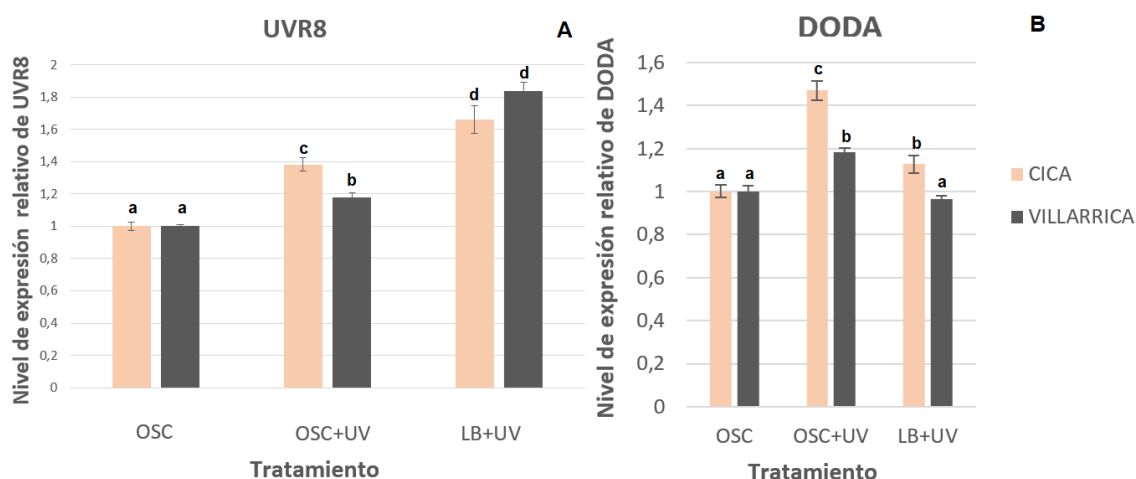


Fig.18: Evaluación por RT-qPCR de la expresión de UVR8 (A) y DODA (B) relativizada a la condición control (Osc= 1), en plántulas crecidas en oscuridad continua (OSC), crecidas en oscuridad continua y expuestas durante 24 hs a UV (OSC+UV), o tratadas con pulsos de luz blanca previo a la irradiación con UV (LB+UV). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluaron algunos de los posibles mecanismos implicados en la tolerancia al estrés generado por la radiación UV-B, en plántulas jóvenes de *Chenopodium quinoa* y de su pariente cercano, *Chenopodium berlandieri*, basados en el conocimiento de que estas especies presentan gran adaptabilidad a diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. En particular, se buscó analizar el rol de las betalaínas y su interacción con otros componentes del metabolismo antioxidante que ejercen una acción clave en el mantenimiento de la homeostasis redox celular.

La determinación de los TBARS y junto con la proporción de proteínas carboniladas son métodos ampliamente utilizados para evaluar el daño oxidativo en respuesta a factores de estrés tanto biótico como abiótico (Savchenko & Tikhonov, 2021; Tola et al., 2021). En base a las variables de daño analizadas y, en especial, considerando el incremento relativo en la concentración de MDA observado cuando plántulas etioladas fueron expuestas a UV-B, *C. berlandieri* parecería ser el genotipo más sensible en nuestras condiciones experimentales (Fig. 1). No obstante, si las plántulas reciben luz blanca (aún en dosis restringidas) previo a la exposición a UV-B, el nivel de daño por exposición a UV-B se reduce significativamente tanto en esta especie como en el genotipo Villarrica de *C. quinoa*, siendo aparentemente CICA el genotipo menos tolerante de los tres analizados (Fig. 12). La alta concentración de betalaínas que presentan las plantas de *C. berlandieri* particularmente tras el pulso de LB, podría contribuir a la reducción del daño oxidativo por exposición a UV-B en comparación con las del tratamiento control (oscuridad continua). De hecho, en dichas plántulas el mantenimiento de altos niveles endógenos de betalaínas luego de la exposición a UV-B se correlaciona con un descenso en la acumulación tanto de compuestos que contribuyen a la capacidad antioxidante total, como de metabolitos con A_{315} (Fig. 15 y 16), sugiriendo que la asignación de recursos a la síntesis de betalaínas tendría un rol relevante en esta especie para incrementar su tolerancia al UV-B. A los fines de poder corroborar esta hipótesis, se planean futuros ensayos tendientes a inhibir farmacológicamente la síntesis de betalaínas mediante el uso de tropolone (Mueller et al., 1996; Saniewski et al., 2007), tanto previo como durante la exposición a UV-B.

Si bien no hay mucha información en quinua, también se ha reportado en una especie cercana y perteneciente al orden Caryophyllales, *Amaranthus tricolor*, un aumento en el nivel de peroxidación lipídica al exponer las plantas a dosis de radiación

UV-B similares a las usadas en el presente trabajo (Singh et al., 2013). Por otro lado, se ha informado que el mantenimiento de un mayor contenido de betalaínas en plántulas de diferentes genotipos de *C. quinoa* expuestas a estrés salino contribuiría a disminuir el nivel de peroxidación lipídica en el genotipo menos sensible (Causin et al., 2020). Sin embargo, en los genotipos de esta especie utilizados en el presente trabajo, la relación entre la acumulación de betalaínas y la reducción del daño oxidativo inducido por el tratamiento con UV-B no parece ser muy clara. En efecto, llama la atención que en las plántulas del genotipo menos tolerante (CICA), frente al estrés por UV-B e independientemente de la condición lumínica previa (oscuridad u oscuridad + LB), la síntesis tanto de betaxantinas como de betacianinas se estimula a niveles similares o significativamente mayores que en el caso de Villarrica. Más aún, a pesar de tener mayores niveles de peroxidación lipídica, las plántulas del genotipo CICA previamente tratadas con pulsos de LB presentan una capacidad antioxidante comparable y concentraciones de metabolitos con A315 significativamente mayores que Villarrica (Fig. 9 y 10), por lo que otro tipo de metabolitos o procesos fisiológicos parecerían ser los principales responsables de las diferencias observadas en la tolerancia al estrés agudo por UV-B en plántulas jóvenes de esta especie. Estos resultados en parte coinciden con lo reportado recientemente por Adhikary et al., 2020 en plantas de *Amaranthus. tricolor*. En dicha publicación, se trabajó con plántulas de dos cultivares: Green Leaf (GL) y Red Leaf (RL). Las GL tenían el gen citocromo p450 (clave en la síntesis de betalaínas) silenciado mediante silenciamiento inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés), y así se produjeron líneas isogénicas derivadas de RL. Ambas variedades (con y sin betalaínas) fueron sometidas a tratamientos de luz blanca o 6 horas de luz UV-B (0.80 W.m^{-2}). Las respuestas observadas fueron similares tanto para las plantas con alto contenido de betalaínas (RL) como para las plantas verdes (VIGS, GL), lo que llevó a la conclusión de que las betalaínas no tendrían un papel protector contra UV-B en las hojas de amaranto, bajo esas condiciones experimentales, aunque sí se observó un aumento en el contenido de metabolitos secundarios tales como melatonina, a los que los autores atribuyen un posible rol protector. Como se mencionara en la introducción, los flavonoides han demostrado tener un efecto protector frente al UV-B en otros modelos experimentales (Procházková et al., 2011b), por lo que su caracterización es un aspecto importante a considerar.

Otra de las variables que podrían haber contribuido a la tolerancia al estrés por UV es la actividad de enzimas antioxidantes. Es bien sabido que, a pesar de que bajas concentraciones de ROS pueden actuar como mensajeros secundarios en el desarrollo de la planta, su acumulación por encima de ciertos niveles críticos puede ser deletérea

debido al daño celular producido (Asada, 1999; Dat et al., 2000; Demidchik, 2015; Hammond-Kosack & Jones, 1996). Es por esto que un conjunto de enzimas antioxidantes funciona de manera coordinada para mantener la homeostasis celular de las ROS. La superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) cataliza la dismutación del anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) para formar H_2O_2 y O_2 . Esta enzima se considera como uno de los principales componentes para eliminar los radicales libres generados por el radical superóxido en las plantas. Otras enzimas, como CAT y POX, trabajan en estrecha sincronía con SOD para prevenir la formación de ROS más perjudiciales a partir de $\bullet\text{O}_2^-$ como de H_2O_2 a través de una reacción de Haber-Weiss (Rajput et al., 2021). En cuanto a la actividad GST, esta constituida por una familia supernumeraria de enzimas cuya función es conjugar GSH a compuestos electrofílicos de diferente origen para su detoxificación (Kumar & Trivedi, 2018). El aumento de la actividad de estas enzimas ha sido ampliamente documentado en respuesta a diferentes tipos de estrés, incluyendo el generado por exposición a luz UV (Ain et al., 2023; Amjad et al., 2015; Hinojosa et al., 2018; Kumar & Trivedi, 2018; Rajput et al., 2021). Para el caso particular de especies betalaínicas, tales como *Amaranthus tricolor* e incluso *C. quinoa*, algunos reportes indican que la aplicación de pulsos agudos de radiación UV-B induce especialmente incrementos en las actividades de las enzimas SOD y POX (Hilal et al., 2004; Singh et al., 2013). En concordancia con dichos reportes, la actividad superóxido dismutasa fue la que presentó incrementos más consistentes en respuesta al tratamiento con UV-B en los tres genotipos estudiados en nuestro trabajo (Fig. 7 C, D; Fig. 17 C, D). No obstante, y contrariamente a lo mencionado previamente, la actividad POX se vio reducida por la presencia de luz UV-B en todas las condiciones aquí examinadas (Fig. 6 C, D y Fig. 17 A, B). Para el caso particular de *C. quinoa*, cabe señalar que en el trabajo de Hilal et al., (2004) se utilizaron plántulas pertenecientes al cultivar *Sajama*, de origen boliviano (Gómez & Aguilar, 2016). Lo cual podría contribuir a explicar, en parte, la discrepancia con nuestros resultados. De hecho, la existencia de diferencias intraespecíficas en las respuestas frente a ciertos tipos de estrés abiótico, como asimismo entre diferentes estadios de desarrollo, ha sido previamente reportada para *C. quinoa* (Causin et al., 2020 y referencias allí citadas). De todos modos, el hecho de que el mismo efecto inhibitorio se haya observado en los tres genotipos analizados (uno de los cuales, por otro lado, no corresponde a *C. quinoa*) sugiere que se trata de una respuesta general al tratamiento con UV-B empleado, que requerirá de futuros ensayos para una mejor comprensión del posible mecanismo implicado.

En cuanto al análisis de expresión de genes, nuevamente resulta necesario aclarar que los resultados aquí presentados son preliminares, ya que no se realizó una validación por secuenciación de los productos obtenidos.

Los niveles de UVR8 aumentaron con la radiación UV y aún más con el tratamiento de LB+UV (*Fig. 18.A*). La mayoría de los estudios realizados sobre UVR8 se enfocaron en *Arabidopsis thaliana*, donde se ha observado que el tratamiento con UV-B no provoca cambios en la expresión de UVR8, pero sí en la conformación de la molécula (de inactiva a activa). No obstante, hay reportes en otras especies que demuestran que la expresión génica puede estimularse al inducir ciertos niveles de estrés abiótico (Tossi et al., 2019). Por ejemplo, en el trabajo realizado por Q. Wu et al., 2016, se analizó la expresión de UVR8 en hipocótilos de brotes de rábano, tratados con luz blanca o luz UV-B. También se reportó un aumento en la expresión de UVR8 para ambas condiciones lumínicas, aunque resultando mayor la expresión en UV que en luz blanca. Cabe aclarar que esta especie es productora de antocianinas, pigmento que no se encuentra en especies betalaínicas. Aun no ha sido claramente dilucidado el mecanismo por el cual otras longitudes de onda diferentes al UV podrían contribuir al incremento de expresión del fotorreceptor.

Por otro lado, según lo publicado por Zhao et al., 2010, en callos de *Suaeda salsa* la expresión de DODA es inducida por la luz blanca. Con nuestras condiciones experimentales no se logró observar un patrón similar para plántulas de quinua (*Fig 18.B*). Resulta necesario mencionar que DODA está implicada en una de las posibles vías que conducen a la síntesis del principal precursor de las betalaínas, que es el ácido betalámico. Por lo tanto, podría ser factible que en nuestras condiciones experimentales la síntesis de pigmentos se viera estimulada debido al aumento en la expresión de otros genes postulados para la vía de biosíntesis tales como *Tyr*, *CYPT6AD1/3*, *cDOPA*, *5GT*, entre otros (Tossi et al. 2021), y/o por incremento de las actividades de las enzimas involucradas, sin que se altere significativamente el nivel de expresión génica.

En cuanto al contenido de flavonoides, es sabido que, en condiciones de estrés por radiación UV, se genera un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides (González et al., 2009). Adicionalmente, se ha reportado que plantas de *A. thaliana* mutantes en la producción de flavonoides son hipersensibles a la radiación UV-B (J. Li et al., 1993) y que dichos compuestos también protegen al ADN frente al daño ocasionado por UV-B (Kootstra, 1994). Además, los flavonoides han recibido mucha atención debido a su función como antioxidantes frente a la generación de ROS generada por estrés abiótico (Hideg et al., 2013). Como se mencionó en resultados, si bien se observó un aumento en el contenido de productos de reacción según el protocolo de Woisky et al., (1998) frente al tratamiento con UV, la baja sensibilidad del método exige que los datos sean confirmados por otro procedimiento, por lo que esta variable permanece como un importante factor pendiente de analizar en futuros trabajos de investigación.

En conjunto, los resultados aquí presentados sugieren que, si bien las betalaínas podrían contribuir significativamente a la protección frente a la radiación UV-B, su importancia relativa puede diferir tanto entre especies como intraespecíficamente. De hecho, en el caso particular de *C. quinoa* no hallamos una clara correlación entre la concentración de estos pigmentos (ni otros metabolitos de los aquí analizados) y la disminución del nivel de daño oxidativo generado por el tratamiento con UV-B. Esto sugiere que la presencia de otros compuestos y/o la activación de otros mecanismos contribuirían a la tolerancia a este tipo de estrés en los estadios iniciales de crecimiento de las plantas de *C. quinoa*. Futuros ensayos son necesarios para profundizar el conocimiento de los mecanismos implicados, tanto en esta como en otras especies betalaínicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adhikary, D., Forsyth, J. A., Murch, S. J., & Deyholos, M. K. (2020). Impact of betacyanins on responses to ultraviolet radiation in *Amaranthus tricolor* L. *Journal of Plant Interactions*, *15*(1), 117–126. <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1766584>
- Ain, Q. T., Siddique, K., Bawazeer, S., Ali, I., Mazhar, M., Rasool, R., Mubeen, B., Ullah, F., Unar, A., & Jafar, T. H. (2023). Adaptive mechanisms in quinoa for coping in stressful environments: an update. *PeerJ*, *11*, e14832. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.14832/FIG-6>
- Amjad, M., Akhtar, S. S., Yang, A., Akhtar, J., & Jacobsen, S. E. (2015). Antioxidative Response of Quinoa Exposed to Iso-Osmotic, Ionic and Non-Ionic Salt Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *201*(6), 452–460. <https://doi.org/10.1111/JAC.12140>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Asada, K. (1999a). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*, 601–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- Asada, K. (1999b). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*, 601–639. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.50.1.601>
- Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*, *141*(2), 391–396. <https://www.jstor.org/stable/20205759>
- Bais, A. F., Lucas, R. M., Bornman, J. F., Williamson, C. E., Sulzberger, B., Austin, A. T., Wilson, S. R., Andrad, A. L., Bernhard, G., McKenzie, R. L., Aucamp, P. J., Madronich, S., Neale, R. E., Yazar, S., Young, A. R., De Gruijl, F. R., Norval, M., Takizawa, Y., Barnes, P. W., ... Heikkilä, A. M. (2018). Environmental effects of ozone depletion, UV radiation and interactions with climate change: UNEP Environmental Effects Assessment Panel, update 2017. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *17*(2), 127–179. <https://doi.org/10.1039/C7PP90043K>
- Bertero, H. D., de la Vega, A. J., Correa, G., Jacobsen, S. E., & Mujica, A. (2004). Genotype and genotype-by-environment interaction effects for grain yield and grain size of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as revealed by pattern analysis of international multi-environment trials. *Field Crops Research*, *89*(2), 299–318. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.02.006>

- Björn, L. O. (1996). Effects of ozone depletion and increased UV-B on terrestrial ecosystems. *International Journal of Environmental Studies*, 51(3), 217–243. <https://doi.org/10.1080/00207239608711082>
- Björn, L. O. (2015). Ultraviolet-A, B, and C. *UV4Plants Bulletin*, 2015(1), 17–18. <https://doi.org/10.19232/uv4pb.2015.1.12>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brockington, S. F., Yang, Y., Gandia-Herrero, F., Covshoff, S., Hibberd, J. M., Sage, R. F., Wong, G. K. S., Moore, M. J., & Smith, S. A. (2015). Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*, 207(4), 1170–1180. <https://doi.org/10.1111/NPH.13441>
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294. <https://doi.org/10.1021/jf030045u>
- Causin, H. F., Bordón, D. A. E., & Burrieza, H. (2020). Salinity tolerance mechanisms during germination and early seedling growth in *Chenopodium quinoa* Wild. genotypes with different sensitivity to saline stress. *Environmental and Experimental Botany*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.103995>
- Causin, H. F., Marchetti, C. F., Pena, L. B., Gallego, S. M., & Barneix, A. J. (2015). Down-regulation of catalase activity contributes to senescence induction in wheat leaves exposed to shading stress. *Biologia Plantarum*, 59(1), 154–162. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0480-z>
- Čejka, Č., Ardan, T., Širc, J., Michálek, J., Beneš, J., Brůnová, B., & Rosina, J. (2011). Hydration and Transparency of the Rabbit Cornea Irradiated with UVB-Doses of 0.25 J/cm² and 0.5 J/cm² Compared with Equivalent UVB Radiation Exposure Reaching the Human Cornea from Sunlight. *Current Eye Research*, 36(7), 607. https://www.academia.edu/16766121/Hydration_and_Transparency_of_the_Rabbit_Cornea_Irradiated_with_UVB_Doses_of_0_25_J_cm_2_and_0_5_J_cm_2_Compared_with_Equivalent_UVB_Radiation_Exposure_Reaching_the_Human_Cornea_from_Sunlight
- Choudhary, K. K., & Agrawal, S. B. (2016). Assessment of Fatty Acid Profile and Seed Mineral Nutrients of Two Soybean (*Glycine max* L.) Cultivars Under Elevated Ultraviolet-B: Role of ROS, Pigments and Antioxidants. *Photochemistry and Photobiology*, 92(1), 134–143. <https://doi.org/10.1111/PHP.12544>
- D., (ed.) Bazile, H.D., (ed.) Bertero, & C., (ed.) Nieto. (2015). *State of the art report on quinoa around the world in 2013*. FAO; CIRAD. https://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=575489
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000a). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57(5), 779–795. <https://doi.org/10.1007/s000180050041>
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000b). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular*

and *Molecular Life Sciences : CMLS*, 57(5), 779–795.
<https://doi.org/10.1007/S000180050041>

- Demidchik, V. (2015a). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212–228.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Demidchik, V. (2015b). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212–228.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2014.06.021>
- Elstner, E. F. (1994). “Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells.” *Journal Article*, 6, 13–25.
- Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., & Tattini, M. (2011). Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(5), 709–711. <https://doi.org/10.4161/psb.6.5.15069>
- Fischer, W. W., Hemp, J., & Valentine, J. S. (2016). How did life survive Earth’s great oxygenation? *Current Opinion in Chemical Biology*, 31, 166–178.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.013>
- Foyer, C. H., & Mullineaux, P. M. (2019). *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (2nd ed.). CRC Press.
- Frohnmeier, H., & Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology*, 133(4), 1420–1428.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.030049>
- Gallego, S. M., & Benavides, M. P. (2019). Cadmium-Induced Oxidative and Nitrosative Stress in Plants. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 233–274). Elsevier.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128148648000103>
- Geerts, S., Raes, D., Garcia, M., Vacher, J., Mamani, R., Mendoza, J., Huanca, R., Morales, B., Miranda, R., Cusicanqui, J., & Taboada, C. (2008). Introducing deficit irrigation to stabilize yields of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *European Journal of Agronomy*, 28(3), 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2007.11.008>
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants 1 2. *Plant Physiology*, 59(2), 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Gómez, L., & Aguilar, E. (2016). Guía de cultivo de la quinua. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura y Universidad Nacional Agraria La Molina*, 126. www.fao.org/publications/es
- González, J. A., Rosa, M., Parrado, M. F., Hilal, M., & Prado, F. E. (2009). Morphological and physiological responses of two varieties of a highland species (*Chenopodium quinoa* Willd.) growing under near-ambient and strongly reduced solar UV-B in a lowland location. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(2), 144–151.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.05.003>
- Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1981). [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In *Methods in Enzymology* (Vol. 77, pp. 398–405). Academic Press.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687981770538>

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
<https://oxford.universitypressscholarship.com/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478>
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1996a). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, *8*(10), 1773–1791.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC161314/>
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (1996b). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, *8*(10), 1773. <https://doi.org/10.1105/TPC.8.10.1773>
- Hideg, É., Jansen, M. A. K., & Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*, *18*(2), 107–115.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.003>
- Hilal, M., Parrado, M. F., Rosa, M., Gallardo, M., Orce, L., Massa, E. M., González, J. A., & Prado, F. E. (2004). Epidermal Lignin Deposition in Quinoa Cotyledons in Response to UV-B Radiation. *Photochemistry and Photobiology*, *79*(2), 205–210.
<https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.2004.TB00011.X>
- Hinojosa, L., González, J. A., Barrios-Masias, F. H., Fuentes, F., & Murphy, K. M. (2018a). Quinoa abiotic stress responses: A review. In *Plants* (Vol. 7, Issue 4). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/plants7040106>
- Hinojosa, L., González, J., Barrios-Masias, F., Fuentes, F., & Murphy, K. (2018b). Quinoa Abiotic Stress Responses: A Review. *Plants*, *7*(4), 106. <https://doi.org/10.3390/plants7040106>
- 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*(4), 604–611.
<https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Horak, E., & Farré, E. M. (2015). The regulation of UV-B responses by the circadian clock. *Plant Signaling & Behavior*, *10*(5), e1000164. <https://doi.org/10.1080/15592324.2014.1000164>
- Jacobsen, S.-E., Monteros, C., Christiansen, J. L., Bravo, L. A., Corcuera, L. J., & Mujica, A. (2005). Plant responses of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to frost at various phenological stages. *European Journal of Agronomy*, *2*(22), 131–139.
<https://doi.org/10.1016/j.eja.2004.01.003>
- Jenkins, G. I. (2014). The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology. *The Plant Cell*, *26*(1), 21–37. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119446>
- Kootstra, A. (1994). Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Molecular Biology*, *26*(2), 771–774. <https://doi.org/10.1007/BF00013762/METRICS>
- Koyro, H.-W., & Eisa, S. S. (2008). Effect of salinity on composition, viability and germination of seeds of *Chenopodium quinoa* Willd. *Plant and Soil*, *302*(1), 79–90.
<https://doi.org/10.1007/s11104-007-9457-4>
- Kumar, S., & Trivedi, P. K. (2018). Glutathione S-transferases: Role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 364396.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00751/BIBTEX>

- Li, G., Meng, X., Zhu, M., & Li, Z. (2019). Research Progress of Betalain in Response to Adverse Stresses and Evolutionary Relationship Compared with Anthocyanin. *Molecules*, *24*(17), 3078. <https://doi.org/10.3390/molecules24173078>
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R. G., & Lastatbi, R. L. (1993). Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *The Plant Cell*, *5*(2), 171–179. <https://doi.org/10.1105/TPC.5.2.171>
- Li, L., & van Staden, J. (1998). Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulation*, *24*(1), 55–66. <https://doi.org/10.1023/A:1005954532397>
- Lindroth, R. L., Hofmann, R. W., Campbell, B. D., McNabb, W. C., & Hunt, D. Y. (2000). Population differences in *Trifolium repens* L. response to ultraviolet-B radiation: Foliar chemistry and consequences for two lepidopteran herbivores. *Oecologia*, *122*(1), 20–28. <https://doi.org/10.1007/PL00008831/METRICS>
- Liu, X., Yue, M., Ji, Q., & He, J. (2013). Effects of ultraviolet-B radiation on primary photophysical process in photosystem II: A fluorescence spectrum analysis. *Advanced Topics in Science and Technology in China*, 642–649. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_140/COVER
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Mathesius, U. (2018). Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. *Plants 2018, Vol. 7, Page 30*, *7*(2), 30. <https://doi.org/10.3390/PLANTS7020030>
- Matsumura, T., Tabayashi, N., Kamagata, Y., Souma, C., & Saruyama, H. (2002). Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiologia Plantarum*, *116*(3), 317–327. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160306.x>
- Mueller, L. A., Hinz, U., & Zrýd, J. P. (1996). Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, *42*(6), 1511–1515. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00171-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00171-9)
- Nguyen, C. T. T., Lim, S., Lee, J. G., & Lee, E. J. (2017). VcBBX, VcMYB21, and VcR2R3MYB Transcription Factors Are Involved in UV-B-Induced Anthocyanin Biosynthesis in the Peel of Harvested Blueberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(10), 2066–2073. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.6B05253/SUPPL_FILE/JF6B05253_SI_001.PDF
- Pang, Q., & Hays, J. B. (1991). UV-B-Inducible and Temperature-Sensitive Photoreactivation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, *95*(2), 536–543. <https://doi.org/10.1104/pp.95.2.536>
- Pena, L. B., Azpilicueta, C. E., & Gallego, S. M. (2011). Sunflower cotyledons cope with copper stress by inducing catalase subunits less sensitive to oxidation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *25*(3), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2011.05.001>

- Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A., & Stewart, C. R. (1994). Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. *The Plant Cell*, *6*(1), 65–74. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.1.65>
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, *269*(2), 337–341. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1999.4019>
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011a). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, *82*(4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011b). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, *82*(4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2011.01.018>
- Prochazkova, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., & Singh, D. V. (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, *161*(4), 765–771. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00462-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00462-9)
- Qi, J., Wang, J., Gong, Z., & Zhou, J.-M. (2017). Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *38*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.022>
- Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Andrabi, K. I., & John, R. (2017). Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany*, *137*, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.010>
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. (2021a). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. In *Biology* (Vol. 10, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. (2021b). Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology 2021, Vol. 10, Page 267, 10*(4), 267. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10040267>
- Reddy, K. R., Patro, H., Lokhande, S., Bellaloui, N., Gao, W., Reddy, K. R., Patro, H., Lokhande, S., Bellaloui, N., & Gao, W. (2016). Ultraviolet-B Radiation Alters Soybean Growth and Seed Quality. *Food and Nutrition Sciences*, *7*(1), 55–66. <https://doi.org/10.4236/FNS.2016.71007>
- Ruales, J., & Nair, B. M. (1992). Nutritional quality of the protein in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, *42*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/BF02196067>
- Rudrappa, T., Neelwarne, B., & Aswathanarayana, R. G. (2004). In Situ and Ex Situ Adsorption and Recovery of Betalains from Hairy Root Cultures of *Beta vulgaris*. *Biotechnology Progress*, *20*(3), 777–785. <https://doi.org/10.1021/bp0300570>
- Saniewski, M., Saniewska, A., & Kanlayanarat, S. (2007). Biological activities of tropolone and hinokitiol: The tools in plant physiology and their practical use. *Acta Horticulturae*, *755*, 133–142. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2007.755.17>

- Savchenko, T., & Tikhonov, K. (2021). Oxidative Stress-Induced Alteration of Plant Central Metabolism. *Life*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/LIFE11040304>
- Schippers, J. H. M., Foyer, C. H., & van Dongen, J. T. (2016). Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current Opinion in Plant Biology*, *29*, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2015.11.009>
- Schmidt, R., & Schippers, J. H. M. (2015). ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1850*(8), 1497–1508. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.020>
- Schopfer, P., Plachy, C., & Frahry, G. (2001). Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology*, *125*(4), 1591–1602. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1591>
- Segal, L. M., & Wilson, R. A. (2018). Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology*, *110*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.12.003>
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, *150*, 111932. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111932>
- Singh, S., Agrawal, M., & Agrawal, S. B. (2013). Differential sensitivity of spinach and amaranthus to enhanced UV-B at varying soil nutrient levels: Association with gas exchange, UV-B-absorbing compounds and membrane damage. *Photosynthesis Research*, *115*(2–3), 123–138. <https://doi.org/10.1007/S11120-013-9841-2/FIGURES/9>
- Steinbrecht, W., Hegglin, M. I., Harris, N., & Weber, M. (2018). Is global ozone recovering? *Comptes Rendus Geoscience*, *350*(7), 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2018.07.012>
- Teramura, A. H., & Sullivan, J. H. (1994). Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research*, *39*(3), 463–473. <https://doi.org/10.1007/BF00014599>
- Tevini, M., & Steinmüller, D. (1987). Influence of Light, UV-B Radiation, and Herbicides on Wax Biosynthesis of Cucumber Seedling. *Journal of Plant Physiology*, *131*(1–2), 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80272-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80272-9)
- Timoneda, A., Feng, T., Sheehan, H., Walker-Hale, N., Pucker, B., Lopez-Nieves, S., Guo, R., & Brockington, S. (2019). The evolution of betalain biosynthesis in Caryophyllales. *New Phytologist*, *224*(1), 71–85. <https://doi.org/10.1111/nph.15980>
- Tola, A. J., Jaballi, A., & Missihoun, T. D. (2021). Protein Carbonylation: Emerging Roles in Plant Redox Biology and Future Prospects. *Plants*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/PLANTS10071451>
- Tossi, V. E., Martínez Tosar, L., Pitta-Álvarez, S. I., & Causin, H. F. (2021). Casting light on the pathway to betalain biosynthesis: A review. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 186). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104464>

- Tossi, V. E., Regalado, J. J., Iannicelli, J., Laino, L. E., Burrieza, H. P., Escandón, A. S., & Pitta-Álvarez, S. I. (2019). Beyond arabidopsis: Differential UV-B response mediated by UVR8 in diverse species. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 459191. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00780/BIBTEX>
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., & Kobayashi, H. (1999). A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, *11*(7), 1195–1206. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1195>
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H. K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2004). Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *39*(1), 45–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02105.x>
- Vandenbussche, F., Yu, N., Li, W., Vanhaelewyn, L., Hamshou, M., Van Der Straeten, D., & Smaghe, G. (2018). An ultraviolet B condition that affects growth and defense in Arabidopsis. *Plant Science*, *268*, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.12.005>
- Vavilin, D. V., Ducruet, J.-M., Matorin, D. N., Venediktov, P. S., & Rubin, A. B. (1998). Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *42*(3), 233–239. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00076-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00076-1)
- Wang, H., Gui, M., Tian, X., Xin, X., Wang, T., & li, J. (2017). Effects of UV-B on vitamin C, phenolics, flavonoids and their related enzyme activities in mung bean sprouts (*Vigna radiata*). *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(3), 827–833. <https://doi.org/10.1111/IJFS.13345>
- Wehr, N. B., & Levine, R. L. (2012). Quantitation of Protein Carbonylation by Dot Blot. *Analytical Biochemistry*, *423*(2), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.01.031>
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO Journal*, *16*(16), 4806–4816. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4806>
- Wilson, H. D. (1990). Quinoa and Relatives (Chenopodium sect. Chenopodium subsect. Cellulata). *Economic Botany*, *44*(3), 92–110. <https://www.jstor.org/stable/4255274>
- Wohlpert, A., & Mabry, T. J. (1968). On the Light Requirement for Betalain Biogenesis. *Plant Physiology*, *43*(3), 457–459. <https://www.jstor.org/stable/4261313>
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, *37*(2), 99–105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>
- Wu, G., Bornman, J. F., Bennett, S. J., Clarke, M. W., Fang, Z., & Johnson, S. K. (2017). Individual polyphenolic profiles and antioxidant activity in sorghum grains are influenced by very low and high solar UV radiation and genotype. *Journal of Cereal Science*, *77*, 17–23. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2017.07.014>

- Wu, Q., Su, N., Zhang, X., Liu, Y., Cui, J., & Liang, Y. (2016). Hydrogen peroxide, nitric oxide and UV RESISTANCE LOCUS8 interact to mediate UV-B-induced anthocyanin biosynthesis in radish sprouts. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep29164>
- Yang, A., Akhtar, S. S., Amjad, M., Iqbal, S., & Jacobsen, S.-E. (2016). Growth and Physiological Responses of Quinoa to Drought and Temperature Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 202(6), 445–453. <https://doi.org/10.1111/jac.12167>
- Yannarelli, G. G., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2006). Effect of UV-B radiation on the activity and isoforms of enzymes with peroxidase activity in sunflower cotyledons. *Environmental and Experimental Botany*, 56(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.01.015>
- Zhao, S. Z., Sun, H. Z., Chen, M., & Wang, B. S. (2010). Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte Suaeda salsa calli. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(1), 99–107. <https://doi.org/10.1007/S11240-010-9710-Z/FIGURES/5>

ANEXO

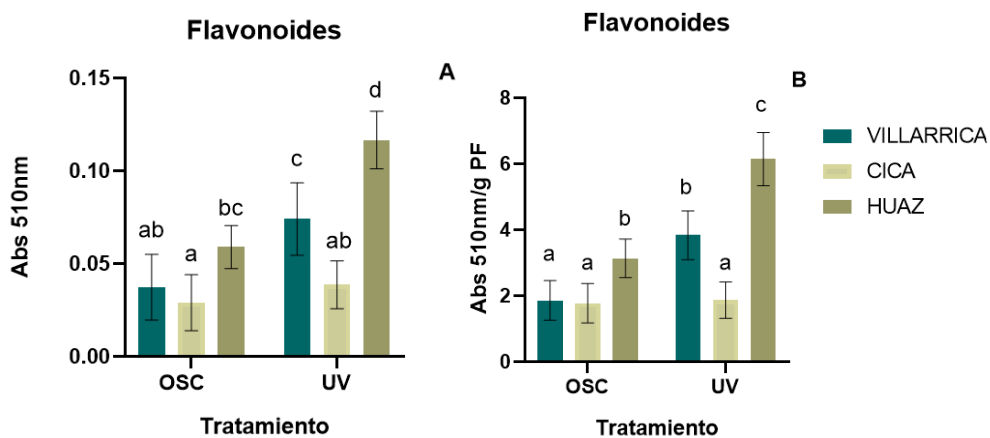


Fig. Suplementaria 1: Flavonoides medidos a 510 nm, expresados como unidades de absorbancia (A, C, E) o absorbancia por gramo de peso fresco (B, D, F), en plántulas de 6 días de edad crecidas en oscuridad continua (OSC) o expuestas a pulsos de luz blanca (LB). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada gráfico, las barras con letras diferentes difieren a $p \leq 0,05$.

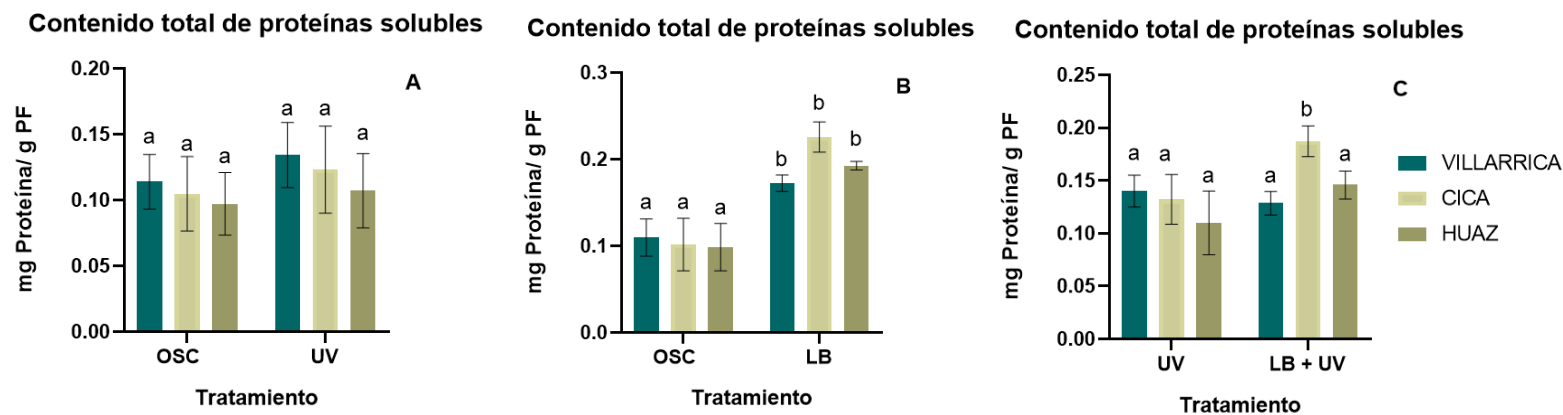


Fig. Suplementaria 2: Contenido total de proteínas solubles expresado como el cociente entre mg de proteína por gramo de peso fresco para cada genotipo según el tratamiento: Osc vs. UV (A), Osc vs. LB (B), Osc+UV vs. LB+UV (C). Los datos corresponden a la media \pm DS. Dentro de cada grafico, las barras con letras distintas difieren estadísticamente ($p \leq 0,05$.)